



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

**DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES DE CÂNCER DE
MAMA PELO MÉTODO *CELL BLOCK***

NATHÁLIA DE VARGAS HAAR

Brasília- DF
2018

NATHÁLIA DE VARGAS HAAR

**DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES DE CÂNCER DE
MAMA PELO *MÉTODO CELL BLOCK***

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

Brasília- DF
2018

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

NATHÁLIA DE VARGAS HAAR

**DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES DE CÂNCER DE MAMA
PELO MÉTODO *CELL BLOCK***

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Andrea Barretto Motoyama
Universidade de Brasília - UnB

Profa. Dra. Rosângela Vieira de Andrade (Membro externo)
Universidade Católica de Brasília - UCB

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

*Dedico este trabalho aos meus pais
Jussara e Luiz Fernando, por sempre
me incentivarem a estudar.
Ao Thales, amor de uma vida inteira,
por sempre apoiar e estar presente.
Às minhas irmãs, Malu e Amanda por
serem as melhores irmãs que eu poderia
ter.*

AGRADECIMENTOS

A minha família, por sempre incentivar que eu estudasse cada vez mais e pelas horas em que eu precisei de muito silêncio.

À Profa Fabiana e à Tércia, por me acolherem com este projeto e me fazerem acreditar que o impossível não era tão impossível assim mesmo em um curto intervalo de tempo.

À Profa Andrea, por me proporcionar a oportunidade de estagiar em laboratório de pesquisa durante a minha graduação e me fazer gostar dessa área na minha formação.

À Profa Fátima Vogt, do Ambulatório de Mastologia do Hospital Universitário de Brasília, pela cooperação com a coleta de amostras e principalmente pela imensa ajuda dada pela Tereza, residente da Mastologia.

À estagiária de Enfermagem Ana, que me ajudou em cada coleta e foi um anjo quando eu mais precisei e ao Alan, graduando de Farmácia, que também se prontificou a fazer as coletas.

Aos alunos Danillo e Ísis de graduação em Medicina e Farmácia respectivamente, por me auxiliarem no processamento das amostras.

Aos alunos de graduação em Medicina Rafael e Larissa, pela cooperação com a coleta de dados.

Ao Thales, por todo apoio e entendimento nos momentos mais difíceis.

“Nunca rejeite uma ideia porque ela lhe é estranha. Ouça antes todos os lados da questão e tire suas próprias conclusões.”

PETER RICHELIEU

RESUMO

Haar, Nathália de Vargas. Detecção de células tumorais circulantes de câncer de mama pelo método *cell block* [dissertação]. 2018. Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília.

O câncer de mama é o mais incidente em mulheres, sendo que no mundo, mais de 1,5 milhão de novos casos são diagnosticados anualmente. A metástase é um processo invasivo, no qual as células tumorais deixam o seu sítio primário, passam a circular pelo organismo e podem colonizar novos órgãos. Esse processo e suas complicações respondem por mais de 90% das mortes em decorrência do câncer. Dessa maneira, buscam-se métodos mais eficientes não apenas para diagnosticar o câncer, mas também para fornecer um prognóstico aos pacientes quando o tumor já está instalado. As células tumorais circulantes (CTCs) são identificadas na circulação sanguínea e linfática de pacientes com metástase e sua detecção representa uma grande promessa clínica. Por serem originárias do tumor primário, as CTCs podem fornecer informações para o tratamento mesmo antes do surgimento de metástases, além de exercerem um papel importante no diagnóstico precoce e prognóstico da doença. Atualmente, um único método, não disponível no Brasil, encontra-se aprovado para prognóstico de pacientes metastáticos. O *cell block* vem sendo utilizado no preparo de diferentes amostras citológicas como efusões, lavado peritoneal, aspirados e amostras em meio líquido para a detecção de CTCs. A adição de plasma e tromboplastina à amostra para formação de coágulo é uma das formas de preparo do *cell block*, no entanto, existem poucos estudos com este método em amostras de sangue. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a possibilidade de detecção de células tumorais de câncer de mama no sangue periférico através do método plasma-tromboplastina no preparo de *cell block*. Para isso, foi utilizado um método de *spike-in*, no qual células de linhagens MCF7 e BT474 de câncer de mama foram adicionadas, em quantidades decrescentes (de 500.000 a 1.000), ao sangue periférico de doadores saudáveis para serem detectadas. Como comparação, foi utilizado o método de citocentrifugação. O *cell block* fixado em formol e incluído em parafina foi utilizado para a montagem dos cortes em lâminas histológicas. As lâminas provenientes da citocentrifugação foram imunomarcadas com anticorpo anti-Pan-CK enquanto as lâminas provenientes do *cell block* foram coradas com anticorpos anti Pan-CK, *Epithelial related antigen*, Claudin-4, receptor de estrogênio (RE) e GATA-3. As

lâminas foram analisadas e as células positivas contadas. Além disso, amostras de 31 pacientes com câncer de mama foram coletadas e submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima para as linhagens celulares. Na avaliação de células tumorais das linhagens MCF-7 e BT474, houve aumento de células imunomarcadas à medida que ocorreu aumento da concentração de células adicionadas inicialmente para os diferentes anticorpos, com destaque para a marcação de Pan-CK e *epitelial related antigen*, principalmente nas menores concentrações menores (1.000 a 10.000 células/7 mL). A recuperação de células na citocentrifugação e do *cell block* foi baixa, sendo a maior taxa de recuperação de 2,95 % para as lâminas feitas por citocentrifugação na concentração de 142,86 células/mL marcadas com Pan-CK. Nenhum dos casos era metastático e 42% deles estavam em estágio inicial. A idade média das pacientes com câncer de mama foi de 54 anos. O tipo histológico mais frequente foi o ductal (77,42%), sendo as invasões sanguínea ou linfática encontradas em apenas 7 casos (22,58%). Em 61,3% dos tumores (19 casos) havia expressão do receptor de estrogênio enquanto a expressão do receptor de progesterona ocorreu em 18 pacientes (58% dos casos). No entanto, não houve detecção de CTCs em amostras de sangue de quaisquer das pacientes do estudo, pelos métodos utilizados (citocentrifugação e *cell block*). Considerando-se que foi possível a detecção de células tumorais de linhagens, mesmo que em pequena quantidade, pelo método do *cell block*, conclui-se que ele poderá ser uma alternativa rápida e econômica para identificação de CTCs. A falta de identificação de CTCs nas amostras de pacientes pode ter ocorrido por diversos fatores, tais como, a avaliação de poucos cortes do *cell block* e o fato de que os tumores eram de estadiamento ainda inicial, que tem sido frequentemente associado a baixo número de CTCs em outros trabalhos. Espera-se que o uso de *cell block* possa ser um método alternativo e viável para a detecção de CTCs, pelo menos para os pacientes metastáticos, algo que ainda necessitará de confirmação.

Palavras-chave: Câncer de mama; Células tumorais circulantes; *Cell block*, Método plasma-tromboplastina, Citocentrifugado e Imunocitoquímica

ABSTRACT

Haar, Nathália de Vargas. Detection of circulating tumor cells from breast cancer by the cell block method [dissertation]. 2018. Faculty of Medicine. University of Brasilia.

Breast cancer is the most frequent type among women, with over 1.5 million new cases diagnosed each year worldwide. Metastasis is an invasive process whereby tumor cells leave their primary site, circulate through the body, and can colonize new tissues and organs. Around 90% of cancer-related deaths are due to metastasis and as such, methods to provide an accurate prognosis are actively sought after. Circulating tumor cells (CTCs) have been identified in the blood and lymphatic circulation of metastatic cancer patients and represent great clinical promise. Because they originate from the primary tumor, they may contain information about the treatment even before the onset of metastasis, and thus they may play an important role in the early diagnosis and prognosis of the disease. Currently, only one CTC-based method with prognostic value is currently approved, and it is not available in Brazil. Cell block in the detection of cancer cells has been used in the preparation of different cytological samples such as effusions, peritoneal lavage, aspirates and samples in liquid medium. The addition of plasma-thromboplastin to the sample for clot formation is one of the forms of preparing the cell block, however, there are few studies with this method in blood samples. The aim of this study was to assess the possibility of detecting CTC in the peripheral blood by using the thromboplastin/cell block method. To this end, tumor cells from the breast cancer lineages MCF7 and BT474 were spiked in 6 mL of peripheral blood from healthy donors. The quantity of cells ranged from 1.000 to 500.000. As means of comparison, the analysis for CTCs was also carried out by cytocentrifugation. Cell blocks were fixed in paraffin, and histological cuts were prepared. Samples isolated from both cytocentrifugation and cell block were subjected to immunocytochemical analysis with antibody anti-pan-CK. Additionally, histological cuts from cell block were subjected to immunocytochemical analysis with antibodies for Epithelial related antigen, Claudin-4, Estrogen receptor and GATA-3. In addition, samples from 31 breast cancer patients from the University Hospital from the University of Brasilia, were analyzed by the same methods.

In the evaluation of tumor cells of the MCF-7 and BT474 lines, there was an increase of immunolabelled cells as the concentration of cells initially added to the different antibodies increased, featured for Pan-CK and Epithelial related antigen marking, especially in lower concentrations (1,000 to 10,000 cells/7 mL). Cell recovery in cytocentrifugation and cell block was low, with the highest recovery rate being 2.95% for the panels by cytocentrifugation at the concentration of 142.86 cells/mL labeled with Pan-CK. None of the cases were metastatic and 42% of them were in the initial stage. The mean age of breast cancer patients was 54 years. The most frequent histological type was ductal (77.42%), with blood or lymphatic invasions found in only 7 cases (22.58%). In 61.3% of the tumors (19 cases) there was expression of the estrogen receptor whereas progesterone receptor expression occurred in 18 patients (58% of the cases). However, there was no detection of CTCs in blood samples from any of the study patients by the methods used (cytocentrifugation and cell block). Considering that it was possible to detect lineage tumor cells, even in small numbers, by the cell block method, it can be concluded that it can be a quick and economical alternative for the identification of CTCs. The absence of identification of CTCs in patient samples may have occurred due to a number of factors, such as the evaluation of a few cuts of the cell block and the fact that the tumors were still of initial staging, which has often been associated with low number of CTCs in other search. It is expected that the use of cell block may be an alternative and viable method for the detection of CTCs, at least for metastatic patients, something that will still need confirmation.

Keywords: Breast cancer; Circulating tumor cells; Cell block; Plasma-thromboplastin method, Cytocentrifugation and Immunocytochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cascata metastática.....	06
Figura 2. Materiais utilizados na citocentrifugação	11
Figura 3. Blocos de células feitos a partir de amostras do Laboratório de Anatomia Patológica.....	11
Figura 4. Técnica de <i>cell block</i>	12
Figura 5. Métodos <i>Labelled Streptavidin Biotin</i>	14
Figura 6. Lâmina corada pelo método de Papanicolaou	19
Figura 7. Etapas do preparo do <i>cell block</i> pelo método plasma-tromboplastina.....	21
Figura 8. Lâmina corada com hematoxilina-eosina	21
Figura 9. Número de células MCF-7 identificadas com os respectivos anticorpos, quando o número de células adicionadas inicialmente foi de 1.000, 2.500, 10.000, 25.0000, 100.000 e 500.000 células por 6 mL de sangue	26
Figura 10. Número de células MCF-7 com marcação positiva para Pan-CK no citocentrifugado e no <i>cell block</i>	27
Figura 11. Imunocitoquímica com anti-Pan-CK do citocentrifugado de sangue com células da linhagem MCF-7 em diferentes concentrações celulares.....	28
Figura 12. Coloração de Papanicolaou do citocentrifugado de sangue com células da linhagem MCF-7 em diferentes concentrações celulares	29
Figura 13. Imunocitoquímica com anti-Pan-CK e anti-epithelial related antigen em corte de <i>cell block</i> de sangue com células da linhagem MCF-7 em diferentes concentrações celulares.....	30
Figura 14. Imunocitoquímica com HE, anti-Claudin-4, anti-GATA-3 e anti-RE em corte de <i>cell block</i> de sangue com células da linhagem MCF-7.....	31

Figura 15. Número de células BT474 identificadas com os respectivos anticorpos, quando o número de células adicionadas inicialmente foi de 25.0000, 100.000 e 500.000 células por 6 mL de sangue.....33

Figura 16. Número de células das linhagens MCF-7 e BT474 identificadas com os anticorpos Pan-CK, *Epithelial related antigen* e Claudin-4 quando o número de células adicionadas inicialmente foi de 25.0000, 100.000 e 500.000 células por 6 mL de sangue.....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos para enriquecimento de CTCs baseados nas propriedades físicas e antigênicas das células tumorais circulantes.....	08
Tabela 2. Métodos para detecção de CTCs baseados na ligação com anticorpos e na ligação com ácidos nucleicos.....	10
Tabela 3. Anticorpos monoclonais utilizados na imunocitoquímica.....	22
Tabela 4. Quantificação de células tumorais da linhagem MCF-7 identificadas por imunocitoquímica.....	25
Tabela 5. Quantificação de células tumorais da linhagem BT474 identificadas por imunocitoquímica.....	32
Tabela 6. Idade das pacientes diagnosticadas com câncer de mama.....	34
Tabela 7. Estadiamento dos tumores de pacientes.....	34
Tabela 8. Grau de diferenciação e tipo histológico.....	35
Tabela 9. Invasão sanguínea, linfática e perineural.....	35
Tabela 10. Expressão dos receptores RE, RP, Ki-67 e HER2.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAAP	Fosfatase alcalina antifosfatase alcalina
ATCC [®]	Do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
CB	Do inglês, <i>cell block</i>
CD45	Antígeno de superfície específico de leucócitos
CK	Citoqueratina
CTC	Célula tumoral circulante
DAB	3-4, diaminobenzidina
DMEM [®]	Do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> /Ácido etilenodiamino tetra
EpCAM	Do inglês, <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> /Molécula de adesão de células epiteliais
EPISPOT [®]	Do inglês, <i>Epithelial immunospot</i>
FAST [®]	Do inglês, <i>Fiber-optic array scanning technology</i>
FISH [®]	Do inglês, <i>Fluorescent in situ hybridization</i>
°C	Graus Celsius
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico
HB-chip [®]	Do inglês, <i>Herringbone-chip</i>
HE	Hematoxilina e eosina
HTMSU [®]	Do inglês, <i>High-throughput microsampling unit</i>
HUB	Hospital Universitário de Brasília
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISSET [®]	Do inglês, <i>Isolation by size of tumor cells</i>
L	Litro
LSAB	Do inglês, <i>Labelled Streptavidin Biotin</i>
LSC [®]	Do inglês, <i>Laser scanning cytometry</i>
MACS [®]	Do inglês, <i>Magnetic activated cell sorting system</i>
µL	Microlitro
Mm	Milimolar
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro

PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PAG	Punção aspirativa por agulha grossa
PAP	Peroxidase anti-peroxidase
PAN-CK	Pan-citoqueratina
PBS	Do inglês, <i>phosphate buffered saline</i> /solução fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PSA	Antígeno prostático específico
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
rpm	Rotação por minuto
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa- reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
StreptABC	Complexo streptavidina- biotina
TBS	Do inglês, <i>Tris-Buffered Saline</i> /Tampão salina Tris
TNM	Do inglês, <i>Tumor, Node, Metastasis</i> /Tumor, Linfonodo, Metástase – Sistema de Classificação de Tumores Malignos
UnB	Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. CÂNCER DE MAMA	01
1.1.1. FATORES DE RISCO	01
1.1.2. DETECÇÃO PRECOCE E DIAGNÓSTICO	02
1.1.3. FATORES PROGNÓSTICOS E FATORES PREDITIVOS	03
1.1.4. TRATAMENTO	04
1.1.5. BIÓPSIA LÍQUIDA.....	05
1.2. METÁSTASES E CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES (CTCs).....	05
1.3. ENRIQUECIMENTO E DETECÇÃO DE CTCS.....	07
1.3.1. ENRIQUECIMENTO DE CTCS.....	07
1.3.2. DETECÇÃO DE CTCS	09
1.4. CITOCENTRIFUGAÇÃO	10
1.5. <i>CELL BLOCK</i>	11
1.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA E IMUNOCITOQUÍMICA	13
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. OBJETIVO GERAL	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4. METODOLOGIA.....	17
4.1. AMOSTRAS.....	17
4.1.1. CÉLULAS MCF-7 E BT474	17
4.1.2. PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.....	17
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.2.1. CONTAGEM DE CÉLULAS MCF-7 E BT474.....	18
4.2.2. COLETA DE SANGUE	18
4.2.3. HEMÓLISE DAS AMOSTRAS.....	18
4.2.4. CITOCENTRIFUGAÇÃO.....	19
4.2.4.1. COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE PAPANICOLAOU	19
4.2.5. <i>CELL BLOCK</i> PELO MÉTODO PLASMA-TROMBOPLASTINA	20

4.2.5.1. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA	21
4.2.6. IMUNOCITOQUÍMICA	21
5. RESULTADOS	24
5.1. RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM MCF-7	24
5.2. RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM BT474.....	32
5.3. RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS EM AMOSTRAS DE PACIENTES.	34
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES.....	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
APÊNDICES	52
ANEXOS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER DE MAMA

Ao desconsiderarmos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais frequente no mundo e a primeira entre as mulheres. Para o biênio 2018-2019 o INCA estimou para o Brasil, o surgimento de 600 mil casos de câncer para cada ano, sendo 59.700 casos somente de câncer de mama, correspondendo a 29,5% de todos os tipos de câncer diagnosticados em mulheres (BRASIL, 2018).

