

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Ariel Cordeiro Ferreira

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GLUT-1 COMO MARCADOR DE
DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO EM CÂNCER DE MAMA EM
BIÓPSIAS LÍQUIDAS**

São Paulo

2018

Ariel Cordeiro Ferreira

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GLUT-1 COMO MARCADOR DE
DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO EM CÂNCER DE MAMA EM
BIÓPSIAS LÍQUIDAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
Apresentado ao curso de Biomedicina do
Centro Universitário São Camilo, orientado
pela Prof^a. Dra. Sandra Castro Poppe com
co-orientação pela Dra. Beatriz da Costa
Aguiar Alves Reis, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

São Paulo

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Ferreira, Ariel Cordeiro

Avaliação da expressão de GLUT-1 como marcador de diagnóstico e prognóstico em câncer de mama em biópsias líquidas / Ariel Cordeiro Ferreira. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2018.

46 p.

Orientação de Sandra Castro Poppe

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2018.

1. Biomarcadores tumorais 2. Biópsia líquida 3. Neoplasias da mama 4. Transportador de glucose tipo 1 I. Poppe, Sandra Castro II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 616.99449

Ariel Cordeiro Ferreira

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GLUT-1 COMO MARCADOR DE
DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO EM CÂNCER DE MAMA EM
BIÓPSIAS LÍQUIDAS**

São Paulo, 15 de outubro de 2018

Professor Orientador – Prof^a Dr^a Sandra Castro Poppe

Professor Examinador – Prof^a Dr^a Luciana Pugliese da Silva

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia à Elisângela Lima e a Sandra Chier, mulheres lutadoras e inspiradoras, que não abaixam a cabeça para o câncer.

Força guerreiras!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha mãe e à minha vó Paula por todo amor e que apesar de todas as dificuldades sempre estiveram torcendo pelo meu bem. Agradeço aos meus primos José Maria Felipe e Maria Ângela, que me deram o suporte necessário lá no início do curso. Agradeço a todos da família que estiveram torcendo por mim.

Em segundo lugar, aos meus amigos, que me deram um apoio super importante em um dos momentos mais difíceis da minha vida. Agradecimento especial ao Valdir, que me aconselhou, ouviu minhas reclamações e sempre esteve do meu lado. Agradeço também a minha irmã, que se tornou amiga no momento em que eu me sentia sozinho.

Agradeço a toda a equipe do laboratório de Análises Clínicas FMABC, especialmente ao Dr. Fernando e a Dra. Aleksandra pelas oportunidades que me deram e têm dado. Agradecimento especial a Zenilda, por todos os conselhos dados, pois sem esses conselhos, eu não teria chegado onde eu já consegui chegar. À Rachel por ouvir as minhas piadinhas de tio e reclamações todos os dias.

Agradeço também a todo o corpo docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, pelos conhecimentos transmitidos durante esses 4 anos de curso, que fizeram eu me apaixonar cada dia mais pela Biomedicina. Sou imensamente grato a Dra. Renata, coordenadora do curso, que fez o que pode por mim, sempre ouvindo meus pedidos que não foram poucos. Grato pela oportunidade que me concedeu.

Gostaria de agradecer a Tânia do laboratório modelo, que sem ela me empurrando, falando: vai atrás, levanta, liga lá, rsrs, eu não teria nem começado o curso. Aproveitando, agradeço também a equipe do laboratório modelo, pela oportunidade dada a mim, mesmo antes de iniciar o curso. Sou grato a Dra. Roseli, ao Elton, a Regina e a Eliane por tudo!

Finalmente, agradeço a toda equipe, e especialmente a Beatriz, do laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina do ABC por me orientar em um trabalho experimental com relevância para a ciência. Obrigado por me deixar fazer parte disso e por todo o conhecimento passado. Obrigado também a toda a equipe do laboratório.

E um muito obrigado a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação. Tenham certeza que sou extremamente grato.

“Cada um terá a vista da montanha que
subir.”

Ícaro Fonseca

RESUMO

FERREIRA, A.C. **Avaliação da expressão de *GLUT-1* como marcador de diagnóstico e prognóstico em câncer de mama em biópsias líquidas**. 2018. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

Introdução. As neoplasias da mama são a principal causa de mortalidade por câncer entre mulheres. A progressão tumoral caracteriza-se por um rápido crescimento celular acompanhado por alterações no microambiente das células tumorais e a manutenção do crescimento da célula tumoral exige um alto gasto bioenergético. O processo celular mais eficiente de geração de energia é o metabolismo da glicose. A glicose é uma molécula polar e insolúvel, de forma que sua entrada ou saída da célula por difusão facilitada depende de proteínas de transporte. O transportador de glicose mais amplamente expresso é o *GLUT1*, que é responsável pela absorção basal de glicose. Sua expressão aumentada tem sido observada em doenças malignas. **Objetivos.** Neste estudo, pretendeu-se avaliar a expressão do gene *GLUT1* (*SLC2A1*) em amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de mama. **Material e Métodos.** A expressão do gene *GLUT1* foi avaliada por PCR em tempo real em amostras de tumor e em amostras seriadas de sangue periférico de 33 pacientes com câncer de mama e doadoras saudáveis (controle). **Resultados.** O gene *GLUT1* mostrou-se mais expresso no sangue periférico de pacientes com câncer de mama do que nas amostras das doadoras saudáveis. A expressão de *GLUT1* está associada com a progressão da doença e correlacionada com a expressão de *CD147*, um marcador de prognóstico. **Conclusão.** A expressão de *GLUT1* no sangue periférico possui potencial diagnóstico e prognóstico em pacientes com câncer de mama.