Os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, mais desenvolvidos e industrializados, apresentam as maiores incidências da doença. Já o Distrito Federal, com 1.020 casos previstos por ano para 2018-2019, aparece em 11º lugar em relação aos demais estados (BRASIL, 2018).

Enquanto em países desenvolvidos como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Holanda, Dinamarca e Noruega, observa-se uma redução das mortes como resultado da detecção precoce e da oferta de tratamento adequado, no Brasil as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, principalmente porque a doença é diagnosticada em estágios avançados (BRASIL, 2004; SILVA et al. 2014). Segundo dados do DATASUS, no ano de 2015 ocorreram 15.403 óbitos por câncer de mama no país (BRASIL 2017 apud BRASIL 2018).

1.1.1. FATORES DE RISCO

Múltiplos fatores estão relacionados com o surgimento do câncer de mama e a evolução da doença, dentre eles sexo feminino, idade avançada, história familiar, alta densidade do tecido mamário, sedentarismo, obesidade, envelhecimento, exposição à radiação ionizante, consumo de álcool e terapias de reposição hormonal (BADOWSKA-KOZAKIEWICZ & BUDZIK, 2016; COLDITZ et al., 2014; MAIA et al., 2016).

Além disso, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher – menarca precoce, idade tardia da primeira gestação, menor ou nenhum período de amamentação e menopausa tardia - contribuíram nos últimos anos para o aumento da incidência do câncer de mama (MAIA et al., 2016; HOWELL et al., 2014).

Sexo e idade são considerados os fatores de risco mais importantes no câncer de mama (BATISTIN et al., 2011). Embora em raros casos acometa homens – 1% do total de pacientes -, ocorre com maior frequência em mulheres pós-menopausa, reforçando a participação dos hormônios femininos na etiologia da doença (BRASIL2, 2018; BRASIL1, 2015, MENDONÇA et al., 2004, SALLES et al., 2009).

Entre 5 e 10% de todos os casos de câncer de mama estão relacionados à herança de mutações genéticas, tendo como característica a ocorrência da doença em mulheres jovens (AMENDOLA & ROBERTO, 2005). Nestes casos, geralmente o câncer é mais agressivo e apresenta uma alta taxa de mutação dos genes BRCA1 e BRCA2, além da superexpressão do gene do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano - HER2 (BRASIL1, 2015).

Embora não haja estratégias específicas de prevenção do câncer de mama, alguns fatores de risco de caráter ambiental e comportamental podem ser minimizados, como o sedentarismo e a obesidade com a prática de atividades físicas e uma alimentação equilibrada, a redução do consumo de álcool e a utilização de equipamentos de proteção individual adequados diante da radiação ionizante e de inseticidas organoclorados (BRASIL, 2004; PAIVA et al., 200; SILVA &, RIUL, 2011; BRASIL1, 2015).

1.1.2. DETECÇÃO PRECOCE E DIAGNÓSTICO

A detecção precoce do câncer em indivíduos sintomáticos e o rastreamento em indivíduos assintomáticos, permitem um melhor prognóstico e uma menor morbidade associada ao tratamento (BRASIL, 2015).

Em sua fase inicial, o diagnóstico da doença pode ser realizado pelo emprego de métodos isolados ou combinados como mamografia, ultrassonografia, exame clínico das mamas e o incentivo ao autoexame (MARQUES et al., 2015).

Segundo documento do Ministério da Saúde de Consenso do Câncer de Mama, recomenda-se o rastreamento anual, através do exame clínico da mama, em todas as mulheres a partir dos 40 anos; o rastreamento por mamografia em mulheres com idade entre 50 a 69 anos e o exame clínico da mama e mamografia anual, a partir dos 35 anos, nas mulheres pertencentes a grupos populacionais com risco elevado de desenvolver câncer (BRASIL, 2004).

Já a confirmação do diagnóstico pode ser dada por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), utilizando-se da punção aspirativa por agulha grossa (PAG) ou através de biópsia cirúrgica convencional (BRASIL, 2004).

1.1.3. FATORES PROGNÓSTICOS E FATORES PREDITIVOS

O câncer de mama é considerado um câncer relativamente de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente (BRASIL, 2015). Assim, a aplicação do conhecimento sobre os fatores prognósticos - parâmetros possíveis de serem mensurados no momento do diagnóstico e que servem como preditores da sobrevivência do paciente - podem influir favoravelmente na condução do processo terapêutico (BUITRAGO et al., 2011; ABREU & KOIMAN, 2002).

Alguns fatores prognósticos exercem também um papel importante como fatores preditivos, permitindo o estabelecimento de terapias específicas para o tratamento do tumor podendo chegar até a uma individualização da conduta terapêutica (BUITRAGO et al., 2011).

Os fatores prognósticos considerados clássicos - tamanho do tumor, condição dos linfonodos axilares, tipo histológico e grau histológico - são os mais utilizados na prática clínica oncológica (ABREU & KOIMAN, 2002).

O estadiamento do câncer de mama é baseado na classificação dos Tumores Malignos, TNM, conforme as características do tumor primário, dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza e na presença ou ausência de metástases à distância, conforme anexos 1 e 2 (BRASIL, 2004).

O grau histológico combinado de Nottingham - que inclui percentual de diferenciação tubular, avaliação do pleomorfismo nuclear e índice mitótico - reflete o potencial de malignidade do tumor indicando sua maior ou menor capacidade de metastatização (BRASIL, 2004; ABREU & KOIMAN, 2002).

No cenário clínico, o câncer de mama é classificado em quatro subtipos moleculares diferentes - luminal A, luminal B, triplo negativo e de superexpressão de HER2 - com base na detecção imuno-histoquímica da expressão de receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e anticorpo monoclonal MIB1, que reconhece o Ki-67, conforme anexo 3 (CHEUK et al., 2017; LAWET et al., 2017, CIRQUEIRA et al., 2011).

A capacidade de classificar o câncer de mama de acordo com a expressão de receptores hormonais abriu o caminho para terapias direcionadas contra esses receptores (BUDD et al., 2006). A expressão do RE é o mais importante biomarcador no câncer de mama, pois fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino, enquanto a expressão do RP é fortemente dependente da presença de RE. Já a expressão de HER2, é associada à maior agressividade biológica do tumor e à resistência a alguns tipos de tratamento, embora o anticorpo monoclonal Herceptina (trastuzumabe) tenha se mostrado eficaz no tratamento do câncer de mama com superexpressão de HER2, especialmente combinado com quimioterapia (BUIRAGO et al., 2011; SLAMON et al., 2001; ACETO et al., 2012).

1.1.4. TRATAMENTO

Várias opções de tratamento são adotadas para pacientes com câncer de mama nos diferentes estágios da doença (CHEUK et al., 2017). A abordagem terapêutica envolve a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e a hormonioterapia, sendo normalmente preconizadas duas ou mais abordagens associadas, visando uma melhor qualidade de vida pós-tratamento (BERGMANNA et al., 2000).

As cirurgias, que consistem em tratamento definitivo para a doença, depende do estadiamento clínico e do tipo histológico do tumor, podendo ser conservadoras - com ressecção de um segmento da mama e retirada dos gânglios axilares ou linfonodo sentinela - ou não conservadoras, como a mastectomia total (CHEUK et al., 2017, BRASIL, 2004). Em alguns casos, após a cirurgia, são prescritos tratamentos adjuvantes, como terapia de radiação, quimioterapia, terapia direcionada e terapia hormonal a fim de reduzir a recorrência da doença e metástases à distância (CHEUK et al., 2017).

A quimioterapia e a hormonioterapia são tratamentos antineoplásicos sistêmicos cuja aplicação, quando iniciada logo após o tratamento do tumor primário, cirurgia ou radioterapia, tem por finalidade destruir os possíveis focos de micrometástases existentes. Já a quimioterapia neo-adjuvantes - antes do tratamento principal - possibilita redução do volume tumoral e, nos casos de resposta favorável, uma abordagem cirúrgica com maiores possibilidades de controle loco-regional da doença e consequente aumento das chances de cura (ABREU & KOIMAN, 2002; BRASIL, 2004).

1.1.5. BIÓPSIA LÍQUIDA

A detecção das células tumorais presentes no sangue de pacientes com câncer, também denominadas de “biópsia líquida”, embora não seja capaz de substituir a biópsia convencional para o diagnóstico inicial do câncer, oferece um meio acessível de estudar células metastáticas ao longo do curso da doença (POWELL et al., 2012).

Diferentemente das biópsias de tecido cirúrgico e das punções aspirativas - que são procedimentos demorados, desconfortáveis e não podem ser utilizadas rotineiramente no monitoramento da doença residual -, as biópsias líquidas permitem decisões otimizadas e oportunas para a intervenção terapêutica, sendo bem aceitas por pacientes e médicos (POWELL et al., 2012; TSUJIURA et al., 2014; ZHE et al., 2011; RIETHDORF et al., 2007).

Sua natureza pouco invasiva permite uma amostragem rápida, econômica e repetida e possibilita sua utilização para o rastreamento e monitoramento do tratamento e progressão da doença (ZHE et al., 2011; LARREA et al., 2016).

1.2. METÁSTASES E CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES (CTCs)

Tumores são formados por células que perderam sua habilidade para montar e criar tecidos de forma e função normais. De acordo com o grau de agressividade de seu crescimento, os tumores podem ser denominados benignos, quando crescem localizados sem invasão a tecidos adjacentes, ou malignos, quando invadem tecidos próximos e espalham metástases (WEINBERG, 2008).

A invasividade implica na capacidade de desagregação, penetração na corrente sanguínea ou nos vasos linfáticos e formação de tumores secundários – as metástases - em outros locais do corpo (ALBERTS et al., 2004).

Para tanto, as células tumorais necessitam passar por diversas etapas até formarem novas colônias em locais distantes: (1) crescimento local do tumor, (2) disseminação de células a partir do tumor primário, (3) sobrevivência às forças mecânicas de cisalhamento, ao sistema imunológico e a outros mecanismos regulatórios na circulação e (4) captura de células tumorais na microcirculação de um órgão e extravasamento potencial no tecido circundante (MSAOUEL & KOUTSILIERIS, 2011; COUMANS et al., 2013).

Além disso, as células extravasadas podem: (5A) sobreviver como uma única célula latente, (5B) formar micrometástases ou (5C) crescer em uma macrometástase. Na figura 1 podem ser vistas as etapas da cascata metastática (COUMANS et al., 2013).

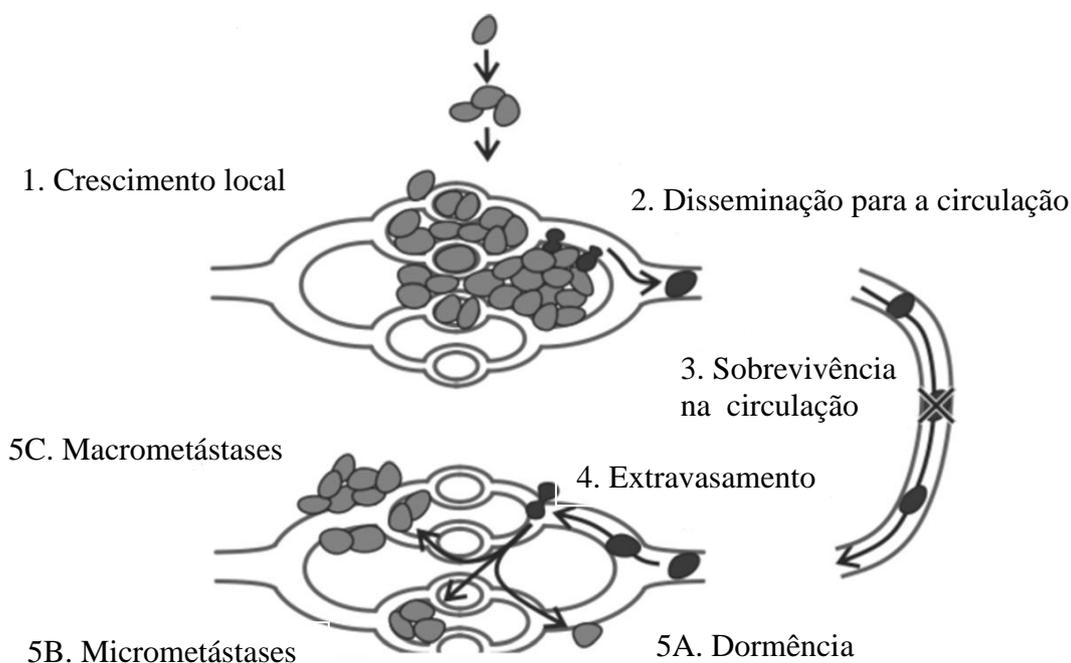


Figura 1- Cascata metastática (Adaptado de COUMANS et al., 2013)

As células tumorais circulantes (CTCs) são as células malignas originárias do tumor primário que se encontram na corrente sanguínea (LOWE et al., 2015). As CTCs representam um estágio intermediário na disseminação metastática e podem circular como células isoladas ou, menos frequentemente, agrupadas (AZEVEDO et al., 2015; ACETO et al., 2014; KREBS et al., 2014; HONG et al. 2016).

Algumas destas células tumorais sofrem, ainda no tumor primário, uma transição epitelial-mesenquimal (EMT), que é caracterizada pela diminuição da expressão dos marcadores epeliais, tais como EpCAM e E-caderina e pela aquisição de características mesenquimatosas invasivas (expressão de N-caderina e fatores de transcrição *slug* e *snail*), o que lhes permite viajar para o local da formação de metástases sem serem afetadas pelos tratamentos convencionais (WEINBERG, 2008; TSUJIURA et al., 2014, SAMATOV et al., 2013; AKTAS et al., 2009).

Todavia, a maioria das CTCs morre na circulação, provavelmente por uma combinação de estresse físico, estresse oxidativo e falta de fatores de crescimento e

citocinas (MICALIZZI et al., 2017). Os agrupamentos de células apresentam maior poder metastático e uma meia-vida mais curta na circulação, de 6-10 min, enquanto células individuais sobrevivem por 25-30 min (ACETO et al., 2014; KREBS et al., 2014; HONG et al. 2016).

A principal dificuldade para isolar e caracterizar CTCs é a sua baixa concentração em relação aos outros tipos de células no sangue periférico. Em pacientes com câncer sólido avançado, as CTC geralmente ocorrem em concentrações muito baixas, cerca de ~ 1 CTC por dez milhões de leucócitos em um total de 7,5 mL de amostra de sangue (CABEL et al., 2017; FERREIRA et al., 2016; ALIX-PANABIERES & PANTEL, 2014).

Sua detecção e enumeração antes ou durante o diagnóstico do tumor primário permite estimar a probabilidade da presença de metástases à distância e assim identificar pacientes que se beneficiarão de terapia adjuvante mais intensiva após a remoção cirúrgica da lesão primária (COUMANS et al., 2013).

As pesquisas sobre CTCs incluem ainda a estimativa do risco de recidiva metastática ou progressão metastática (informação prognóstica), a estratificação e o monitoramento em tempo real de terapias e a identificação de alvos terapêuticos e mecanismos de resistência (ALIX-PANABIERES & PANTEL, 2013).

1.3. ENRIQUECIMENTO E DETECÇÃO DE CTCS

Os recentes avanços tecnológicos possibilitaram o desenvolvimento de uma variedade de metodologias para a captura de CTCs (LOWE et al., 2015). Assim, a identificação dessas células é realizada por meio de diferentes técnicas que são tipicamente usadas em combinação com procedimentos de enriquecimento para aumentar a taxa de sucesso de isolamento específico (ZHE et al., 2011; ALUNNI-FABBRONI & SANDRI, 2010), obtendo células viáveis e intactas com elevada pureza a partir do vasto número de células sanguíneas circundantes (YU et al., 2011).

1.3.1. ENRIQUECIMENTO DE CTCS

As técnicas de enriquecimento têm como base as propriedades físicas e as características antigênicas que distinguem as CTCs das células sanguíneas normais, conforme apresentado na Tabela 1 (ZHE et al., 2011).

Com base na sua menor densidade em relação à maioria das células sanguíneas (<1,077 g/mL), as CTCs podem ser enriquecidas através de centrifugação em gradiente utilizando um meio iso-osmótico como LymphoPrepTM, Ficoll-HyPaqueTM e Oncoquick[®] (TJENSVOLL et al., 2013; ALUNNI-FABBRONI & SANDRI, 2010). No entanto, apesar de ser uma técnica fácil e econômica, tem baixa recuperação de CTCs e baixa especificidade, já que outras células mononucleares de baixa densidade - como monócitos, linfócitos e plaquetas – estão nas mesmas camadas que as CTCs (ZHE et al., 2011).

Tabela 1 - Métodos para enriquecimento de CTCs baseados nas propriedades físicas e antigênicas das células tumorais circulantes.

MÉTODOS PARA ENRIQUECIMENTO	
(i) Baseados nas propriedades físicas	a) Menor densidade <i>Exemplos: LymphoPrepTM, Ficoll-HypaqueTM, OncoQuick^{®2V}</i>
	b) Maior tamanho <i>Exemplos: ISET[®], Screen Cell[®] ZHE et al., 2011</i>
(ii) Baseados em anticorpos	a) Marcadores epiteliais * Plataformas magnéticas <i>Exemplos: MACS, Dynabeads, CellSearch[®], MagSweeper, EasySep[®] ZHE et al., 2011, TJENSVOLL et al., 2013</i>
	* Plataformas microflúidicas <i>Exemplos: CTC-chip, HB-chip, HTMSU, Nano-Velcro[®] ZHE et al., 2011, TJENSVOLL et al., 2013</i>

Um outro método de enriquecimento utilizado leva em consideração o pequeno diâmetro da maioria das células sanguíneas, que é de 8 a 11 µm.. Assim, a utilização de uma membrana de policarbonato com 8 µm permite que as CTCs sejam retidas no filtro, tendo em vista que são geralmente maiores do que os leucócitos de sangue periférico. ISET[®] e ScreenCell[®] são exemplos de métodos que utilizam a filtração para o isolamento das CTCs (TJENSVOLL et al., 2013; ZHE et al., 2011). No entanto é uma técnica considerada pouco sensível e pouco específica uma vez que leucócitos grandes podem ser presos pelo filtro, contaminando a fração de CTCs, e células tumorais pequenas podem passar através dos poros e esgotar a população de CTCs (ALUNNI-FABBRONI & SANDRI, 2010).