Palavras-chave: Transportador de Glicose Tipo-1. Neoplasia de mama. Biópsia líquida. Metabolismo tumoral.

ABSTRACT

FERREIRA, A. C. **Evaluation of *GLUT-1* expression as a marker of diagnosis and prognosis in breast cancer in liquid biopsies.** 2018. 45F. Completion coursework (Bachelor degree in Biomedicine) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

Introduction. Breast neoplasms are the leading cause of cancer mortality among women. Tumor progression is characterized by rapid cell growth accompanied by changes in the microenvironment of tumor cells and maintenance of tumor cell growth requires high bioenergetic expenditure. The most efficient cellular process of generating energy is glucose metabolism. Glucose is a polar and insoluble molecule, so that its entry or exit from the cell by facilitated diffusion depends on transport proteins. The most widely expressed glucose transporter is *GLUT1*, which is responsible for basal glucose uptake. Its increased expression has been observed in malignant diseases. Goals. In this study, it was intended to evaluate *GLUT1* gene expression (*SLC2A1*) in peripheral blood samples from patients with breast cancer. Material and methods. *GLUT1* gene expression was assessed by real-time PCR in tumor samples and serial peripheral blood samples from 33 breast cancer patients and healthy donors (control). Results. The *GLUT1* gene was shown to be more expressed in the peripheral blood of breast cancer patients than in healthy donor samples. *GLUT1* expression is associated with disease progression and correlated with expression of *CD147*, a marker of prognosis. Conclusion. *GLUT1* expression in peripheral blood has diagnostic potential and prognosis in patients with breast cancer.

Keyword: Glucose transporter 1. Mammary neoplasms. Liquid biopsy. Tumor metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema simplificado da entrada de glicose na célula pela proteína GLUT 1	16
Figura 2 – Biópsia líquida: Tumores sólidos podem lançar (1) DNA e RNA de tumor circulante, (2) CTCs apoptóticas, ou (3) CTCs integras na circulação. (4) Podem ser lançados DNA e RNA de tumor circulante na corrente sanguínea após morte de células tumorais por necrose ou apoptose.	18
Figura 3 - Curva de melting (a) e perfil de amplificação (b) do gene RPL13a e curva de melting (c) e perfil de amplificação (d) do gene-alvo <i>GLUT1</i>	26
Figura 4 - Representação gráfica da diferença de expressão do gene <i>GLUT1</i> em amostras de sangue periférico de mulheres saudáveis (doadoras) e pacientes (coletadas ao diagnóstico). Teste de Mann-Whitney.....	28
Figura 5 - Representação gráfica da diferença de expressão (valores absolutos) de <i>GLUT1</i> de acordo com a progressão da doença ao longo do tratamento. Teste de Mann-Whitney..	29
Figura 6 - Representação gráfica da diferença de expressão de <i>GLUT1</i> no sangue periférico das pacientes de acordo com o estadiamento da doença. a) 1ª coleta; b) 2ª coleta; c) 3ª coleta. Teste de Kruskal-Wallis.	31
Figura 7 - Representação gráfica da correlação entre a expressão de <i>GLUT1</i> e MCT1 e <i>GLUT1</i> e CD147. Teste de correlação de Spearman.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

5-Fu IC50 - Fluorouracil

ABC – *ATP-binding cassette*

ATP – adenosina trifosfato

cDNA – DNA complementar

CTC – células tumorais circulantes

CK-19 – citoqueratina 19

FMABC – Faculdade de Medicina do ABC

GLUT - transportadores de glicose

mRNA – RNA mensageiro

PCR – reação da polimerase em cadeia

RT-PCR - transcrição reversa seguida de PCR

qPCR - PCR quantitativo

SGLTs - simportadores de sódio-glicose

SLC – *Solute carrier* / Carreadoras de soluto

Ta – Temperatura de anelamento

TrpC5 -*permeable transient receptor potential channel 5*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Avaliação da dinâmica tumoral durante o tratamento: biópsia líquida.....	17
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Pacientes.....	21
3.2 Extração de RNA.....	21
3.3 Síntese de cDNA.....	22
3.4 qPCR.....	22
3.5 Análise estatística	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Pacientes.....	25
4.2 Amplificação do gene-alvo e gene-referências.....	26
4.3 Análises comparativas	27
4.3.1 Para estudo do comportamento do <i>GLUT1</i> em amostras de tumor e de sangue periférico.....	27
4.3.2 Para estudo do potencial clínico do marcador proposto.....	27
4.3.3 Análise comparativa entre a expressão do marcador no sangue periférico ao diagnóstico de acordo com a progressão da doença (positiva/ negativa) e seu estadiamento.....	29
4.4 Correlação entre a expressão de <i>GLUT1</i> e <i>MCT1</i> e <i>GLUT 1</i> e <i>CD147</i>	32
5 CONCLUSÃO.....	34

REFERÊNCIAS.....	35
ANEXOS	35

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias da mama são a principal causa de mortalidade por câncer entre mulheres. De acordo com a estimativa do Instituto Nacional do Câncer para o ano de 2018, são esperados 59.700 novos casos de câncer de mama no Brasil, com um risco estimado de 56,2 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018).