Com o objetivo de alcançar um enriquecimento mais específico, foram desenvolvidas técnicas de captura imunológica com o emprego de anticorpos. Esses podem tanto reconhecer um antígeno que esteja presente na célula tumoral, situação denominada “seleção positiva”, quanto reconhecer e separar células com antígenos que sejam encontrados em células normais, chamada de “seleção negativa”.

Alguns dos antígenos mais utilizados são os que apontam marcadores epiteliais como citoqueratinas (CKs) e EpCAM - para seleção positiva - e marcadores de células hematopoiéticas como o CD45 (antígeno de superfície específico de leucócitos) - para seleção negativa (TJENSVOLL et al., 2013; ZHE et al., 2011; ALUNNI-FABBRONI & SANDRI, 2010).

Nessa abordagem, os anticorpos são imobilizados num suporte sólido, através de microesferas magnéticas ou no interior de células microfluídicas. Os sistemas MACS, EasySep, Dynabeads e Cell Search[®] utilizam plataformas imunomagnéticas enquanto os sistemas CTC-chip, HB-chip, HTMSU e Nano-Velcro utilizam plataformas microfluídicas (TJENSVOLL et al., 2013, ZHE et al., 2011).

Apesar de os métodos de enriquecimento baseados em anticorpos serem mais específicos, há vários desafios associados a esta estratégia como a expressão heterogênea e a desregulação de EpCAM em algumas CTCs, apresentando falsos negativos, e a expressão de antígenos tumorais na superfície de células normais no sangue, levando a falsos positivos (TJENSVOLL et al., 2013, ALUNNI-FABBRONI & SANDRI, 2010).

1.3.2. DETECÇÃO DE CTCs

As técnicas de detecção de células tumorais circulantes são essencialmente construídas em abordagens baseadas em anticorpos e em ácidos nucleicos, conforme tabela 2 (ZHE et al., 2011).

Para a detecção de CTCs baseada em anticorpos, são utilizados anticorpos contra antígenos epiteliais específicos (como EpCAM e CKs), antígenos específicos de tecido (como PSA no câncer de próstata) ou antígenos associados a tumores (como hMAM no câncer de mama e CEA no câncer de cólon). Neste método, utilizam-se geralmente reações enzimáticas ou de fluorescência para visualização colorimétrica das células de interesse. Uma vez que antígenos específicos não são identificados na maioria dos cânceres, as técnicas baseadas em anticorpos geralmente têm baixa especificidade (ZHE

et al., 2011). Alguns exemplos deste método são citometria de fluxo, imuno-histoquímica, FISH, LSC[®], FAST, EPISTOP e Cytotrack (ZHE et al., 2011; TJENSVOLL et al., 2013).

Tabela 2 - Métodos para detecção de CTCs baseados na ligação com anticorpos e na ligação com ácidos nucleicos.

MÉTODOS PARA DETECÇÃO	
(i) Ligação com anticorpos	<i>Exemplos: FISH, Citometria de fluxo, Imuno-histoquímica, LSC[®], FAST, EPISPOT, Cytotrack^{2V}, ZHE et al., 2011</i>
(ii) Ligação com ácidos nucleicos	<i>Exemplos: RT-PCR, RT-qPCR^{2V}, ZHE et al., 2011</i>

Já a detecção de CTCs baseada em ácidos nucleicos explora a expressão de mRNAs epiteliais específicos. (TJENSVOLL et al., 2013). Apesar da reação em cadeia da polimerase (PCR) também ser utilizada na detecção de CTCs, o mRNA mais instável - que é rapidamente degradado no sangue - é atualmente considerado como melhor alvo para a detecção de CTCs utilizando os métodos de RT-PCR de transcrição reversa ou qRT-PCR em tempo real (ZHE et al., 2011). No entanto, estes métodos possuem a desvantagem da necessidade de lise celular, impedindo a análise morfológica e a enumeração de CTCs, bem como posterior cultivo das CTCs (ZHE et al., 2011).

1.4. CITOCENTRIFUGAÇÃO

Consiste em um método de centrifugação de células em suspensão e consequente deposição sobre uma lâmina de vidro, em uma área de 5 mm de diâmetro (BRASIL, 2009; JORGE & CASTRO, 2000).

A amostra é colocada dentro da centrífuga (*Citospin*) em um suporte para a lâmina contendo um funil plástico. Previamente, entre a lâmina e o suporte é colocado um molde espesso de papel de filtro perfurado na área que as células serão depositadas (JORGE & CASTRO, 2000). Após centrifugação, as lâminas são fixadas em etanol e podem ser submetidas a diferentes colorações e à imunocitoquímica.

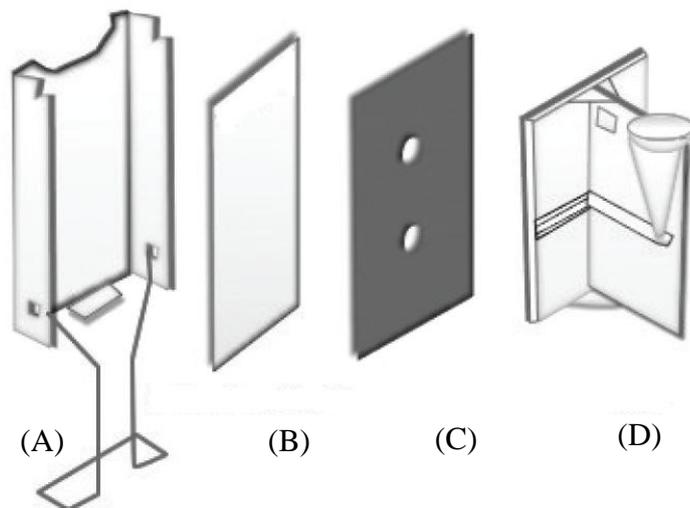


Figura 2 – Materiais utilizados na citocentrifugação- Cito clipe (A), Lâmina de vidro (B), Papel absorvente (C) e Citofunil (D) (Adaptado de BRASIL, 2009)

1.5. CELL BLOCK

O bloco celular (*cell block*) tem sido utilizado como um adjuvante útil na citologia convencional, sendo empregado em citodiagnóstico de amostra líquida ou sólida, quando há dificuldade para definir diagnóstico de tumores pouco diferenciados (SHUKLA et al., 2015; BRASIL, 2009)

A técnica de *cell block* consiste na concentração de células em um campo limitado sem perda celular formando estruturas sólidas, que podem ser cortadas em seções finas para histologia, histoquímica e imuno-histoquímica (KULKARNI et al., 2009; MAYALL et al., 1997).



Figura 3 - Blocos de células feitos a partir de amostras do Laboratório de Anatomia Patológica/UnB (cedidos pela prof^a Fabiana Pirani Carneiro)

Embora não seja um método de enriquecimento de CTCs, o *cell block* fornece informações adicionais que são essenciais para resolver os dilemas diagnósticos (SHUKLA et al., 2015). Tradicionalmente, as células são precipitadas e concentradas por centrifugação e os blocos de células podem ser preparados por diferentes métodos entre eles com agarose ou plasma-trombina/tromboplastina (JING et al., 2013).

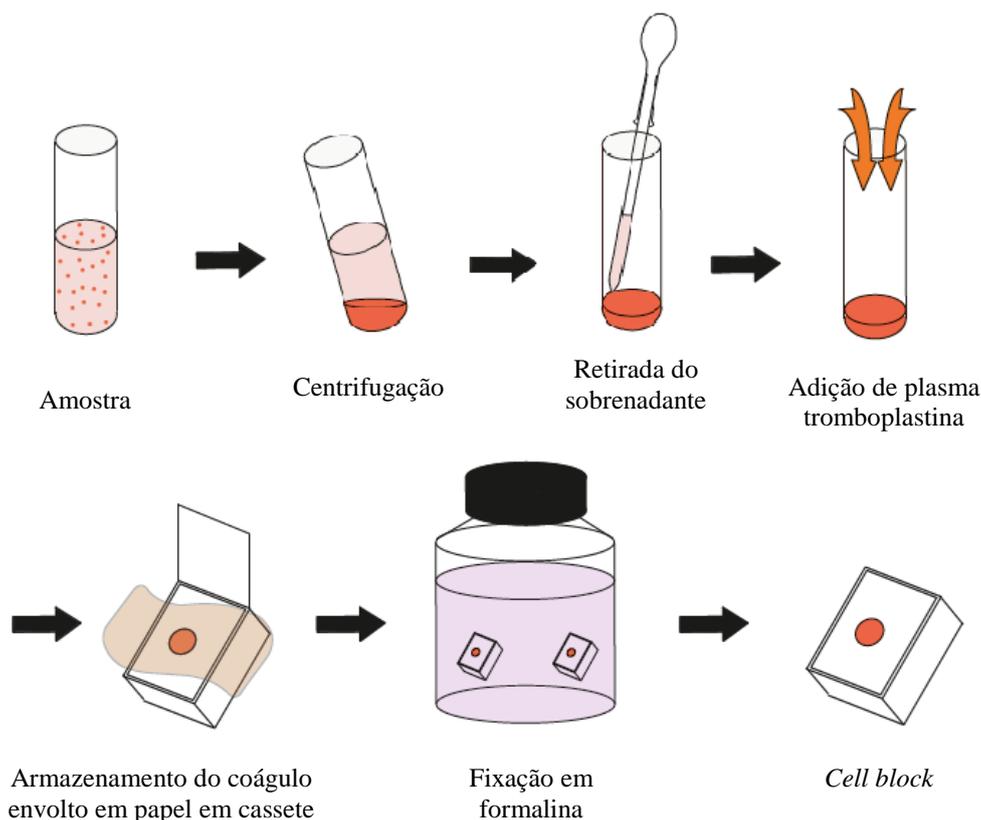


Figura 4 – Técnica de *cell block* (Adaptado de MICHAEL & DAVIDSON, 2016).

Dentre as vantagens de sua utilização estão a fácil execução, o baixo custo dos reagentes, o processamento de quantidades pequenas de material celular e a possibilidade de preservação de amostras para estudos futuros (KAKODKAR et al., 2016; FETSCH et al., 2002).

Segundo JING et al. (2013), o método plasma-tromboplastina/trombina é mais simples e rápido ao ser comparado com o método com ágar, podendo ser realizado à temperatura ambiente e não havendo a necessidade de ser convertido em meio líquido.

Este método consiste na formação de coágulo adicionando plasma e trombina/tromboplastina ao precipitado do centrifugado. Em seguida, o coágulo formado é transferido para papel de filtro, acondicionado em cassete, fixado em

formalina 4% e submetido a processamento histológico habitual (CASTRO et al., 2016).

1.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA E IMUNOCITOQUÍMICA

A imuno-histoquímica é uma técnica utilizada na identificação e detecção de CTCs que se baseia na reação antígeno-anticorpo para a detecção e caracterização de moléculas no seu local de origem.

Embora o termo imuno-histoquímica esteja associado a metodologias que usam imuno-ensaios para co-localizar epítomos de interesse em cortes de tecido, ela pode ser feita também a partir de blocos de células ou de coágulos preparados a partir de materiais citológicos e hematológicos (BORGES-FERRO, 2016).

Já a imunocitoquímica, embora tenha os mesmos princípios da imuno-histoquímica, se diferencia pelo fato de o epítomo de interesse ser encontrado não em tecidos, mas em esfregaços citológicos, preparações citocentrifugadas (ex: *Cytospin*TM) ou preparações em monocamada, (ex: *Thinprep*[®]) (BORGES-FERRO, 2016).

A técnica de imuno-histoquímica/imunocitoquímica consiste na detecção de um antígeno nos cortes de tecido histológico (ou em células em suspensão) através do uso de um anticorpo específico para esse antígeno ligado a uma enzima (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Após a ligação antígeno-anticorpo, a enzima converte um substrato incolor em uma substância insolúvel colorida que se precipita no local onde o anticorpo e o antígeno estão localizados, permitindo a visualização do resultado em microscopia óptica ou fluorescente (ABBAS & LICHTMAN, 2005; RAMOS-VARA, 2005). Esta técnica é denominada método direto, o qual é simples e econômico, porém apresenta a limitação de gerar pouca amplificação do sinal, tendo em vista que cada anticorpo é conjugado com apenas uma enzima (HAINES & CHELACK, 1991).

A sensibilidade de uma reação imune depende principalmente do sistema de detecção a ser utilizado, por isso a seleção do método mais adequado se torna essencial (RAMOS-VARA, 2005). Os principais métodos de detecção utilizados na imuno-histoquímica são: método direto, métodos indiretos, métodos de avidina-biotina e métodos de polímeros (BORGES-FERRO, 2016).

Já os métodos de imunocoloração indireta utilizam um segundo anticorpo conjugado com enzima para detectar a ligação do anticorpo primário à seção de tecido. Esses métodos, embora mais complexos e demorados, apresentam como vantagem o

aumento da sensibilidade da detecção do antígeno, uma vez que vários anticorpos secundários se ligam a cada anticorpo primário, intensificando o sinal visível produzido pela ligação antígeno-anticorpo.

Dentre os métodos indiretos mais conhecidos estão o método indireto simples, o método peroxidase anti peroxidase (PAP) e o método APAAP - *Alkaline phosphatase anti Alkaline phosphatase* (HAINES & CHELACK, 1991; BORGES-FERRO, 2016).

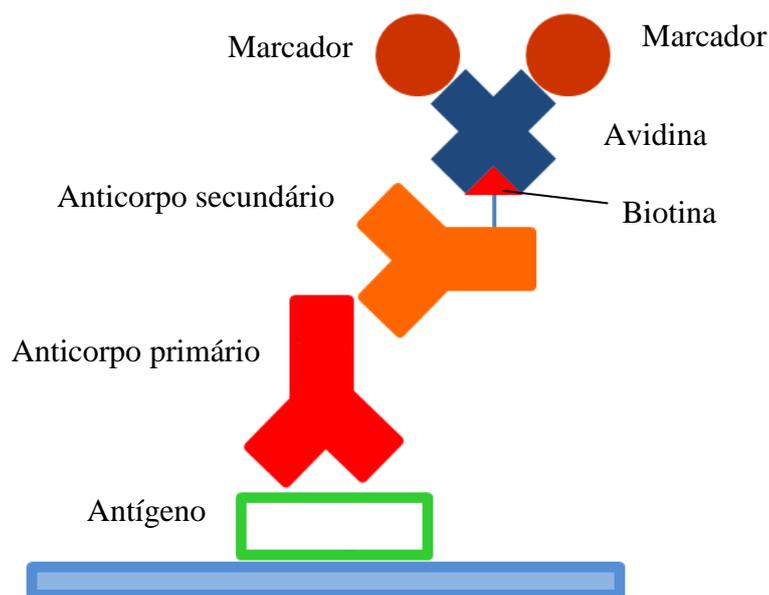


Figura 5 – Método *Labelled streptavidin-biotin* (Adaptado de BORGES-FERRO, 2016).

Os métodos de avidina-biotina se utilizam da afinidade entre a biotina e a avidina, que se ligam espontaneamente formando um complexo indissociável. Além disso, a molécula de biotina pode ser ligada a enzimas e anticorpos e a molécula de avidina pode ser marcada com substâncias como enzimas, metais pesados ou fluorocromos. Assim, nestes métodos utiliza-se o anticorpo secundário biotilado e a avidina marcada com o fluorocromo.

Os métodos de avidina-biotina possuem a vantagem de serem bastante sensíveis, permitindo a diminuição do “fundo” pelo aumento da diluição dos anticorpos primários, além de ser uma técnica mais rápida devido ao menor tempo de incubação. As técnicas mais conhecidas são a *streptavidin-biotin complex* (streptABC) e a *labelled streptavidin-biotin* (LSAB) (BORGES-FERRO, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

A detecção de células tumorais circulantes no sangue periférico oferece várias vantagens sobre a análise da medula óssea cujo procedimento de obtenção é invasivo, doloroso e não é bem aceito por pacientes com tumores sólidos (MOLNAR et al., 2001; ZHE et al., 2011). A ideia de uma "biópsia líquida" obtida por extração regular de sangue é definitivamente mais atraente (ZHE et al., 2011). Atualmente existem várias técnicas para detecção e quantificação de CTCs, embora nem todas sejam econômicas e permitam a conservação da amostra para estudos futuros. O *cell block* é um método simples, rentável e prontamente adaptável em laboratórios hospitalares de rotina (KULKARNI et al., 2009). Segundo estudo comparativo entre três formas de preparações citológicas (citocentrifugação, ThinPrep e *cell block*), os blocos celulares foram a forma mais adequada de preparação de amostras quando se realizou imuno-histoquímica devido à facilidade de interpretação morfológica, mínima coloração de fundo e padrões de imunocoloração esperados (FETSCH et al., 2002). O método plasma-tromboplastina vem sendo muito utilizado na formação de blocos celulares, pois além de consumir menos tempo e não necessitar de nenhum equipamento especial ou treinamento, possui alta qualidade em termos de distribuição de células e de fundo, fácil preparação e adequada coloração imuno-histoquímica em comparação com outros três métodos de *cell block* (sedimentação de filtro invertido, método de albumina e sedimentação simples) (SHUKLA et al., 2015; NIGRO et al., 2007). Apesar de o bloco de células preparado pelo método plasma-tromboplastina/trombina ser considerado uma ferramenta diagnóstica complementar ao citocentrifugado e aplicável na rotina de laboratórios de Anatomia Patológica para a pesquisa de câncer (CASTRO et al., 2016), são escassos os estudos envolvendo *cell block* de amostras de sangue com a intenção de avaliar as CTCs desses pacientes (NAM et al., 2016). Portanto, propõe-se a utilização do *cell block* na análise de células tumorais circulantes presentes no sangue de pacientes com câncer de mama e em células tumorais das linhagens MCF-7 e BT474.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a detecção de células tumorais de câncer de mama no sangue periférico através do método plasma-tromboplastina no preparo de *cell block* no laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de detecção através do método de *cell block* por plasma-tromboplastina de células tumorais de câncer de mama em linhagens celulares e em amostras de pacientes diagnosticadas com a doença;
- Avaliar a quantidade, a taxa de recuperação e a preservação das células tumorais e a expressão de marcadores imunocitoquímicos no *cell block* preparado pelo método plasma-tromboplastina;
- Comparar o citocentrifugado e o *cell block* preparado pelo método plasma-tromboplastina para a pesquisa de células tumorais circulantes;
- Avaliar a viabilidade técnica do emprego do método plasma-tromboplastina na preparação de *cell block* com amostras de sangue de pacientes com câncer de mama.

4. METODOLOGIA

4.1. AMOSTRAS

O presente estudo foi realizado com células de câncer de mama das linhagens MCF-7 e BT474 e com sangue de pacientes com câncer de mama atendidas no Hospital Universitário de Brasília (UnB).

4.1.1. CÉLULAS MCF-7 e BT474

As linhagens de células de câncer de mama MCF-7 (HTB-22) e BT474 (HTB-20) foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina em atmosfera de 5% de CO₂, umidade de 95% e temperatura de 37°C. Ambas as linhagens são de origem epitelial, obtidas de tecido mamário de diferentes pacientes. A linhagem MCF-7 retém a expressão do receptor de estrógeno, entre outros marcadores. A linhagem BT474, foi derivada de um carcinoma ductal invasivo e mantém a expressão do receptor HER2.

4.1.2. PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

As pacientes incluídas no experimento foram aquelas com diagnóstico de carcinoma de mama em qualquer estadiamento e sem tratamento prévio, sendo excluídas as que já haviam realizado radioterapia, hormonioterapia, quimioterapia e cirurgia.

Atenderam aos critérios de inclusão um total de 31 pacientes do Ambulatório de Mastologia/HUB internadas na Enfermaria Cirúrgica/HUB, selecionadas no período de Janeiro a Dezembro de 2017.

As pacientes foram orientadas sobre a participação no projeto de pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (modelo no anexo 4). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número 34710214.9.0000.5558.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. CONTAGEM DE CÉLULAS MCF-7 E BT474

Após lavagem com solução PBS (apêndice A) as células foram incubadas com 1 mL de tripsina na concentração de 0,25% para a linhagem MCF-7 e 0,05% para a linhagem BT474, durante 5 minutos a 37° C. Em seguida, a tripsina foi neutralizada com 6 mL de meio de cultura completo e procedeu-se à contagem de células em câmara de Neubauer.

Para a linhagem MCF-7 foram feitas diluições a fim de se obter concentrações de 1.000, 2.500, 10.000, 25.000, 100.000 e 500.000 células por mL de meio. Já para as células BT474 foram feitas diluições para concentrações de 25.000, 100.000 e 500.000 células por mL de meio. Após contagem, as células foram resuspensas em PBS e adicionadas a 6 mL de sangue obtidos de doadores saudáveis.

4.2.2. COLETA DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA e armazenadas em temperatura de 2 a 8 °C por um período máximo de 24 h, sendo o volume mínimo de sangue coletado de 6 mL.

Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica/UnB, onde foram realizados os demais procedimentos.

4.2.3. HEMÓLISE DO SANGUE

Para minimizar possíveis interferências das hemácias e do anticoagulante EDTA contido no tubo de coleta, foi promovida a hemólise nas amostras de sangue com um tampão de hemólise hipotônico (apêndice B).

Após homogeneização do tubo de coleta, o volume de 6 mL de sangue foi colocado em tubo de centrifugação de 50 mL e foram acrescentados 24 mL de tampão de hemólise (4 vezes o volume da amostra). A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos sob agitação constante e então centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm na centrífuga refrigerada modelo 2-16KL (SIGMA[®], Osterode am Harz, Alemanha).

O sobrenadante foi descartado, deixando um volume final de 6 mL e repetiu-se o procedimento de hemólise como descrito. Por fim, o sobrenadante foi descartado, deixando um volume final de 500 µL.

4.2.4. CITOCESTRIFUGAÇÃO

Após a hemólise das amostras, foi realizada a citocentrifugação em duas lâminas, sendo posteriormente feita a coloração através do método de Papanicolaou em uma lâmina e a marcação imunocitoquímica com anticorpo Pan-CK na outra lâmina.

Para a citocentrifugação foram utilizados 100 µL da amostra, disposta no citofunil já encaixado na centrífuga, previamente acoplado ao citoclipe, à lâmina e ao papel absorvente. O mesmo procedimento foi adotado para uma segunda lâmina em outro citofunil. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 2 minutos na centrífuga modelo DCS-16 RV (PRESVAC[®], Buenos Aires, Argentina). Em seguida, as lâminas foram fixadas em álcool etílico 99% por no mínimo 24h.

4.2.4.1. COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE PAPANICOLAOU

Para a coloração, a lâmina citocentrifugada foi mergulhada na 1ª sequência de etanol (99%, 95%, 80%, 70% 50%), lavada em água corrente, corada em Hematoxilina de Harris (apêndice C) por 40 segundos e lavada novamente em água. Em seguida, a lâmina foi submetida à 2ª sequência de etanol (95%, 95%), foi corada com Orange-6 (apêndice D) por 30 segundos e foi submetida à 3ª sequência de álcool (95%, 95%).

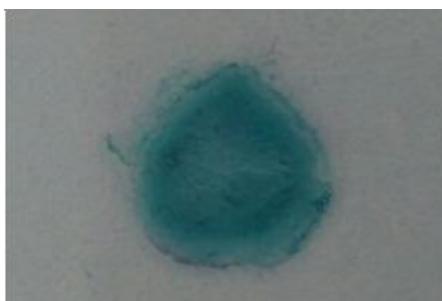


Figura 6- Lâmina corada pelo método de Papanicolaou – Lâmina preparada a partir do citocentrifugado e corada com Papanicolaou, sem uso de instrumentos ópticos.

Em seguida, a lâmina foi corada com EA-65 (apêndice E) por 1 minuto, foi submetida à 4ª sequência de álcool (95%, 100%, 100%, 100%, 100%, 100%) e à sequência de xilol (100%, 100%, 100%). Por último, procedeu-se à montagem da lamínula sobre a lâmina utilizando resina sintética.

4.2.5. *CELL BLOCK* PELO MÉTODO PLASMA-TROMBOPLASTINA

No *cell block* pelo método plasma-tromboplastina a formação de blocos de células ocorre após adição de plasma e tromboplastina ao precipitado. Esses blocos são então incluídos em parafina para serem seccionados e fixados em lâminas, que serão utilizadas na imunocitoquímica e na coloração hematoxilina-eosina.

Após a citocentrifugação das amostras, o volume restante no tubo de centrifugação, 300 µL, foi centrifugado a 2000 rpm por 2 minutos. Em seguida retirou-se o sobrenadante, deixando no tubo um volume de 35-60 µL. Adicionaram-se 100 µL de plasma no precipitado e a amostra foi homogeneizada por 1 minuto. Adicionaram-se 100 µL de tromboplastina (Stago[®], Asnières sur Seine, França) e foi repetido o processo de homogeneização por 1 minuto.

Após a formação do coágulo foram adicionados 2 mL de formaldeído a 4% para promover o deslocamento do coágulo do fundo do frasco e a fixação da amostra. O coágulo foi retirado do tubo, envolvido em papel manteiga e colocado em cassete dentro de um frasco contendo formaldeído, sendo ali mantido por no mínimo 24 h.

O *cell block* foi submetido a processamento histológico habitual, impregnado pela parafina e colocado em seguida em uma forma cúbica preenchida com parafina. Depois de seco, o bloco foi seccionado em cortes finos de 4-5 µm e esses cortes foram aderidos a lâminas silanizadas.

A Figura 1 apresenta as etapas do preparo do *cell block* pelo método plasma-tromboplastina: hemólise da amostra (A), formação do coágulo (B), coágulo no cassete (C) e bloco de parafina formado a partir do coágulo (D).

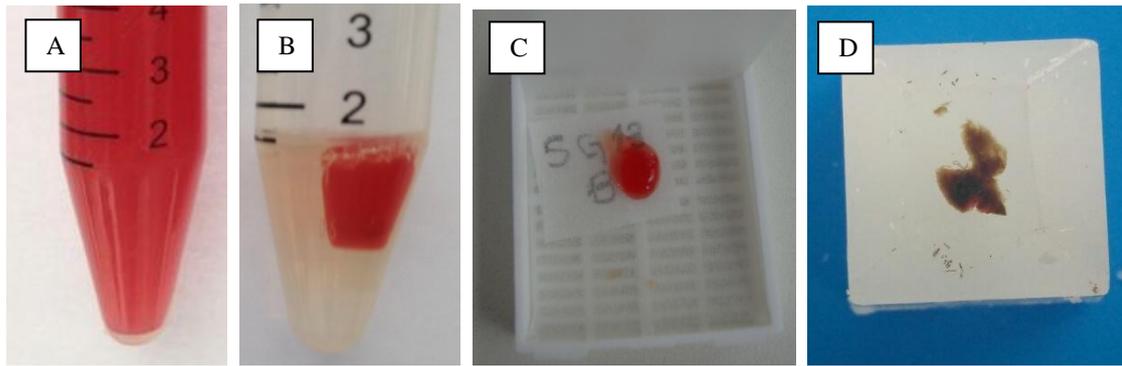


Figura 7 –Etapas do preparo do *cell block* pelo método plasma-tromboplastina - Hemólise da amostra de sangue (A), formação do coágulo com a adição de plasma e tromboplastina (B), coágulo envolto em papel manteiga no cassete (C) e bloco de parafina formado a partir do coágulo (D).

4.2.5.1. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

Para a coloração HE, a lâmina foi desparafinizada com xilol e hidratada com banhos em etanol (99%, 80%, 70% em sequência) e água. Em seguida, a lâmina foi mergulhada em Hematoxilina de Harris por 3 minutos, lavada em água corrente, mergulhada em eosina por 7 minutos e novamente lavada em água. Procedeu-se a desidratação com etanol (70%, 80%, 99%, 99% em sequência) e à diafanização com xilol. Por último, procedeu-se à montagem da lamínula sobre a lâmina utilizando resina sintética.

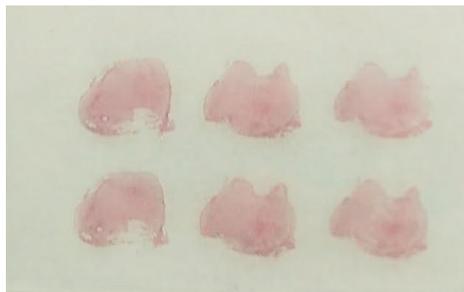


Figura 8- Lâmina corada com hematoxilina-eosina - Lâmina preparada a partir do *cell block* e corada com hematoxilina- eosina, sem uso de instrumentos ópticos.

4.2.6. IMUNOCITOQUÍMICA

Para as lâminas preparadas pelo método *cell block* o primeiro passo da imunocitoquímica foi a desparafinização em xilol e a hidratação em etanol (99,5%,

95%, 80% e 70% em sequência) e água enquanto para as preparadas por citocentrifugação, foi realizada apenas a hidratação em água. Em seguida, as lâminas feitas a partir do *cell block* foram colocadas em cubas contendo solução de recuperação com tampão citrato e tween 20 (apêndice F) dentro de um vaporizador previamente aquecido à 95°C, em temperatura controlada de 95° a 99°C. Após 20 min, a cuba contendo as lâminas foi retirada do vaporizador e foram adicionadas à cuba as lâminas preparadas por citocentrifugação, permanecendo a temperatura ambiente por 20 min. Após descanso, as mesmas foram lavadas sequencialmente em 10 cubas contendo água destilada.

Após desparafinização, hidratação e recuperação antigênica, foi feito o bloqueio de peroxidases endógenas através do mergulho das lâminas em cuba contendo água destilada e peróxido de hidrogênio na proporção 1:3 em 2 banhos de 15 min cada. Em seguida, as lâminas foram lavadas sequencialmente em 5 cubas contendo água destilada. O próximo passo foi a realização do bloqueio de proteínas inespecíficas com a utilização do bloqueador do kit REVEAL - Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience®, Califórnia, Estados Unidos). Aguardou-se 10 min e em seguida as lâminas foram lavadas sequencialmente em 5 cubas contendo água destilada.

A seguir, as lâminas foram mergulhadas em cubas contendo tampão de lavagem com TBS-tween 20 (0,1%), por 5 min (apêndice G), o excesso de tampão foi removido com o auxílio de papel toalha e procedeu-se a incubação com o anticorpo primário. Os anticorpos utilizados foram Pan-CK, para as lâminas obtidas por citocentrifugação, e Pan-CK, *Epithelial related antigen*, Claudin-4, receptor de estrógeno (RE) e GATA-3, para as demais lâminas obtidas do *cell block*, com diluição em albumina humana 1%, conforme tabela 3, em câmara úmida “*overnight*” (18 h) sob refrigeração (2 a 8 °C).

Tabela 3 – Anticorpos monoclonais utilizados na imunocitoquímica.

Anticorpo	Marca do anticorpo	Clone	Diluição	Controle
Citoqueratinas (Pan-CK)	DAKO	AE1/AE3	1:800	Pele
<i>Epithelial related antigen</i>	DAKO	MOC-31	1:200	Câncer de estômago
Claudin-4	NOVEX	3E2C1	1:200	Câncer de estômago
Receptor de estrógeno	ABCAM	6F11	1:300	Mama
GATA-3	CELL MARQUE	L50-823	1:300	Mama

As lâminas foram novamente mergulhadas em cubas contendo tampão de lavagem por 5 min, o excesso de tampão foi removido com o auxílio de papel toalha e foi feita a incubação com o anticorpo secundário biotilado do kit REVEAL - Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience[®], Califórnia, Estados Unidos) em câmara úmida à temperatura entre 18 a 22 °C por 20 minutos.

As lâminas foram mergulhadas em cubas contendo tampão de lavagem por 5 min, o excesso de tampão foi removido com o auxílio de papel toalha e foi feita a incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase do kit REVEAL - Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience[®], Califórnia, Estados Unidos) em câmara úmida à temperatura entre 18 a 22 °C por 20 minutos.

Após a incubação com estreptavidina-peroxidase, as lâminas foram mergulhadas em cubas contendo tampão de lavagem por 5 min, o excesso de tampão foi removido com o auxílio de papel toalha e adicionou-se o substrato cromogênico 3-4, diaminobenzidina - DAB - do kit REVEAL - Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience[®], Califórnia, Estados Unidos) com tampão de diluição próprio e aguardou-se ocorrer a revelação - marrom ou levemente turvado de marrom - em até 10 min. As lâminas foram então mergulhadas em água destilada em dois banhos de 2 minutos cada.

Em seguida, foi feita a contra-coloração com mergulho das lâminas em Hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavagem em água corrente, desidratação em etanol (70%, 80%, 99%, 99%, 99% sequencialmente) e diafanização em xilol. Por fim, foi feita a montagem da lamínula na lâmina em meio de montagem permanente.

5. RESULTADOS

5.1. RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM MCF-7

Nas amostras preparadas por centrifugação, e em concentrações de 1.000 a 500.000 células/7 mL, o número de células positivas para Pan-CK variou de 29,5 a 7.540 células. Já para as amostras preparadas por *cell block*, nas mesmas concentrações, a variação de células positivas foi de 7 a 983 para Pan-CK; 0,33 a 872 para *Epithelial related antigen*; 0 a 459 para GATA-3; 0 a 6 para RE e 0 a 710 para Claudin-4.

O aumento no número de células adicionadas (*spiked-in*) ao sangue normal foi acompanhado por um aumento de células positivas para Pan-CK, *Epithelial related antigen*, GATA-3 e Claudin-4 em amostras preparadas por citocentrifugação e *cell block*. Já a identificação de células com o anticorpo RE resultou em número reduzido de células positivas, mesmo quando as células tumorais foram adicionadas em quantidades maiores (figura 9, A).

Observou-se nas menores concentrações (1.000 a 10.000 células/7 ml) que o número de células positivas para Pan-CK foi maior que o número de células positivas para outros anticorpos. Por outro lado, em concentrações maiores (25.000 a 500.000), o número de células positivas para Pan-CK foi similar a dos outros marcadores (figura 9, B e C).

A recuperação de células após a realização da citocentrifugação e do *cell block* apresentou valores baixos, sendo a maior taxa de recuperação de 2,95% para as lâminas feitas por citocentrifugação na concentração de 142,86 células/mL com o anticorpo anti Pan-CK. Já a média de recuperação na citocentrifugação, para concentrações de 1.000 a 500.000 células/7 mL, o que equivale ao intervalo de 143 a 71.429 células/mL, foi de 1,5%. Além disso, observou-se que o aumento da concentração não ocasionou aumento da taxa de recuperação de células.