O câncer de mama é uma doença clinicamente heterogênea e aproximadamente 10-15% das pacientes apresentam uma doença agressiva e desenvolvem metástase à distância nos três primeiros anos após a detecção do tumor primário. Nestas pacientes, mais do que o tumor primário, as metástases a distância são a principal causa de mortes (Weigelt e col., 2005). Assim, pacientes com câncer de mama vivem sob o risco do desenvolvimento de metástases. A natureza heterogênea destas metástases faz com que seja difícil não apenas a definição da cura, como também dos fatores de risco para seu desenvolvimento. Como ainda não é possível prever com precisão o risco de desenvolvimento de metástases para pacientes individuais, mais de 80% delas recebem a quimioterapia adjuvante, embora muitas pudessem se beneficiar apenas com o tratamento local (cirurgia e radioterapia) (EBCTCG e col., 2012). Assim, muitas pacientes sofrem com os efeitos tóxicos da quimioterapia desnecessariamente, o que torna evidente a importância de marcadores que possam prever o risco de desenvolvimento de metástase.

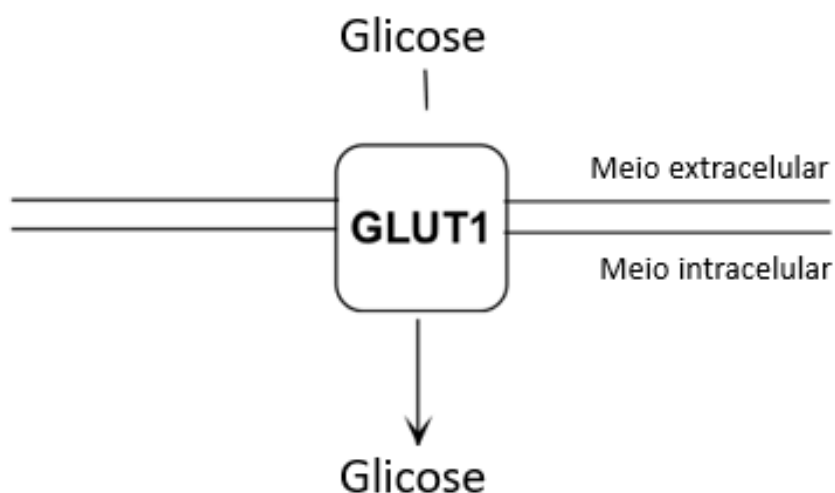
A progressão tumoral (i.e. proliferação, invasão e metástase) caracteriza-se por um rápido crescimento celular acompanhado por alterações no microambiente das células tumorais (Vaupel, 2004) e a manutenção do crescimento da célula tumoral exige um alto gasto bioenergético (Curry e col., 2013). O processo celular mais eficiente de geração de energia é o metabolismo da glicose: os produtos de sua quebra, como o piruvato, são utilizados no ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa na mitocôndria na presença de oxigênio, processo que gera 38 moléculas de adenosina trifosfato (ATP) por glicose (Thorne e Campbell, 2015). Assim, o suprimento adequado de oxigênio e glicose é essencial para o funcionamento celular, uma vez que é necessário para manter as reservas energéticas celulares apropriadas, principalmente na forma de ATP.

A glicose é uma molécula polar e insolúvel, de forma que sua entrada ou saída da célula por difusão facilitada depende de proteínas de transporte. Proteínas de transporte têm a função de intermediar a translocação de substratos através das membranas celulares, tanto do meio extracelular para o intracelular, como vice-versa (Xie e col., 2018). Duas superfamílias de proteínas de transporte – *ATP-binding cassette* (ABC) e carreadoras de solutos (*solute carrier* – SLC) – são amplamente expressas pelos órgãos e tecidos do corpo humano em diferentes quantidades (*The International Transporter Consortium*, 2010). Diferentemente dos transportadores ABC, que intermedeiam o efluxo ativo (dependente de energia) de substratos intracelulares, a família SLC realiza basicamente a captação de pequenas moléculas (He e col., 2009). Existem aproximadamente 400 proteínas SLC que estão divididas em 52 subfamílias, de acordo com sua similaridade de sequência (Li e Shu, 2014). Cada subfamília SLC em particular apresenta alta seletividade e interage apenas com um grupo restrito de substrato. Em condições fisiológicas, algumas proteínas SLC possuem papel importante na manutenção da homeostase corporal, uma vez que facilitam a captação de algumas moléculas essenciais para a vida, como nutrientes, íons, aminoácidos e glicose (Colas e col., 2016).

Considerando a glicose, existem dois diferentes tipos de proteínas transportadoras desta molécula nas células humanas: os GLUT (transportadores de glicose) e os SGLTs (simportadores de sódio-glicose). Ambos pertencem a famílias de genes carreadores de soluto (SLC) (Scheepers, 2004). O principal regulador do transporte da glicose em células tumorais são os GLUT. A maioria das proteínas GLUT catalisa o transporte bidirecional da glicose. Esta família (também conhecida por *SCL2A*) é composta por 14 membros, que possuem especificidade tecidual a diferentes hexoses, uratos, glicosaminas e ascorbatos. Pelo menos uma proteína GLUT é expressa em cada um dos diferentes tipos celulares humanos (Mueckler e Thorens, 2013). Os membros desta família de facilitadores estão agrupados em três classes, com base em similaridade de sequência. A Classe 1 compreende os GLUTs 1 a 4 e o 14; GLUT 1 a 4 são as proteínas facilitadoras de transporte de glicose mais descritas até o momento; *GLUT 1* possui expressão ubíqua e é responsável pelo suprimento celular básico de glicose. A Classe 2 compreende os GLUTs 5, 7, 9 e 11,

transportadores específicos para frutose, e a Classe III, os GLUTs 6, 8, 10, 12 e HMIT (Scheepers e col., 2004; Mueckler e Thorens, 2013).

Figura 1: Esquema simplificado da entrada de glicose na célula pela proteína GLUT 1



Fonte: Adaptado de *LIMITED LIABILITY COMPANY*, 2018

Algumas células tumorais dependem da glicólise ao invés da fosforilação oxidativa para produção de energia, fenômeno conhecido por Efeito de Warburg (Warburg, 1956). Assim, para satisfazer sua demanda de energia, estas células possuem uma taxa elevada de consumo de glicose (Oh e col., 2017). Diversos transportadores de glicose já foram descritos como super-expressos em diferentes tipos de tumores (Mazurek e col., 2005). O transportador de glicose mais amplamente expresso é o *GLUT-1*, que é responsável pela absorção basal de glicose (Wood e col., 2003). O *GLUT-1* foi originalmente purificado de eritrócitos e também é encontrado em células endoteliais da barreira hematoencefálica, olhos, placenta, nervos periféricos e glândulas mamárias em lactação (Zhao e Keating, 2007). Em geral, *GLUT-1* é indetectável em células epiteliais saudáveis ou em tumores epiteliais benignos, mas sua expressão aumentada tem sido observada em doenças malignas. De fato, expressão elevada de *GLUT-1* tem sido correlacionada com proliferação celular e com pior prognóstico em diferentes tipos de câncer, inclusive o câncer de mama (Kunkel e col., 2003; Kang e col., 2002). No câncer de mama triplo negativo (*basal-like*, *TNBC*), por exemplo, a expressão de *GLUT-1* também tem sido associada

com o maior grau histológico, negatividade para ER, PR, CK5/6, expressão de EGFR e expressão aumentada de p53.

O mecanismo que está por trás da regulação do *GLUT-1* no câncer envolve diferentes moléculas e vias de sinalização, tais como a via de sinalização PI3K/Akt, o fator 1 de indução de hipóxia (*HIF-1*), Ras, c-Myc e a proteína supressora de tumor p53 (Zhao e Keating, 2007).

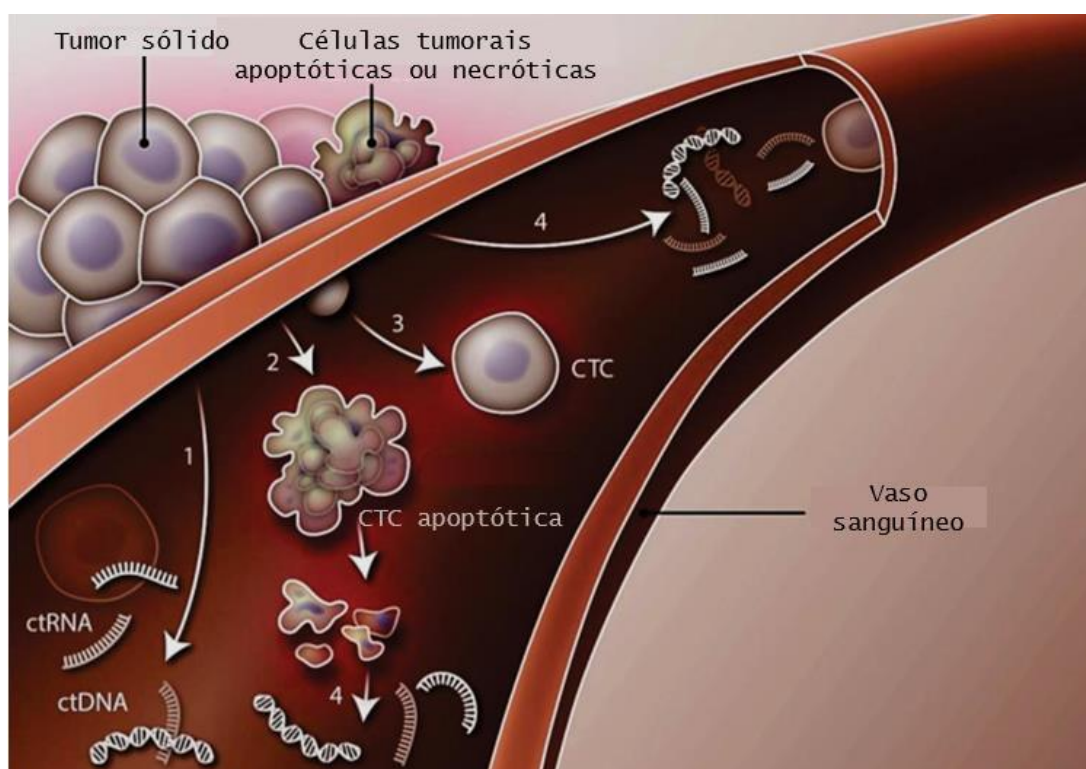
1.1 Avaliação da dinâmica tumoral durante o tratamento: biópsia líquida