A tabela 4 apresenta o n de células na linhagem MCF-7 identificadas por imunocitoquímica. Considerando que as amostras para esta linhagem foram preparadas em triplicata biológica, para o cálculo de n obteve-se a média do número de células nas amostras avaliáveis. A tabela completa contendo a contagem de células da linhagem MCF-7 pode ser visualizada no Apêndice H.

Tabela 4- Quantificação de células tumorais da linhagem MCF-7 identificadas por imunocitoquímica.

<i>Ci</i>	Ci/mL	Pan-CK (CITO)		Pan-CK		<i>Epithelial related antigen</i>		GATA-3		RE		Claudin-4	
		<i>n</i>	RC/ml (%)	<i>n</i>	RC/ml (%)	<i>n</i>	RC/ml (%)	<i>n</i>	RC/ml (%)	<i>n</i>	RC/ml (%)	<i>n</i>	RC/ml (%)
1.000	142,86	29,5	4,21 (2,95%)	7	1 (0,70%)	0,33	0,05 (0,03%)	0	0	0	0	0	0
2.500	357,14	54	7,71 (2,16%)	7,33	1,05 (0,29%)	5,33	0,76 (0,21%)	1,66	0,24 (0,07%)	0	0	2,66	0,38 (0,11%)
10.000	1428,57	103,5	14,79 (1,04%)	16,66	2,38 (0,17%)	6	0,86 (0,06%)	2,66	0,38 (0,03%)	0	0,14 (0%)	8,66	1,24 (0,09%)
25.000	3571,43	225,5	32,21 (0,90%)	36	5,14 (0,14%)	19	2,71 (0,08%)	23	3,29 (0,09%)	1	0	21	3 (0,08%)
100.000	14285,71	452	64,57 (0,45%)	166,5	23,79 (0,17%)	126,5	18,07 (0,13%)	108,5	15,50 (0,11%)	2,5	0,36 (0%)	71	10,14 (0,07%)
500.000	71428,57	7.540	1077,14 (1,51%)	983	140,43 (0,20%)	872	124,57 (0,17%)	459	65,57 (0,09%)	6	0,86 (0%)	710	101,43 (0,14%)

Pan-CK (CITO) - anticorpo Pan-CK utilizado em células citocentrifugadas

Ci - concentração inicial (número de células colocadas inicialmente)

n - número de células contadas

RC - recuperação celular.

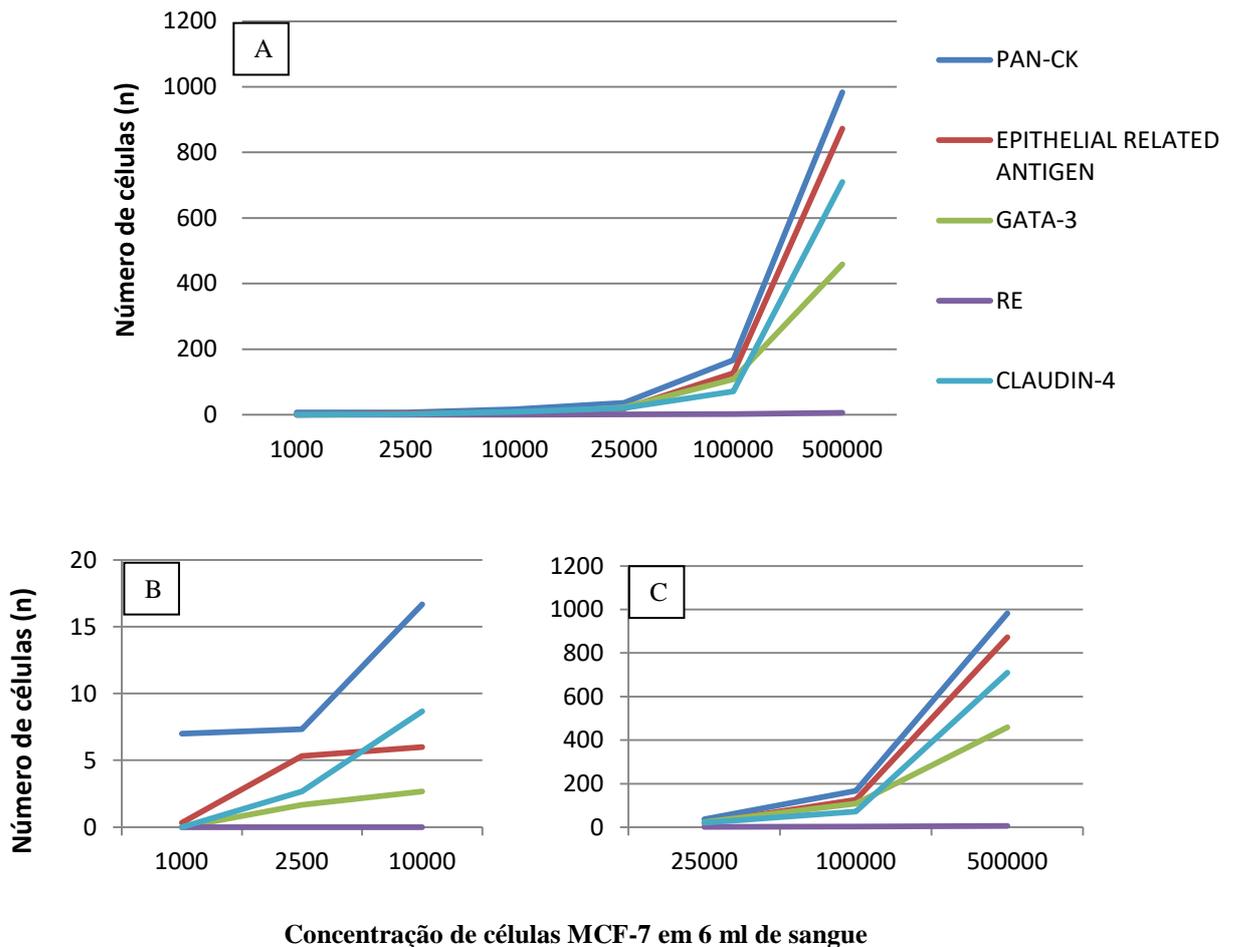


Figura 9- Número de células MCF-7 em *cell block* e identificadas com os respectivos anticorpos, quando o número de células adicionadas inicialmente foi de 1.000, 2.500, 10.000, 25.000, 100.000 e 500.000 células por 6 mL de sangue - Em A, expressão de Pan-CK, *Epithelial related antigen*, GATA-3, RE e Claudin-4 nas concentrações de 1.000 a 500.000 células/6 mL de sangue. Em B, os mesmos anticorpos nas quantidades de 1.000 a 10.000 células iniciais e em C de 25.000 a 500.000 células iniciais.

Na figura 10 observa-se o quantitativo de células positivas para Pan-CK em amostras preparadas por citocentrifugação e por *cell block*. Para quantidades de 1.000 a 10.000 (A) e 100.000 e 500.000 (B) células, a técnica de citocentrifugação se mostrou mais eficaz. Já para o intervalo de 25.000 a 100.000 (B), a diferença no número de células marcadas é menor, tornando os dois métodos de identificação de células tumorais em líquido equivalentes nessas condições.

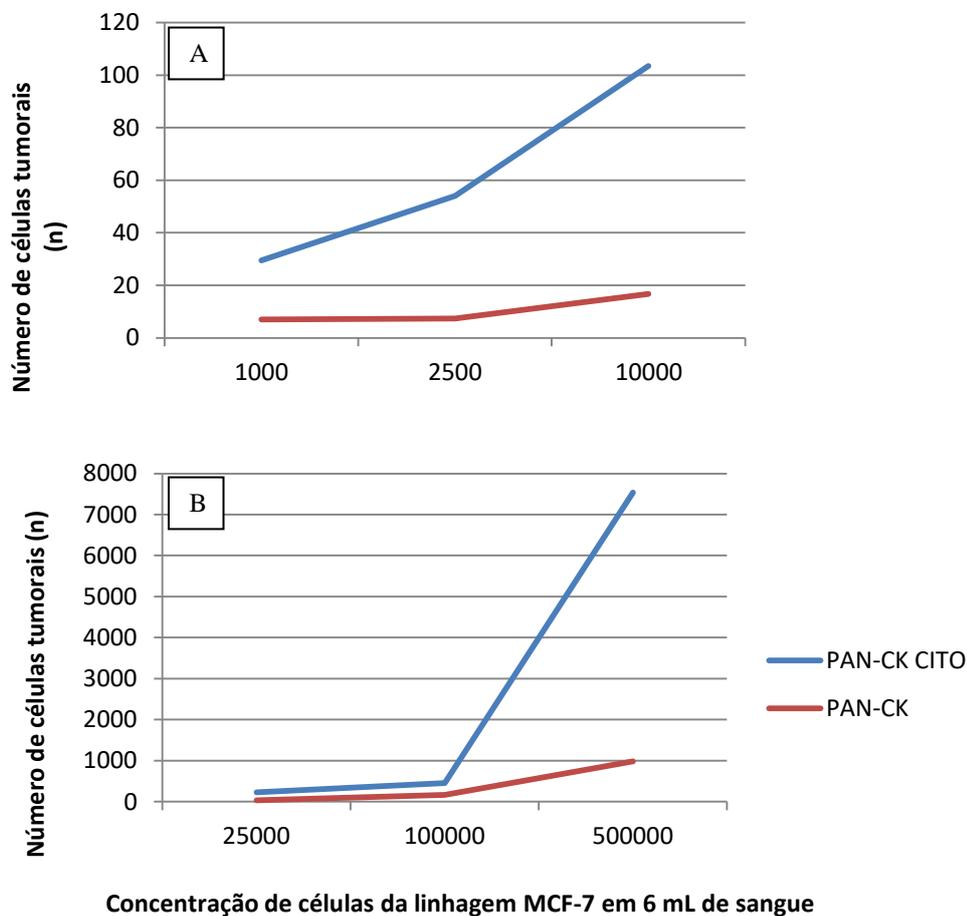


Figura 10- Número de células MCF-7 com marcação positiva para Pan-CK no citocentrifugado e no *cell block*- Em A, o número de células adicionadas inicialmente foi de 1.000, 2.500 e 10.000 em 6 mL de sangue, enquanto em B o número de células adicionadas inicialmente foi de 25.000, 100.000 e 500.000 células em 6 mL de sangue.

Na figura 11, é possível visualizar citocentrifugado contendo células da linhagem MCF-7 preparadas pelo método de citocentrifugação e marcadas com o anticorpo anti-Pan-CK na imunocitoquímica (aumento de 100x) nas concentrações de 1.000 a 500.000.

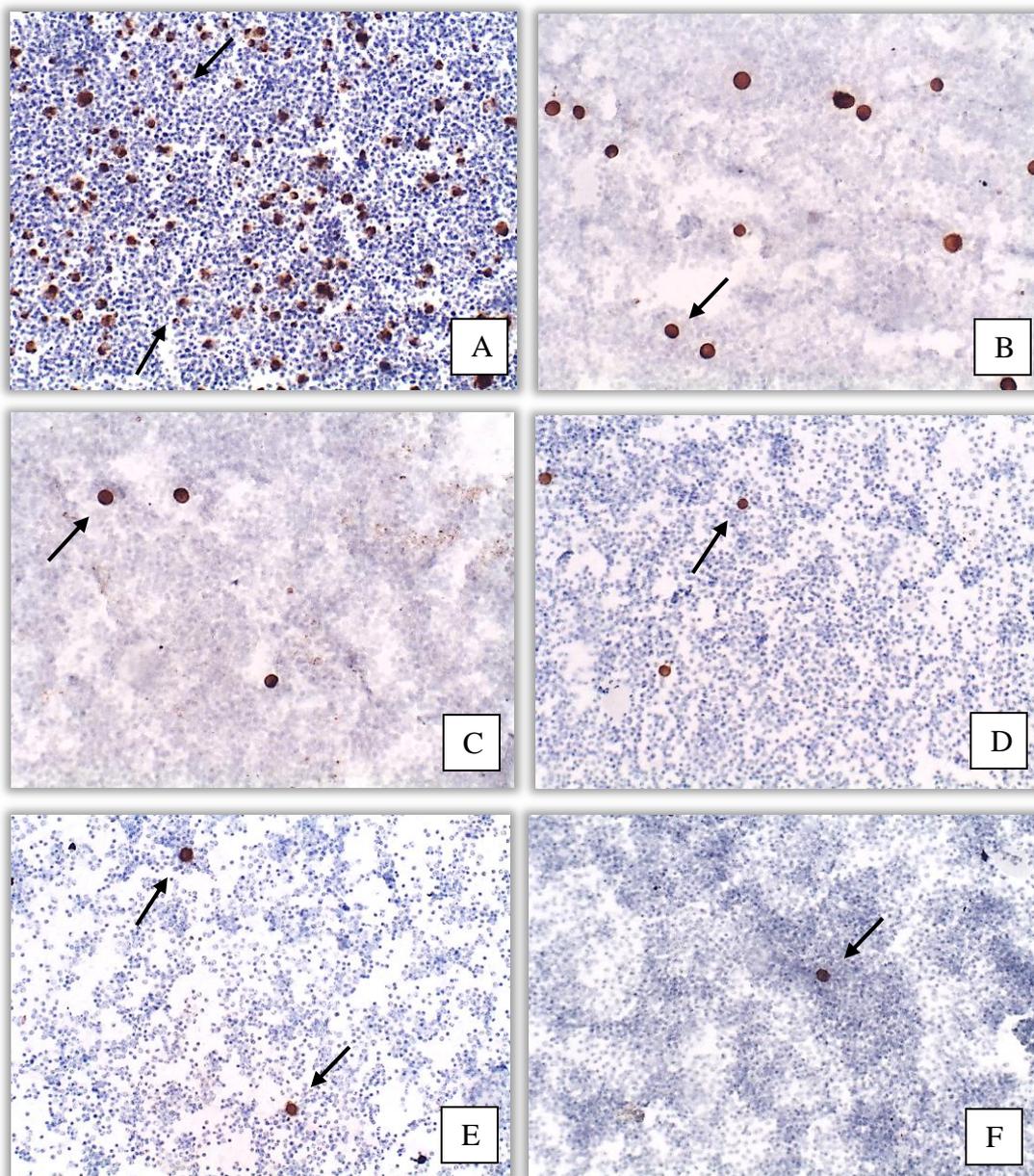


Figura 11 – Imunocitoquímica com anti-Pan-CK no citocentrifugado de sangue e células da linhagem MCF-7 (setas) em diferentes concentrações celulares - 500.000 (A), 100.000 (B), 25.000 (C), 10.000 (D), 2500 (E) e 1000 (F). Aumento de 100x.

Já na figura 12, observam-se lâminas preparadas por citocentrifugação e coradas por Papanicolaou nas mesmas concentrações (1.000 a 500.000), em aumento de 100x. Na coloração pelo método de Papanicolaou é possível diferenciar morfológicamente as células tumorais circulantes das células do sangue. As células tumorais são maiores, apresentando citoplasma mais amplo e atipias nucleares.

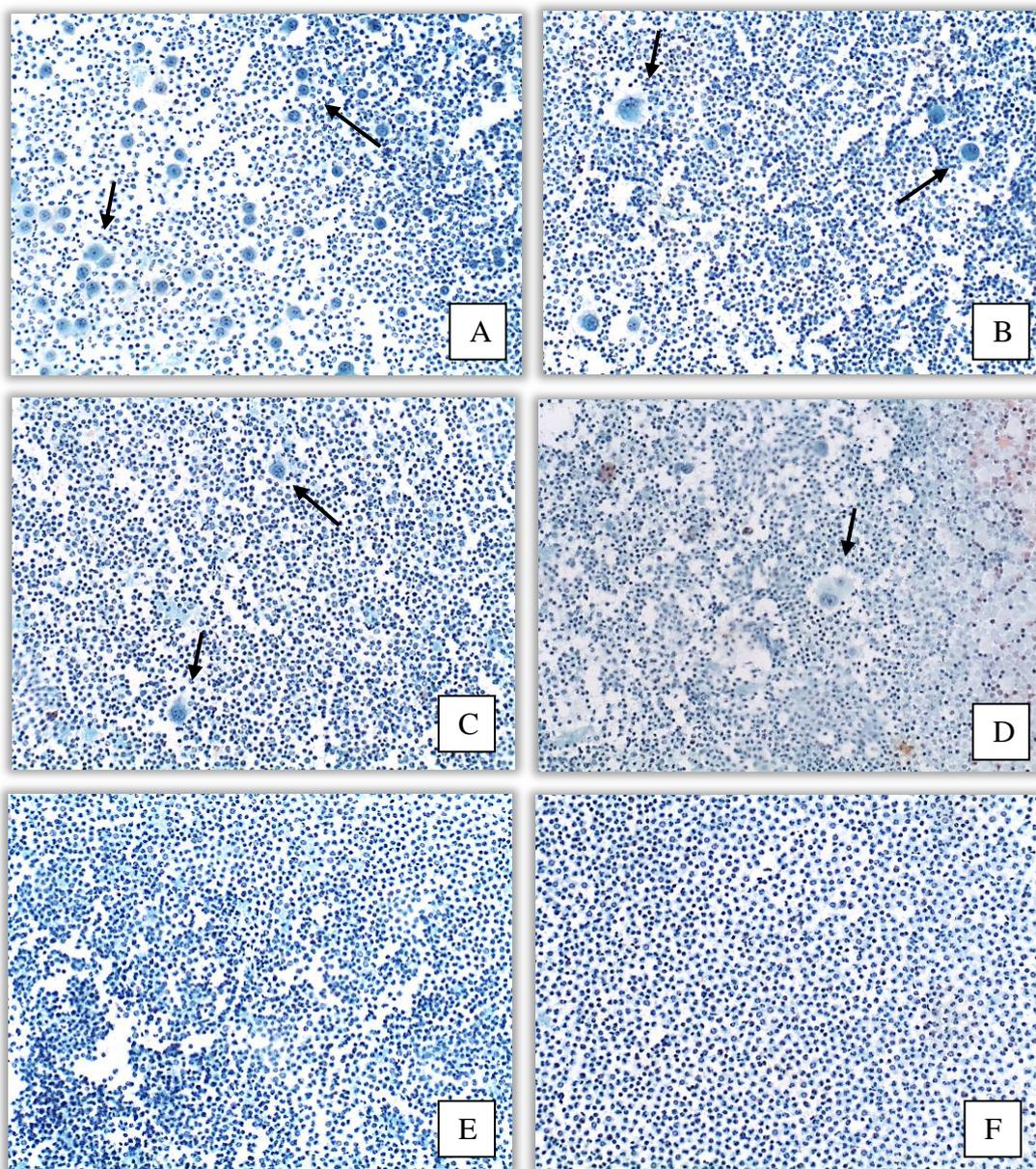


Figura 12 – Coloração de Papanicolaou do citocentrifugado de sangue e células da linhagem MCF-7 (setas) em diferentes concentrações celulares: 500.000 (A), 100.000 (B), 25.000 (C), 10.000 (D), 2500 (E) e 1000 (F). Aumento de 100x.