A biópsia sólida (ressecção do tumor) não pode ser frequentemente realizada por ser um procedimento invasivo e, em muitos casos, com o tumor presente em locais de difícil acesso. Assim, é de grande importância clínica que métodos menos invasivos de avaliação da dinâmica tumoral sejam desenvolvidos e aplicados durante todo o processo de tratamento. Em tumores sólidos (como no caso do câncer de mama), células tumorais podem se disseminar a partir do tumor primário durante sua evolução. Essas células podem permanecer no organismo após a remoção do tumor e atualmente não são detectáveis por meio de metodologias propedêuticas convencionais, o que caracteriza a doença residual mínima (Diel & Cote, 2000; Ring e col., 2004). Estas células tumorais circulantes (CTC) presentes no sangue periférico das pacientes tem chamado a atenção da comunidade médica porque a análise de mutações ou de expressão gênica destas células pode ser uma ferramenta valiosa para o monitoramento do tumor ao longo do tratamento (Ma e col., 2015). Técnicas de detecção e caracterização da CTC têm o potencial de desempenhar o papel de “biópsia líquida” (figura 2) que permitirá aos clínicos acompanhar o desenvolvimento e progressão do tumor e determinar o melhor tratamento para aquele paciente.

Em pacientes com câncer de mama, a detecção das CTC no sangue periférico já foi associada com reduzida sobrevivência geral e livre de progressão. A detecção da expressão de citoqueratina 19 (CK-19) em CTCs no sangue após quimioterapia adjuvante é um fator de risco independente que indica a presença de doença residual resistente à quimioterapia (Apostolaki e col., 2007; Ignatiadis e col., 2007; Strati e col., 2011). Tais estudos demonstram que é possível pesquisar células epiteliais no sangue periférico de pacientes com câncer de mama metastático e que a sua presença pode

ser quantificada. Como as CTCs são altamente heterogêneas, sua caracterização molecular através do estudo da expressão de diferentes genes é de suma importância não apenas para confirmar sua origem, como também para detectar alterações fenotípicas associadas à progressão do tumor e resistência ao tratamento quimioterápico.

Figura 2 – Biópsia líquida: Tumores sólidos podem lançar (1) DNA e RNA de tumor circulante, (2) CTCs apoptóticas, ou (3) CTCs integras na circulação. (4) Podem ser lançados DNA e RNA de tumor circulante na corrente sanguínea após morte de células tumorais por necrose ou apoptose.



Fonte: adaptado de Schweizer e Antonarakis (2015)

Técnicas de imunohistoquímica e técnicas moleculares como a reação da polimerase em cadeia (PCR) e suas variações, como o RT-PCR (transcrição reversa seguida de PCR) e qPCR (PCR quantitativo) são amplamente utilizadas para detecção de células epiteliais em pacientes com câncer de mama. Em nosso grupo, Novaes e colaboradores mostraram que a sensibilidade da técnica de RT-PCR para a detecção de células que expressam CK-19 na fração mononuclear do sangue periférico era de 1 para 10^6 (Novaes e col., 1997). Os autores também correlacionam

a expressão de CK-19 com resposta à quimioterapia neoadjuvante, adjuvante ou paliativa. Slade e col. (1999) compararam as técnicas de RT-PCR quantitativo e de imunodeteção de células circulantes e encontraram boa correspondência entre ambas as técnicas; achados positivos por ambas as técnicas também tiveram correspondência com o prognóstico das pacientes estudadas (Smith e col., 2000).

Pelo acima exposto, as células regulam o metabolismo da glicose de acordo com seu *status* de crescimento e diferenciação, bem como de acordo com o suprimento de oxigênio. A discrepância entre a alta taxa de crescimento tumoral e a revascularização para suprimento do oxigênio e nutrientes fazem com que sua adaptação ao ambiente de hipóxia seja a base da sobrevivência e crescimento destas células. No processo de reprogramação metabólica, as células tumorais se adaptam à hipóxia via aumento da glicólise. Assim, a indução da glicólise é essencial para a sobrevivência da célula tumoral em condições de hipóxia e acidificação do microambiente extracelular. Por causa de sua função essencial à célula, diversos estudos retrospectivos ou prospectivos têm revelado a importância clínica das proteínas SLC como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico de diferentes tipos de tumores (Xie e col., 2018). Salienta-se que as propriedades celulares do *GLUT1* têm sido extensivamente utilizadas na tomografia de emissão de pósitron para a detecção e avaliação de resposta terapêutica em combinação com o análogo da glicose 2-[18F]-fluoro-2-deoxi-D-glicose (FDG) como um radiotraçador (Godoy e col., 2009).