As lâminas preparadas por *cell block* marcadas com PanCK e *Epithelial related antigen* nas concentrações de 1.000 a 500.000 podem ser visualizadas na figura 13, em aumento de 100x.

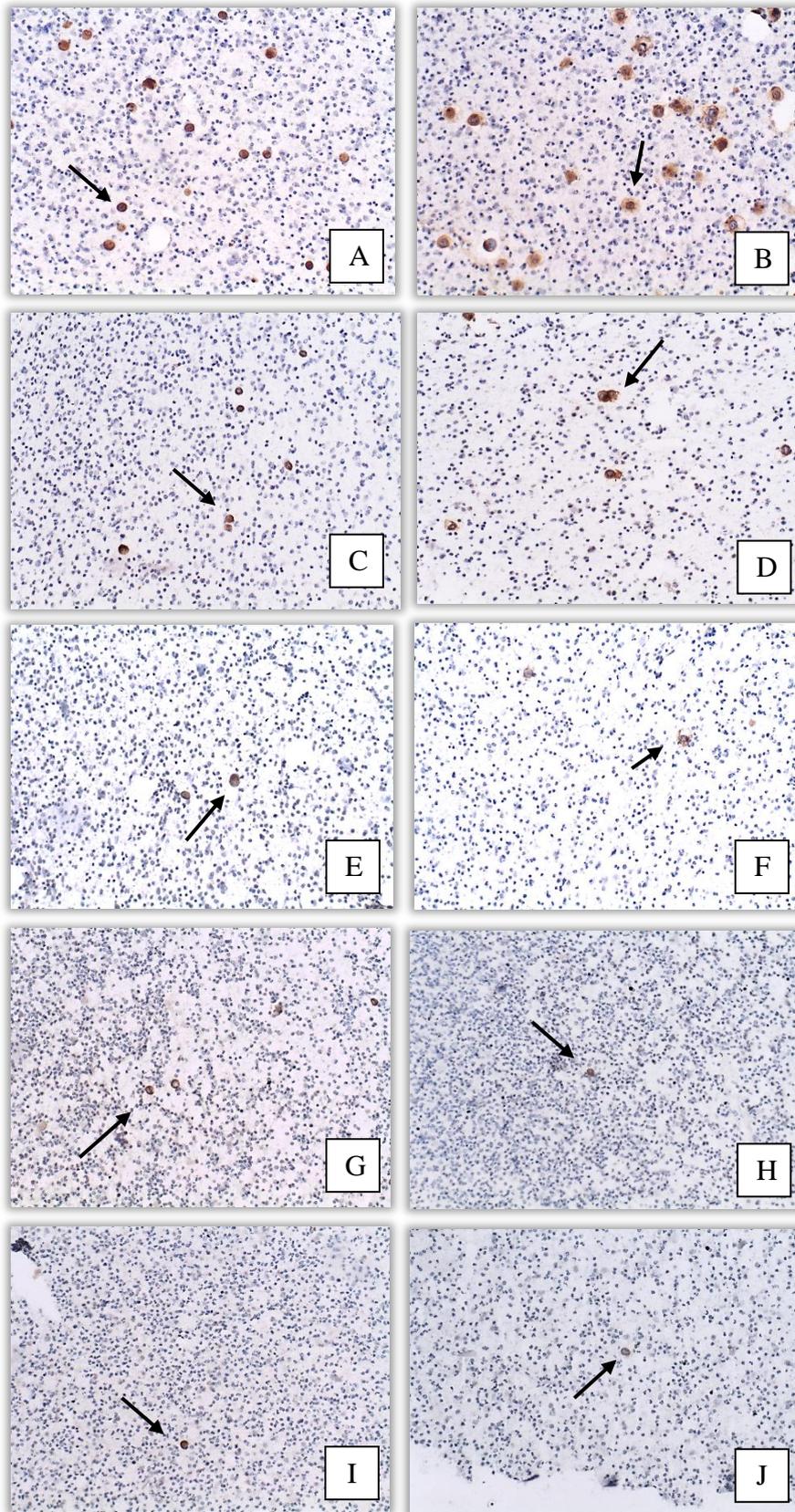


Figura 13 – Imunocitoquímica com anti-Pan-CK (A, C, E, G e I) e anti-*Epithelial related antigen* (B, D, F, H e J) no *cell block* de sangue com células da linhagem MCF-7 (setas) nas concentrações celulares de 500.000 (A e B), 100.000 (C e D), 25.000 (E e F), 10.000 (G e H) e 2500 (I e J). Aumento de 100x.

As lâminas de HE, Claudin-4 e GATA-3 em aumento de 200x e as lâminas de RE no aumento de 400x, podem ser observadas na figura 14. Nos cortes corados por HE, as células tumorais são diferenciadas das células do sangue por serem maiores e apresentarem citoplasma amplo e atipias nucleares (cariamegalia e nucléolos evidentes).

Nas lâminas foi possível visualizar o aumento do número de células tumorais marcadas com o aumento da concentração inicial das mesmas, no entanto em algumas lâminas visualizaram-se células tumorais não marcadas (figura 14, D), lise de células tumorais e coloração de fundo. Já o anticorpo Claudin-4 apresentou marcação inespecífica para macrófagos (dados não mostrados).

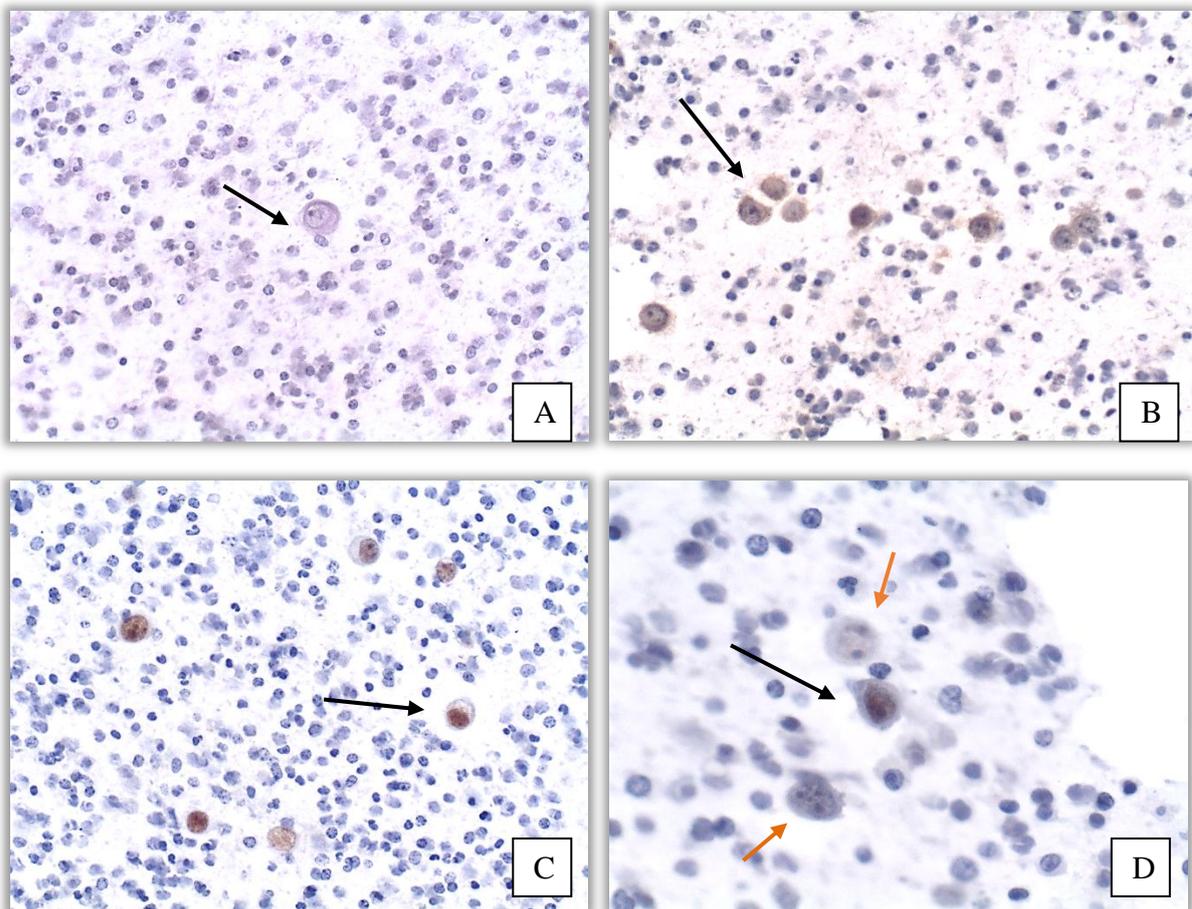


Figura 14 - HE (A), imunocitoquímica com anti-Claudin-4 (B), anti-GATA-3 (C) e anti-RE (D) em *cell block* com sangue e células da linhagem MCF-7 (setas pretas), nas setas laranjas células não marcadas - Em A, B e C, aumento de 200x. Em D, aumento de 400x.

5.2. RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM BT474

Para as células da linhagem BT474, o número de células positivas identificadas para as concentrações de 25.000 a 500.000 variou de 37 a 624 células para Pan-CK; 41 a 684 células para *Epithelial related antigen*; 2 a 9 células para GATA-3 e 30 a 280 células para Claudin-4, enquanto para RE nenhuma célula foi positivamente identificada em quaisquer das 3 concentrações apresentadas. Já a maior taxa de recuperação de células na linhagem BT474 foi de 0,21% para as lâminas preparadas nas concentrações de 14.286 células/mL marcadas com Pan-CK e Claudin-4.

Tabela 5- Quantificação de células tumorais da linhagem BT474 identificadas por imunocitoquímica.

<i>Ci</i>	<i>Ci</i> /mL	Pan-CK		<i>Epithelial related antigen</i>		GATA-3		RE		Claudin-4	
		<i>n</i>	RC/ml (%)	<i>n</i>	RC/ml (%)	<i>n</i>	RC/ml (%)	<i>n</i>	RC/ml (%)	<i>n</i>	RC/ml (%)
25.000	3571,43	37	5,29 (0,15%)	41	5,86 (0,16%)	2	0,29 (0,01%)	0	0	30	4,29 (0,12%)
100.000	14285,71	210	30,00 (0,21%)	195	27,86 (0,20%)	9	1,29 (0,01%)	0	0	209	29,86 (0,21%)
500.000	71428,57	624	89,14 (0,12%)	684	97,71 (0,14%)	4	0,57 (0,00%)	0	0	280	40 (0,06%)

Ci - concentração inicial (número de células colocadas inicialmente)

n - número de células contadas

RC - recuperação celular.

Observa-se na figura 15 que o aumento do número de células da linhagem BT474 adicionadas ao sangue ocasiona aumento do número de células identificadas com os anticorpos Pan-CK, *Epithelial related antigen* e Claudin-4, exceto para o anticorpo RE, com o qual não foi identificada nenhuma célula. Com o anticorpo anti GATA-3 foi possível identificar quantidades reduzidas de células (no máximo 9 células), com resultados próximos aos do RE.

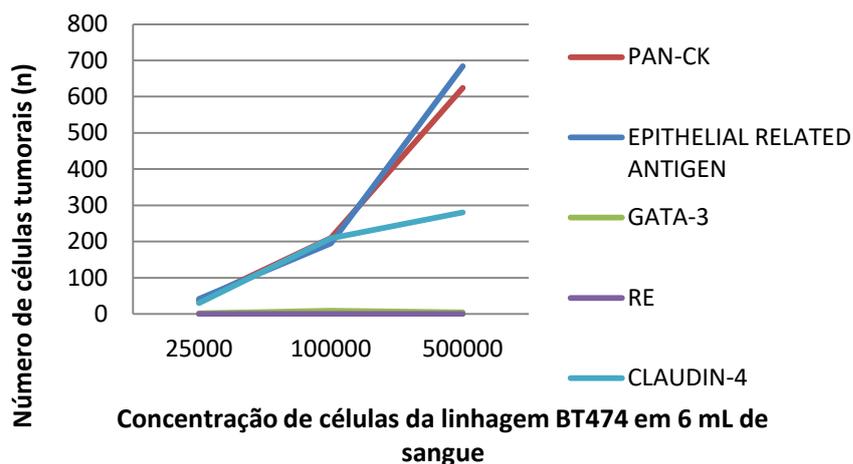


Figura 15- Número de células BT474 identificadas com os respectivos anticorpos, quando o número de células adicionadas inicialmente foi de 25.000, 100.000 e 500.000 células por 6 mL de sangue.

Ao se comparar o número de células imunomarcadas das linhagens BT474 e MCF-7, observa-se um quantitativo levemente maior de células positivas para a linhagem BT474 nas concentrações de 25.000 a 100.000 células/6 ml de sangue, enquanto nas concentrações de 100.000 a 500.000 células/6 mL de sangue, a maior recuperação celular ocorreu na linhagem MCF-7

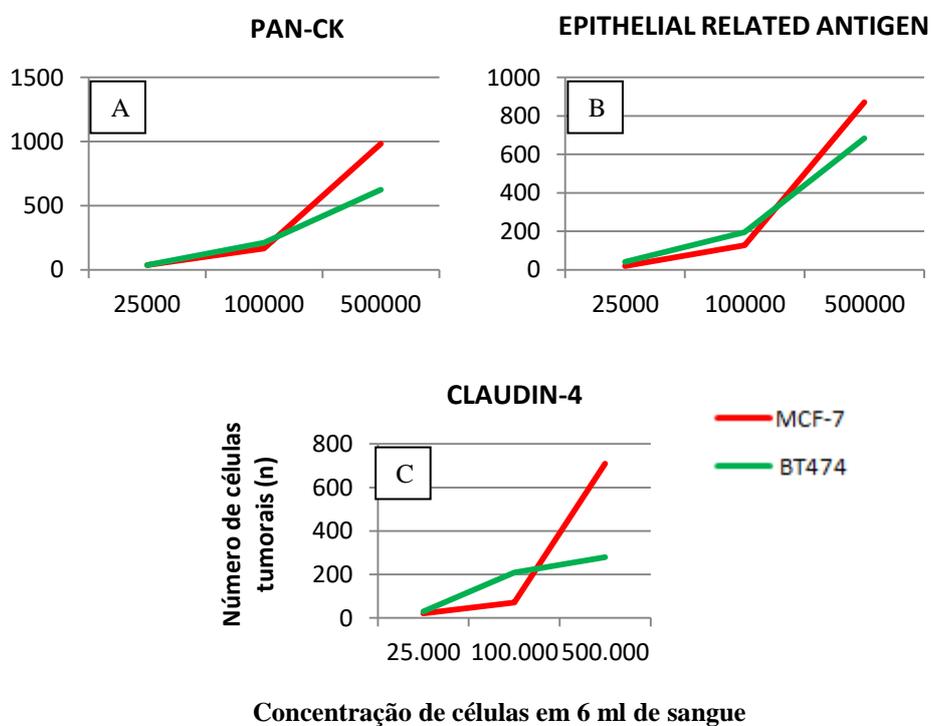


Figura 16- Número de células nas linhagens MCF-7 e BT474 identificadas com os anticorpos Pan-CK, *Epithelial related antigen* e Claudin-4 em *cell block* quando o número de células adicionadas inicialmente foi de 25.000, 100.000 e 500.000 células por 6 mL de sangue.

5.3. RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS EM AMOSTRAS DE PACIENTES

Nas lâminas preparadas de amostras de sangue de pacientes não foi possível a visualização de células tumorais e portanto não foram gerados dados de quantificação.

Os parâmetros clínicos dos pacientes analisados foram idade, estadiamento, graduação, tipo histológico, invasão vascular, formação tubular, número de figuras de mitose, grau nuclear, tamanho do tumor, expressão de RE, RP, Ki-67 e HER2.

Em 3 casos, não foi possível acessar os prontuários e para alguns pacientes, não havia informações para alguns parâmetros nos prontuários, sendo os dados contabilizados como “Desconhecido”.