Portanto, neste estudo pretende-se avaliar a expressão do gene *GLUT1* (*SLC2A1*) em amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de mama atendidas no ambulatório de oncologia da Faculdade de Medicina do ABC (FMABC), bem como em sangue periférico de doadoras saudáveis. Até o momento, este gene não teve sua expressão avaliada em outro material biológico que não peça tumoral por nenhum grupo de pesquisa.

2 OBJETIVOS

1. Avaliação seriada da expressão do gene *GLUT1* em amostras de tumor e sangue periférico de 33 pacientes com câncer de mama precoce e localmente avançado, antes e durante o tratamento quimioterápico adjuvante ou neoadjuvante, e de doadoras saudáveis (sangue periférico), oriundas da Faculdade de Medicina do ABC,
2. Correlação dos dados moleculares com a expressão de outro marcador de metabolismo tumoral (MCT1 e CD147) já analisado pelo grupo em trabalho anterior (processo FAPESP 2014/ 17693-1)
3. Correlação dos dados moleculares com as demais variáveis clínicas e patológicas das pacientes incluídas no estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular e Análises Clínicas da Faculdade de Medicina do ABC, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional nº 2.433.922, disponível em anexo.

Para avaliação da expressão de *GLUT1* e associação com variáveis patológicas como grau de diferenciação e status de progressão da doença, foram analisadas 33 pacientes com câncer de mama, provenientes do serviço de oncologia da FMABC. Destas pacientes, foram obtidas amostras de sangue periférico ao diagnóstico e 3 e 6 meses após o início do tratamento quimioterápico, bem como amostras de biópsia do tumor original, nos casos em que foi feita quimioterapia neoadjuvante, ou da peça operatória, nos casos em que se fez quimioterapia adjuvante. Como controle, foram utilizadas amostras de sangue periférico de 25 mulheres saudáveis (doadoras). Todas as pacientes e doadoras saudáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (CAAE 15959913.7.0000.0082 e 74089417.2.0000.0082) disponível em anexo.

3.2 Extração de RNA

Para a análise da expressão genica dos alvos estudados em tumores, após desparafinização das peças tumorais com 1 mL de xilol, foi utilizado o kit RNeasy® FFPE Kit (Qiagen, cat. no 74404) para se obter o RNA, seguindo as recomendações do fabricante.

Para a análise da expressão gênica em biópsia líquida, foram coletados por punção venosa 15 mL de sangue periférico e com o reagente TRIzol (TRIzol LS Reagent, Thermo Fisher Scientific cat. no. 10296-010, Waltham, MA, USA), seguindo as recomendações do fabricante, foi obtido o RNA total da fração leucocitária. A concentração e a razão A260/A280 do RNA total foi mensurada por espectrofotometria com o NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.3 Síntese de cDNA

As amostras de RNA (0,5µg inicial) foram convertidas em cDNA com auxílio do *QuantiTect Reverse Transcription kit* (Qiagen, cat no 205311), seguindo as recomendações do fabricante.

3.4 qPCR

A expressão do gene *GLUT1* foi avaliada por PCR em tempo real (qPCR). Os *primers* específicos para este gene foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3 Input 0.4.0 software*, disponível no endereço <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. As sequências de *primers* assim desenhadas foram checadas quanto a sua especificidade pelo programa *Primer-BLAST*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. A sequência dos *primers* desenhados e características de seus amplicons encontram-se descritos no quadro 1.

Para a normalização da expressão relativa do gene-alvo, foram utilizados valores médios de expressão do gene *β-actina*, proteína envolvida na motilidade, estrutura e integridade celular, do gene *HPRT* que codifica uma enzima transferase que participa do metabolismo de nucleotídeos e do gene *RPL13a*, que codifica uma proteína que faz parte da subunidade de 60S dos ribossomos.

A padronização inicial das amplificações por PCR em tempo real ocorreu em um termociclador *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em um volume final de 15 µL contendo: 1X SYBR Green mix (Quantitec SYBR Green PCR kit, QIAGEN cat. no. 204054), 15 pmol de cada *primer* específico e 2 µL cDNA (diluídos inicialmente 10X). Os parâmetros cíclicos iniciais foram de um passo inicial de hot start a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 repetições de 95°C por 15 segundos e 61°C por 25 segundos.

A curva de calibração para o gene sob estudo foi feita com diluições seriadas de cDNA sintetizado a partir de 1 ug de mRNA da linhagem celular MDA-MB-231 (câncer de mama metastático). Foram utilizados 5 pontos, com fator de diluição de log10.

Quadro 1. Características dos *primers* específicos e seus amplicons.