O perfil das 31 pacientes diagnosticadas com câncer de mama e que participaram deste trabalho é de mulheres, com idade média de 54 anos (± 13 anos). As pacientes encontram-se na faixa de 33 a 77 anos, sendo a faixa de 51 a 60 anos a de maior prevalência (25,81%), conforme tabela 6.

Tabela 6- Idade dos pacientes diagnosticados com câncer de mama

Idade do diagnóstico	Faixa de idade	n (%)	
Média	54	31-40 anos	6 (19,35)
Intervalo	33-77	41-50 anos	6 (19,35)
		51-60 anos	8 (25,81)
		61-70 anos	5 (16,13)
		71-80 anos	3 (9,68)
		Desconhecido	3 (9,68)

Com relação ao estadiamento do tumor, observou-se maior prevalência de T2 (29,03%), N0 (35,48%) e M0 (58,06%), não sendo encontrado nenhum caso de metástase (tabela 7).

Tabela 7- Estadiamento dos tumores de pacientes

Estágio do tumor	n (%)	Linfonodos	n (%)	Metástase	n (%)
T1	4 (12,9)	N0	11 (35,48)	MO	18 (58,06)
T2	9 (29,03)	N1	10 (32,26)	M1	0
T3	6 (19,35)	N2	2 (6,45)	MX	6 (19,35)
T4	4 (12,9)	N3	0	Desconhecido	7 (22,58)
TX	1 (3,23)	NX	1 (3,23)		
Desconhecido	7 (22,58)	Desconhecido	7 (22,58)		

Observou-se, na tabela 8, o predomínio do grau II de Nottingham em 35,48% dos casos e do tipo histológico ductal em 77,42%. Já a invasão sanguínea e linfática estavam ambas presente em 22,58% dos casos enquanto a invasão perineural estava presente em apenas 16,31% dos pacientes (tabela 9).

Tabela 8- Grau de diferenciação e tipo histológico

Grau de diferenciação	n (%)	Tipo histopatológico	n (%)
I	4 (12,9)	Ductal	24 (77,42)
II	11 (35,48)	Lobular	1 (3,22)
III	5 (16,13)	Tubular	1 (3,22)
IV	0	Desconhecido	5 (16,13)
Desconhecido	11 (35,48)		

Tabela 9- Invasão sanguínea, linfática e perineural

Invasão sanguínea	n (%)	Invasão linfática	n (%)	Invasão perineural	n (%)
Presente	7 (22,58)	Presente	7 (22,58)	Presente	5 (16,31)
Ausente	10 (32,26)	Ausente	10 (32,26)	Ausente	12 (38,71)
Desconhecido	14 (45,15)	Desconhecido	14 (45,15)	Desconhecido	14 (45,15)

Ao analisar os receptores RE, RP, Ki-67 e HER2 na tabela 10, observa-se positividade para o receptor de estrogênio em 61,3% dos casos, sendo em 9 deles uma positividade maior que 75% das células; positividade para o receptor de progesterona em 58,06% e para Ki-67 em 64,52%. Já o status de HER2 prevaleceu negativo (escore 0 e 1+) em 51,62% dos casos.

Tabela 10- Expressão dos receptores RE, RP, Ki-67 e HER2

Status RE	n (%)	Positivos % RE (n=16)	n (%)
Positivo	19 (61,3)	≤ 25%	2 (12,50)
Negativo	4 (12,9)	25-50%	2 (12,50)
Desconhecido	8 (25,8)	50-75%	3 (18,75)
		75-100%	9 (56,25)
		Média	68,81
Status RP	n (%)	Positivos % RP (n=15)	n (%)
Positivo	18 (58,06)	≤ 25%	3 (20%)
Negativo	5 (16,12)	25-50%	3 (20%)
Desconhecido	8 (25,8)	50-75%	3 (20%)
		≥75%	6 (40%)
		Média	57,53
Status Ki-67	n (%)	Positivos % Ki-67 (n=20)	n (%)
Positivo	20 (64,52)	≤ 25%	10 (50%)
Negativo	1 (3,22)	25-50%	7 (35%)
Desconhecido	10 (32,26)	50-75%	3 (15%)
		≥75%	0
		Média	31,8
Status Her 2		n (%)	
Positivo (escore 3+)		2 (6,45)	
Indeterminado (escore 2+)		5 (16,13)	
Negativo (escore 1+)		1 (3,23)	
Negativo (escore 0)		15 (48,39)	
Desconhecido		8 (25,81)	

6. DISCUSSÃO

O uso do método *cell block* para detecção de células tumorais vem sendo utilizado no preparo de diferentes amostras citológicas como efusões, lavado peritoneal, aspirados e amostras em meio líquido (YUNG et al., 2012; MIYOSHI et al., 2016; LOUKERIS et al., 2010; HSU et al., 2015; JING et al., 2013,).

Estudo comparativo entre o *cell block*, a citocentrifugação e o Thin Preps mostrou que o *cell block* foi o método mais adequado para o preparo de amostras pela facilidade de interpretação morfológica e coloração mínima de fundo no estudo imunocitoquímico. Além disso, demonstra ser um método simples, econômico e que possibilita o armazenamento de amostras para estudos futuros (FETSCH et al., 2002; KAKODKAR et al., 2016).

A adição de plasma e tromboplastina à amostra para formação de coágulo é uma das formas de preparo do *cell block* e vários estudos são encontrados na literatura envolvendo o preparo de amostras de citologia esfoliativa e aspirativa com este método (NIGRO et al., 2007; SHUKLA et al., 2015; FETSCH et al., 2002; JING et al., 2013; LOWE et al., 2015). Estudo de NAM e colaboradores (2016) utilizou amostras de sangue no preparo do *cell block* em câncer de fígado, através do método *cell block* ágar, no entanto, no entanto não foi encontrado estudo com o método plasma-tromboplastina em amostras de sangue.

A detecção de células tumorais circulantes, presentes no sangue de pacientes com câncer, representa uma grande promessa clínica (ALIX-PANABIERES & PANTEL, 2013). Por serem originárias do tumor primário, estas células podem fornecer informações para o tratamento mesmo antes do surgimento de metástases, além de exercerem um papel importante no diagnóstico precoce e prognóstico da doença (ALLARD et al., 2004; CHINEN et al., 2014).

O presente estudo propôs a detecção de CTCs através do método de preparo de amostra citológica *cell block* com plasma e tromboplastina em pacientes com câncer de mama, como uma alternativa aos métodos citológicos convencionais, e para tanto, foi realizada uma validação com células de linhagens de câncer de mama.

Amostra de células das linhagens MCF-7 e BT-474

Na avaliação de células tumorais das linhagens MCF-7 e BT474, houve aumento de células imunomarcadas à medida que ocorreu aumento da concentração de células adicionadas inicialmente, evidenciando a relação direta entre a concentração e o número de células recuperadas.

Já a taxa de recuperação de células da linhagem MCF-7 citocentrifugadas, com média de 1,5% para concentrações de 1.000 a 500.000 células/7 mL, o que equivale ao intervalo de 143 a 71.429 células/mL, foi inferior à taxa encontrada em estudo anterior que recuperou uma média de 39% de células (em concentrações de 10 a 1.000 células/mL) após hemólise seguida de citocentrifugação (KALLERGI et al., 2016).

A maior porcentagem recuperada em nosso estudo foi de 2,95% de células MCF-7 na concentração de 142 células/mL em citocentrifugados contra 32% em 100 células/mL no referido estudo. Observou-se ainda que a recuperação de células não é proporcional à quantidade de células adicionadas inicialmente, conforme também evidenciado por LOWE et al. (2015) e KALLERGI et al. (2016).

Considerando que foram visualizadas células tumorais lisadas e não marcadas, é possível que essa diferença tenha ocorrido por causa de lise das células tumorais durante o processo de hemólise, ou ainda, por marcação inferior com os anticorpos aqui utilizados.

Os anticorpos anti-Pan-CK e anti-*Epithelial related antigen*, marcadores epiteliais, apresentaram os melhores resultados para detecção de células das duas linhagens, marcando um maior número de células que os demais anticorpos. Já Claudin-4, marcador de junções celulares e superexpresso no câncer de mama, apresentou marcação menos intensa que anti-Pan-CK e anti-*Epithelial related antigen* (CRUZ et al., 2005; MORGAN et al., 1999; MORIN PJ, 2005).

Observou-se, em relação aos demais anticorpos, maior positividade para anti-Pan-CK nas menores concentrações celulares, podendo ser o anticorpo de escolha nos casos de pacientes em tratamento ou sem metástases à distância, casos em que o número de células tumorais encontra-se reduzido.

Para os anticorpos anti-GATA-3 e anti-RE, marcadores indicativos de sítio primário de mama, esperava-se uma alta positividade, porém o número de células positivas para os mesmos foi pequeno, aproximando-se de zero (TAKAKU M et al. 2015; BUITRAGO et al., 2011). Já a menor efetividade do anticorpo RE nas células

MCF-7, que são estrógeno-dependentes (ATCC, 2018), pode ter ocorrido devido a perda da capacidade de expressar tal receptor.

O processamento das amostras por citocentrifugação e por *cell block* realizou-se com diferentes quantidades iniciais de células tumorais, não permitindo estabelecer uma correlação entre o número de células imunomarcadas para os dois métodos.

O maior número de células positivas observado nas lâminas feitas por citocentrifugação pode ser explicado pelo fato de neste método todas as células se concentrarem na lâmina em um círculo de 1 cm de diâmetro enquanto no *cell block*, as células permanecerem em uma estrutura 3D de cerca de 2 cm de área (BRASIL, 2009; KULKARNI et al., 2009; MICHAEL & DAVIDSON, 2016).

Uma vez que lâminas de amostras de *cell block* são preparadas de cortes de 4-5 µm de espessura e que pelo menos 100 cortes podem ser obtidos destas estruturas, os valores obtidos em cada corte teriam que ser multiplicados por 100 para se obter a quantidade real células presentes nesta estrutura (BRASIL, 2009).

O volume de sangue coletado, 6 mL, buscou minimizar o incômodo da coleta em pacientes debilitados e foi próximo ao volume de sangue coletado por NAM et al. (2016) de 5 mL para o preparo do *cell block* por ágar. No entanto, o volume utilizado em nosso estudo foi menor que o volume utilizado em outros métodos de detecção como os 7,5 mL no Cell Search[®] e os 10 mL no ISET[®] (CRISTOFANILLI et al, 2005; KALLERGI et al., 2016).

Amostras de pacientes com câncer de mama

A ausência de detecção de células tumorais circulantes nas amostras de sangue de pacientes reforça a noção de que as CTCs estão presentes em número extremamente baixo, mesmo em pacientes metastáticos e em quantidades ainda menores em não-metastáticos (FUSI et al., 2012). Cabe ressaltar que nenhum dos pacientes deste estudo apresentava metástase à distancia comprovada, embora se tenha evidenciado invasão sanguínea e linfática em 22,58% dos casos e comprometimento de linfonodos axilares em 32,26%.

Neste momento, no entanto, não é possível saber se nesses pacientes as CTCs estariam restritas aos linfonodos, e a uma circulação mais localizada, ou se o processo tumorigênico ainda encontra-se em fases iniciais, onde as células não estão

completamente transformadas, e portanto, ainda retêm suas características teciduais e sua localização primária. Para contornar esse entrave para a detecção de CTCs em estágios mais precoces, alguns trabalhos propõem a utilização de circulação mais profunda que a periférica, realizado a coleta de sangue arterial (ao invés de venoso), ou ainda, por realização de plasmaférese, onde podem ser analisadas grandes quantidades de material (TERAI et al., MIMEAULT & BATRA., 2014; ECCLES et al., 2013; ALEČKOVIĆ & KANG, 2015; MARLEAU et al., 2012)

Outro fato a ser considerado para a ausência de CTCs imunomarcadas em pacientes atendidos pelo Ambulatório de Mastologia/HUB são as estratégias adotadas pelo Ministério da Saúde nos últimos anos, como o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis (BRASIL, 2011) e as Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama (BRASIL2, 2015), estabelecendo ações prioritárias para o controle do câncer de mama e detecção precoce da doença.

Nesse sentido, o maior grupo de pacientes deste estudo apresentava tumor de estadiamento de grau T2 , ou seja, de grau ainda inicial, o que é similar aos trabalhos provenientes de países desenvolvidos, com histórico de prevenção ao câncer de mama. A obtenção de sangue de pacientes com câncer em estágio mais precoce pode ter contribuído para a dificuldade em se identificar CTCs nas amostras destas pacientes.

No presente estudo, o predomínio do estágio T2 (29,03%) para a classificação do tamanho do tumor indica tumores com mais de 2 e até 5 cm em sua maior dimensão (BRASIL, 2004). O tipo histológico ductal, de pior prognóstico que os demais, esteve presente em 77,42% dos casos e o grau de diferenciação mais frequente foi o de grau 2 (35,48%), refletindo o potencial de malignidade do tumor (ABREU & KOIMAN, 2002).

A positividade para os receptores hormonais RE e RP foi observada respectivamente em 61,3% e 58,06% dos caso no presente estudo. Segundo a literatura, a positividade dos tumores para o receptor de estrógeno varia de 51 a 74%, enquanto para o receptor de progesterona, de 53 a 63% (DENISOV et al., 2014; CHEN et al., 2015; AKTAS et al., 2016). O resultado positivo para o marcador de proliferação celular Ki-67 foi observado em 64,52% das pacientes enquanto HER2 foi positivo em apenas 6,45% dos casos, mostrando menor agressividade do tumor e menos resistência aos tratamentos (DORNELAS et al.; BUITRAGO et al., 2011).

Embora o câncer de mama ocorra em mulheres de todas as idades, MENDONÇA et al. (2004) e ABREU & KOIMAN (2002) reforçam que em mulheres mais jovens (≤ 35 anos) e em mulheres mais velhas (≥ 75 anos) o prognóstico é pior. Em nosso estudo 3 pacientes tinham idade menor ou igual a 35 anos e outras 3 pacientes, idade superior ou igual a 75 anos.

A média de idade de 54 anos observada para pacientes com câncer de mama no presente trabalho condiz com estudos anteriores apresentados por PAIVA et al. (2002), SALLES et al. (2009) e MENDONÇA et al. (2004). ABREU & KOIMAN (2002) apontam um melhor prognóstico para a faixa de idade de 41 a 60 anos, que foi observada em 45,16% das pacientes em nosso estudo.

Este estudo apresentou algumas limitações entre elas o pequeno volume de sangue coletado, impossibilitando partir de volumes iguais no citocentrifugado e no *cell block* para avaliar uma correlação entre os métodos. Além disso, o bloco gerado pelo método de plasma-tromboplastina não foi analisado em sua totalidade, e sim em apenas um corte, o que pode ter limitado a detecção.

Outra questão, enunciada em vários artigos e não realizada no presente estudo foi o descarte dos primeiros 5 mL de sangue coletados por risco de conter células epiteliais da pele do paciente provenientes do processo de coleta (KALLERGI et al., 2016). No entanto, considerando-se que não foram encontradas células marcadas para Pan-CK ou para *Epithelial related antigen* nas amostras de pacientes, o descarte desse volume inicial não parece ter influenciado as análises dessas amostras.

Não se pode descartar, contudo, a possibilidade de que o sangue utilizado para o processo de *spike-in*, no qual células de linhagens tumorais foram adicionadas a sangue de voluntários saudáveis, possa ter sido contaminado com células epiteliais dos doadores, no momento da punção. Já o anticorpo anti *Epithelial related antigen* não marca células escamosas da epiderme da pele, que são morfológicamente diferentes das células do câncer, não ocorrendo falsos positivos nas amostras analisadas neste caso,

Embora não se tenha encontrado células tumorais nas pacientes, observa-se que o número de casos ($n=31$) é muito pequeno, sobretudo pelo fato de que foram excluídas do estudo mulheres com histórico prévio de tratamento para câncer, e/ou que já tivessem sido submetidas ao processo de tratamento por quimio ou radioterapia. O tratamento prévio tende a diminuir drasticamente a quantidade de CTCs no sangue periférico, por isso, pacientes com essa característica foram excluídas. Contudo, isso diminuiu o número de amostragem para o estudo.

A observação de lise de células tumorais nas lâminas ao utilizar o tampão de hemólise, pode refletir sua prescindibilidade, sobretudo porque os eritrócitos não atrapalham a visualização e contagem de células tumorais, que estão imunomarcadas.

Estudos futuros são necessários para aprofundar a relação entre o número de células detectadas e seu valor prognóstico no câncer de mama, bem como para compreender o impacto da detecção de CTCs na sobrevida livre da doença e assim validar a utilização do método *cell block* com plasma e tromboplastina no sangue como alternativa a outros métodos utilizados na rotina citológica.

7. CONCLUSÕES

- O *cell block* preparado pelo método plasma-tromboplastina foi capaz de detectar células tumorais das linhagens MCF-7 e BT474, adicionadas a sangue.
- O número de células imunomarcadas aumentou com o aumento da concentração inicial de células, embora a taxa de recuperação celular não tenha aumentado proporcionalmente com o aumento da concentração inicial.
- Pan-CK e *Epithelial related antigen* foram os marcadores mais sensíveis para a detecção de células tumorais, tendo o Pan-CK se destacado em relação aos demais principalmente em concentrações menores (1.000, 2.500 e 10.000 células por 7 mL).
- A não detecção no sangue de pacientes sem metástases, antes da realização de qualquer tratamento, demonstra que o método *cell block* plasma-tromboplastina é mais apropriado para pacientes metastáticos, os quais apresentam maior número de células tumorais circulantes

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH. *Imunologia celular e molecular*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABREU E, KOIMAN S. Fatores prognósticos no câncer de mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2002; 48(1): 113-131.