GENE	SEQUÊNCIA (5' - 3')	AMPLICON (bp)
<i>GLUT1</i>	F- CCCAGAAGGTGATCGAGGAG R- CCAGCAGGTTTCATCATCAGC	201
Beta-actina	F - CCCTGGAGAAGAGCTACGAG R – CAATGCCAGGGTACATGGTG	225
<i>HPRT</i>	F- CCTGGCGTCGTGATTAGTGA R- GCCTCCCATCTCCTTCATCA	162
<i>RPL13α</i> (18S)	F- TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA R- CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	126

A diferença de expressão entre nas diferentes matrizes biológicas foi determinada pela fórmula $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. A expressão do *GLUT1* foi determinada pela fórmula $2^{-(\Delta Cq)}$.

3.5 Análise estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva na qual as variáveis definidas serão expressas em frequências absolutas e relativas e as variáveis quantitativas serão resumidas em médias, desvios-padrão, valores mínimos e máximos. Para avaliação do comportamento (expressão) dos genes propostos nas pacientes com câncer de mama e nas doadoras (mulheres saudáveis = grupo controle) foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Além disso, a análise de Kruskal-Wallis para medidas repetidas foi usada para comparar a evolução da expressão dos genes propostos ao longo do tempo. Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa

GraphPad Prism 6.0. Para todas as análises utilizou-se intervalo de confiança de 95%. Foi considerado estatisticamente significativo os valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Pacientes

Neste trabalho, foram incluídas 33 pacientes com câncer de mama e 25 doadoras saudáveis (controles). De cada paciente, foram analisadas 4 amostras: 1 amostra tumoral e 3 amostras de sangue periférico, coletadas ao diagnóstico e após 3 e 6 meses de tratamento quimioterápico. Das doadoras saudáveis, foi coletada apenas uma amostra de sangue periférico. A Tabela 1 mostra as características clínicas das pacientes incluídas neste estudo que foram utilizadas nas análises deste trabalho.

Tabela 1. Características clínicas das pacientes incluídas.

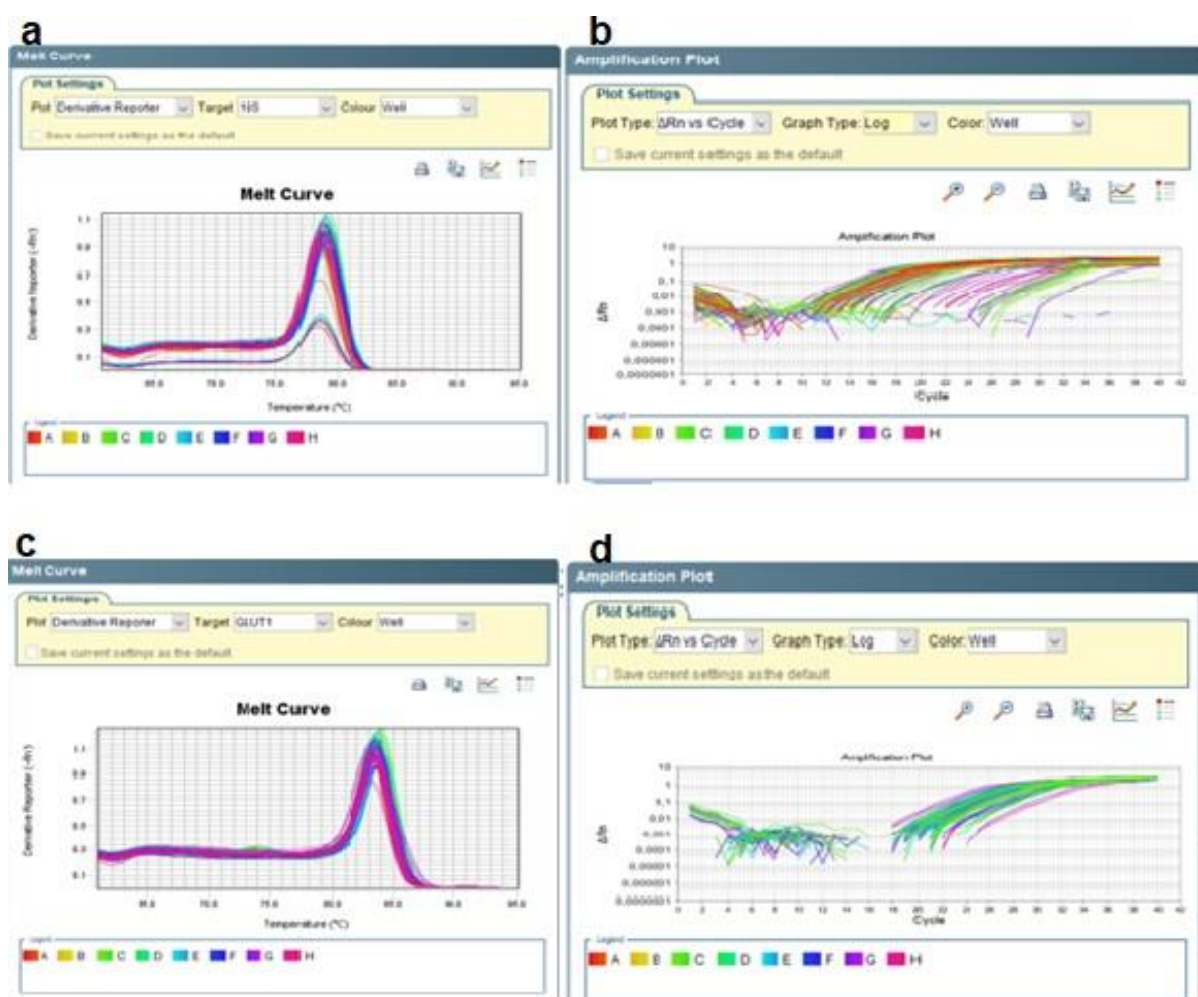
Variáveis	n	%
<i>Estadio</i>		
I	08	24,24
II	14	42,42
III	11	33,34
<i>Progressão</i>		
Negativa	30	90,9
Positiva	03	9,1
<i>Idade</i>		
	Média (dp)	Mínimo - Máximo
	52,5 (11,16)	27; 78