ACETO N et al. Co-expression of HER2 and HER3 receptor tyrosine kinases enhances invasion of breast cells via stimulation of interleukin-8 autocrine secretion. *Breast Cancer Research*. 2012; 14: R131.

ACETO N et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014; 158: 1110–1122.

AKTAS B et al. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research*. 2009; 11: 4.

AKTAS B et al. Comparison of the HER2, estrogen and progesterone receptor expression profile of primary tumor, metastases and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2016; 16:522.

ALBERTS B et al. *Biologia molecular da célula*, 4ª edição, Ed Artmed, 2004, p.1314.

ALEČKOVIĆ M, KANG Y. Regulation of cancer metastasis by cell-free miRNAs. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1855 (1): 24-42.

ALIX-PANABIÈRES C, PANTEL K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14: 623-631.

ALIX-PANABIÈRES C, PANTEL K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clinical Chemistry*. 2013; 59(1): 110–118.

ALLARD,WJ et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clinical Cancer Research*. 2004; 10: 6897–6904.

ALUNNI-FABBRONI M, SANDRI MT. Circulating tumour cells in clinical practice: methods of detection and possible characterization. *Methods*. 2010; 50: 289–297.

AMENDOLA LCB, ROBERTO VIEIRA R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2005; 51(4): 325-330.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Disponível em <[https://www.atcc.org/Products/ All/HTB-22.aspx](https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx)> Acesso em 13/02/2018.

AZEVEDO AS et al. Metastasis of circulating tumor cells: Favorable soil or suitable biomechanics, or both? *Cell Adhesion & Migration*. 2015; 9 (5): 345-356.

BADOWSKA-KOZAKIEWICZ AM, BUDZIK MP. Immunohistochemical characteristics of basal-like breast cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2016; 20(1): 436–443.

BATISTIN AP et al. Conhecimento e prática sobre os fatores de risco para o câncer de mama entre mulheres de 40 a 69 anos. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife*. 2011; 11(2): 163-171.

BERGMANNA A et al. Morbidade após o tratamento para câncer de mama *Fisioterapia Brasil*. 2000; 1 (2): 101-108.

BORGES-FERRO A. *Imunohistoquímica*. Lisboa, Portugal: 2016. Disponível em: <<http://amadeuferro.webs.com/>>. Acesso em 14 de fevereiro de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Controle do Câncer de Mama - Documento de Consenso. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2004; 50(2): 77-90.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Oswaldo Cruz. *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Volume 2*. Rio de Janeiro: 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022*. Brasília: 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. *Sistema de informações sobre mortalidade*. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 13 set. 2017. *apud* BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde. *Estimativa 2016/2017: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: 2018.

BRASIL1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde. *Estimativa 2016/2017: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: 2015.

BRASIL1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde. *Estimativa 2018/2019: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: 2018.

BRASIL2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde. Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil. Rio de Janeiro: 2015.

BRASIL2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde. Câncer de mama. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama> Acesso em 06 de fev. 2018.

BUDD GT et al. Circulating tumor cells versus imaging predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12 (21): 6403-6409.

BUITRAGO F, UEMURA G, SENA MCF. Fatores prognósticos em câncer de mama feminina. *Com. Ciências Saúde.* 2011; 22, Sup 1: S69-S82.

CABEL L et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *Int J Clin Oncol.* 2017; Jun; 22(3): 421-430.

CASTRO TMML et. Aplicação do método “plasma tromboplastina/ trombina” no preparo de amostras citológicas para pesquisa de câncer no Laboratório de Anatomia Patológica. *RBCS.* 2016; 20(1): 85-90.

CHEN L et al. The expression of CXCL13 and its relation to unfavorable clinical characteristics in young breast cancer. *Journal of Translational Medicine.* 2015; 13:168.

CHEUK IWC, SHIN VY, KWONG A. Detection of Methylated Circulating DNA as Noninvasive Biomarkers for Breast Cancer Diagnosis. *J Breast Cancer.* 2017; 20(1): 12-19.

CHINEN LTD et al. Isolation, detection, and immunomorphological characterization of circulating tumor cells (CTCs) from patients with different types of sarcoma using isolation by size of tumor cells: a window on sarcoma-cell invasion. *OncoTargets and Therapy.* 2014; 7: 1609–1617.

CIRQUEIRA MB et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. *Feminina.* 2011; 39 (10):499-503.

COLDITZ GA, BOHLKE K. Priorities for the Primary Prevention of Breast Cancer. *CA: Cancer J Clin.* 2014; 64: 186–194.

COUMANS FAW, SIESLING S, TERSTAPPEN LWMM. Detection of cancer before distant metastasis. *BMC Cancer.* 2013; 13: 283.

CRISTOFANILLI M et al. Circulating Tumor Cells: A Novel Prognostic Factor for Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23(7): 1420-1430.

CRUZ I et al. Evaluation of multiparameter flow cytometry for the detection of breast cancer tumor cells in blood samples. *Am J Clin Pathol*. 2005; 123: 66-74.

DENISOV EV et al. Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and multidrug resistance gene expression. *Scientific Reports*. 2014; 4 : 4709.

DORNELAS MT et al. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose no carcinoma espinocelular de pele e ceratose actínica. *An Bras Dermatol*. 2009; 84(5): 469-475.

ECCLES SA et al. Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2013; 15: R92.

FERREIRA MM, RAMANI VC, JEFFREY SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*. 2016; 10: 374–394.

FETSCH PA et al. Comparison of three commonly used cytologic preparations in effusion immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol*. 2002; 26(1): 61-6.

FUSI A et al. Expression of chemokine receptors on circulating tumor cells in patients with solid tumors. *Journal of Translational Medicine*. 2012; 10:52.

HAINES DM, CHELACK BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest*. 1991; 3: 101-112.

HONG Y, FANG F, ZHANG Q. Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int J Oncol*. 2016; 49(6): 2206-2216.

HOWELL A et al. Risk determination and prevention of breast. *Cancer. Breast Cancer Research*. 2014, 16: 446.

HSU CY, CHANG ZF, LEE HH. Immunohistochemical evaluation of ROCK activation in invasive breast cancer. *BMC Cancer*. 2015; 15: 943.

JING X et al. Morphologic and immunocytochemical performances of effusion *cell blocks* prepared using 3 different methods. *Am J Clin Pathol*. 2013; 139: 177-182.

JORGE TCA., CASTRO SL. Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ, 2000.

KAKODKAR UC, VADALA R, MANDREKAR S. Utility of cell-block of bronchial washings in diagnosis of lung cancer - A comparative analysis with conventional smear cytology. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016; 10(4): 25-28.

KALLERGI G et al. Evaluation of Isolation Methods for Circulating Tumor Cells (CTCs). *Cell Physiol Biochem*. 2016; 40: 411-419.

KREBS MG et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014; 11: 129-44.

KULKARNI MB et al. Utility of the thromboplastin-plasma cell-block technique for fine-needle aspiration and serous effusions. *Diagn Cytopathol* 2009; 37(2): 86-90.

LARREA E et al. New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int. J. Mol. Sci*. 2016; 17: 627.

LAWET AMK et al. The innate and adaptive infiltrating immune systems as targets for breast cancer immunotherapy. *Immunotherapy in breast cancer*. 2017, 24 (4): 123-144.

LOUKERIS K et al. Cytological *Cell blocks*: Predictors of Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma Subtypes. *Diagnostic Cytopathology*. 2010; 40(5): 380-387.

LOWE AC et al. Young investigator challenge: application of cytologic techniques to circulating tumor cell specimens: detecting activation of the oncogenic transcription Factor STAT3. *Cancer Cytopathology*. 2015; 123(12): 696-706.

MAIA CS et al. Câncer de mama: profilaxia por mastectomia na presença de alterações dos genes BRCA1 e BRCA2. *RSC online*. 2016; 5(2): 84-93.

MARLEAU AM et al. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2012; 10:134.

MARQUES CAV, FIGUEIREDO EM, GUTIÉRREZ MGR. Políticas de saúde pública para o controle do câncer de mama no Brasil. *Rev enferm UERJ*. 2015; 23(2): 272-8.

MAYALL F, CHANG B, DARLINGTON A. A review of 50 consecutive cytology *cell block* preparations in a large general hospital. *J Clin Pathol*. 1997; 50: 985-990.

MENDONÇA GAS, SILVA AM, CAULA WM. Características tumorais e sobrevida de cinco anos em pacientes com câncer de mama admitidas no Instituto Nacional de

Câncer, Rio de Janeiro, Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2004; 20(5): 1232-1239.

MICALIZZI DS, MAHESWARAN S, HABER DA. A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. Genes Dev. 2017, Sep 15; 31(18): 1827-1840.

MICHAEL CW, DAVIDSON B. Pre-analytical issues in effusion cytology. Pleura and Peritoneum. 2016; 1(1): 45–56.

MIMEAULT M, BATRA SK. Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014; 23(2): 234–254.

MIYOSHI S et al. Diagnostic Utility of Pleural Fluid *Cell block* versus Pleural Biopsy Collected by Flex-Rigid Pleuroscopy for Malignant Pleural Disease: A Single Center Retrospective Analysis. PLoS ONE. 2016; 11(11): e0167186.

MOLNAR B et al. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. Clinical Cancer Research. 2001; 7: 4080-4085.

MORGAN RL et al. MOC-31 aids in the differentiation between adenocarcinoma and reactive mesothelial cells. Cancer cytopathology. 1999; 87 (6): 390-394.

MORIN PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. Cancer Res. 2005; 65 (21): 9603-9606.

MSAOUEL P, KOUTSILIERIS M. Diagnostic value of circulating tumor cell detection in bladder and urothelial cancer: systematic review and meta-analysis. BMC Cancer. 2011; 11:336.

NAM SJ et al. A new *cell block* method for multiple immunohistochemical analysis of circulating tumor cells in patients with liver câncer. Cancer Res Treat. 2016; 48(4): 1229-1242.

NIGRO K et al. Comparison of *cell block* preparation methods for nongynecologic ThinPrep specimens. Diagn Cytopathol. 2007; 35(10): 640-3.

PAIVA CE et al. Fatores de Risco para Câncer de Mama em Juiz de Fora (MG): um estudo caso-controle. Revista Brasileira de Cancerologia. 2002; 48(2): 231-237.

POWELL AA et al. Single Cell Profiling of Circulating Tumor Cells: Transcriptional Heterogeneity and Diversity from Breast Cancer Cell Lines. PLoS ONE. 2012; 7(5): e33788.

RAMOS-VARA JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2005; 42: 405-426.

RIETHDORF S et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the CellSearch System. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(3): 920-928.

SALLES MA et al. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. *J Bras Patol Med Lab.* 2009; 45(3): 213-222.

SAMATOV TR, TONEVITSKY AG, SCHUMACHER U. Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Molecular Cancer.* 2013; 12:107.

SILVA JME et al. Margens cirúrgicas no tratamento conservador do câncer de mama: revisão sistemática. *Rev Bras Mastologia.* 2014; 24(3): 70-75.

SILVA PA, RIUL SS. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. *Revista Brasileira de Enfermagem.* 2011; 64 (6): 1016-1021.

SHUKLA P, KAUR S, GULWANI HV. Diagnostic utility of Plasma Thromboplastin *cell block* preparation in cytological evaluation of serous effusions. *IJBR.* 2015; 6(11): 890-896.

SLAMON DJ et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine.* 2001; 344 (11): 784-792.

TAKAKU M, GRIMM AS, WADE PA. GATA3 in breast cancer: tumor suppressor or oncogene? *Gene Expr.* 2015; 16(4): 163–168.

TERAI M et al. Arterial blood, rather than venous blood, is a better source for circulating melanoma cells. *EbioMedicine.* 2015; 2: 1821–1826.

TJENSVOLL K, NORDGARD O, SMAALAND R. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: methods of detection and clinical implications. *Int. J. Cancer.* 2013; 134(2014): 1-8.

TSUJIURA M et al. Liquid biopsy of gastric cancer patients: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(12): 3265-3286.

WEINBERG, RA. *A biologia do câncer* [recurso eletrônico]. Porto Alegre. Ed Artmed, 2008.

YU M et al. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J. Cell Biol.* 2011; 192(3): 373–382.

YUNG RCW et al. Improvement of Cellularity on *Cell block* Preparations Using the So-Called Tissue Coagulum Clot Method During Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Fine-Needle Aspiration. *Cancer Cytopathol.* 2012; 120(3): 185–195.

ZHE X, CHER ML, BONFIL R D. Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack. *Am J Cancer Res.* 2011; 1(6): 740-751.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Preparo de PBS

- NaCl (137mM)
- KCl (2,7mM)
- Na₂HPO₄ (10mM)
- KH₂PO₄ (2mM)
- Ajustar o pH para 7,4
- Completar o volume com água destilada para 1 L e autoclavar

APÊNDICE B - Preparo tampão de hemólise

- NH₄Cl (145 mM)
- NH₄HCO₃ (10 mM)
- Completar o volume com água destilada para 2 L e autoclavar

APÊNDICE C- Hematoxilina de Harris

- Hematoxilina. 0,48% (p/v)
- Etanol absoluto 4,8% (v/v)
- KAl(SO₄)₂ (384 mM)
- HgO (11mM)
- Completar o volume com água destilada para 1.050 mL

Protocolo: Dissolver o alúmen em água destilada com o auxílio de uma placa aquecedora e um agitador magnético. Misture a hematoxilina no etanol à temperatura ambiente em outro recipiente separado. Lentamente, combinar as duas soluções aquecendo em placa aquecedora, até entrar em ebulição. Retirar da fonte de calor e acrescentar lentamente o óxido mercúrio. Retornar a solução para a fonte de calor até que tome a tonalidade púrpuro-escura. Aguardar esfriar.

APÊNDICE D - Corante orange G:

I- Solução estoque de orange G 10%

- Orange G - 10% (m/v)

- Completar o volume com água destilada para 100 mL

II- Solução de uso do orange G :

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

APÊNDICE E - Corante EA-65:

I- Soluções estoque eosina Y a 20%:

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

II- Solução estoque *light-green* SF a 3%:

- *Light-green* SF 3% (p/v) em água destilada

III- Solução de uso do EA-65:

- Solução estoque de eosina Y - 2% (v/v)
- Solução estoque de *light-green* SF- 1% (v/v)
- $\text{H}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$ – 0,832 mM
- Etanol 95% - 70% (v/v)
- Metanol absoluto- 25% (v/v)
- Ácido acético glacial- 2% (v/v)

APÊNDICE F - Preparo da solução de recuperação

I- Tampão citrato

- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (12mM) em água destilada
- Completar o volume com água destilada para 1L
- Ajustar o pH para 6 e armazenar em geladeira

II- Solução de recuperação

- Tampão citrato - 250 mL
- Tween 20 – 0,0002% v/v

APÊNDICE G – Preparo de tampão TBS

I- Preparo do Tris pH 7,3

- Tris (0,2 M)
- HCl (N/10)
- Ajustar para pH 7,3 e conservar em geladeira

II- Preparo do tampão TBS

- Tris pH 7,3 – 11% v/v
- NaCl (146,5 mM)
- Ajustar para pH 7,3 e conservar em geladeira

APÊNDICE H – Número (n) de células tumorais por lâmina nas concentrações de 1.000, 2.500, 10.000, 25.000, 100.000 e 500.000 células por 6 mL de sangue

Linagem	Concentração	Pan-CK (CITO)	Pan-CK	Epithelial related antigen	GATA-3	RE	Claudin-4
MCF-7	1000 (A)	36	0	0	0	0	0
	1000 (B)	23	0	0	0	0	0
	1000 (C)	não avaliavel	21	1	0	0	0
	2500 (A)	38	6	8	1	0	3
	2500 (B)	não avaliavel	8	1	4	0	0
	2500 (C)	70	8	7	0	0	5
	10.000 (A)	148	15	3	3	0	9
	10.000 (B)	59	19	7	2	0	0
	10.000 (C)	não avaliavel	16	8	3	0	17
	25.000 (A)	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel
	25.000 (B)	256	6	não avaliavel	0	2	não avaliavel
	25.000 (C)	195	66	19	46	0	21
	100.000 (A)	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel
	100.000 (B)	não avaliavel	260	225	195	2	85
	100.000 (C)	452	73	28	22	3	57
	500.000 (A)	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel
	500.000 (B)	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel	não avaliavel
	500.000 (C)	7540	983	872	459	6	710

ANEXOS

Anexo 1 – 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
Linfonotos 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 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 mamária interna
N3a	Metástase para linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(is)
N3b	Metástase para linfonodo(s) da 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 2 – Estadiamento do câncer de mama por agrupamento

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

Anexo 3 – Subtipos moleculares do câncer de mama

Subtipo molecular	Padrão de imunomarcção
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 \geq 14%
	RE+ e/ou RP+, HER2+ (luminal HER2)
Superexpressão de HER2	RE-, RP- e HER2+
Basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo negativo não basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

Anexo 4 – 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: ProfaDra Andréa BarrettoMotoyama 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 BarrettoMotoyama da Universidade de Brasília (UnB).

Além das informações contidas neste, 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 a 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 duas amostras de 7,5mL 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-se o seu o anonimato e dos demais dos 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 2 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, ao 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. Prof. Dra Andréa Motoyama: 3107-1937 ou -1998 ou 9176-7346 e Dr João Nunes, médico oncologista do Centro de Alta Complexidade em Oncologia – CANCON/HUB/UnB: 3448-5000. O Comitê de Ética em Pesquisa pode ser contactado no tel: 3107- 1947.

Declaro que li e entendi esta 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.

_____ data: _____

Assinatura da paciente

_____ data: _____

Assinatura do(a) médico(a) pesquisador

Responsável: Dr João Nunes de Matos Neto, médico oncologista