4.2 Amplificação do gene-alvo e gene-referências

As reações de padronização de amplificação do gene-alvo determinaram que para todos os genes, a concentração ideal de primer específico foi de 0,15 μ molar, com temperatura de anelamento (T_a) de 61°C.

O perfil de amplificação e as curvas de melting para os genes *GLUT1* e *RPL13a* encontram-se na Figura 3. Como pode ser visto, apenas um produto de amplificação pode ser obtido nestas amplificações. O mesmo se deu para os demais genes-referência.

Figura 3 - Curva de melting (a) e perfil de amplificação (b) do gene *RPL13a* e curva de melting (c) e perfil de amplificação (d) do gene-alvo *GLUT1*.



4.3 Análises comparativas

Uma vez determinadas as condições de amplificação para os genes-alvo, deu-se início às análises do material das pacientes e doadoras. Com o intuito de conhecer o perfil de expressão de *GLUT1* em CTC, realizou-se uma série de comparações de expressão relativa que visou mensurar alterações em sua expressão em situações diversas, considerando sempre uma amostra – ou uma situação fisiológica – em relação à outra (amostra calibradora). Estas comparações indicam a diferença de expressão entre estas situações e, segundo Pfaffl (2006), são a ferramenta mais adequada para estudar alterações fisiológicas com base em alterações de expressão gênica. Assim, foram determinadas as seguintes diferenças de expressão e análises comparativas:

4.3.1 Para estudo do comportamento do *GLUT1* em amostras de tumor e de sangue periférico

Trata-se de um estudo técnico, para verificação de detecção de expressão dos marcadores nas amostras biológicas obtidas.

As amostras de tumor das 33 pacientes incluídas apresentaram expressão de *GLUT1*. Entretanto, não houve diferença de expressão significativa entre as pacientes considerando o estadiamento clínico ou status de progressão da doença. Da mesma maneira, a expressão do gene *GLUT1* foi detectada em todas as amostras sangue periférico das pacientes e das doadoras.

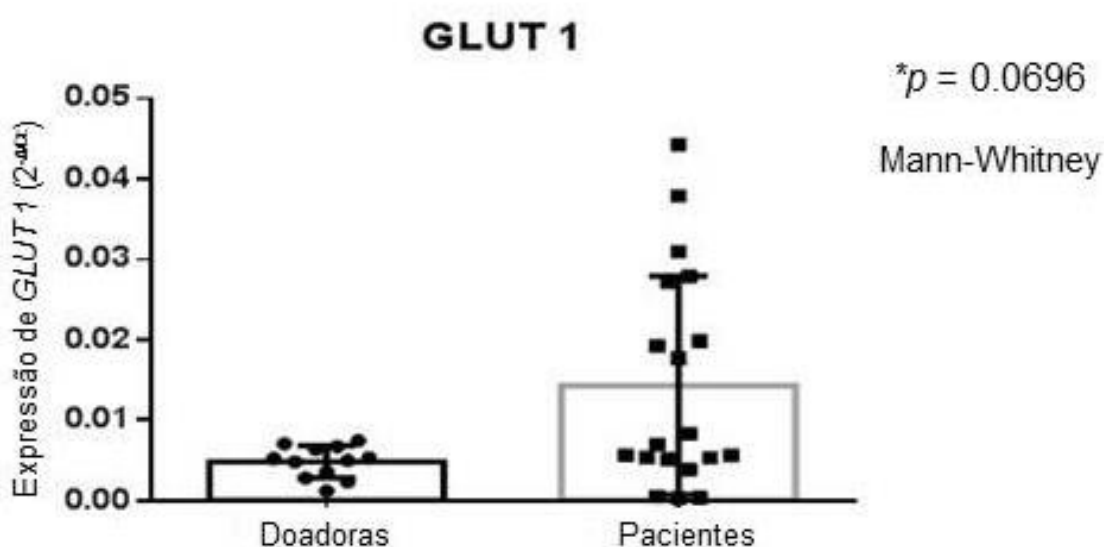
4.3.2 Para estudo do potencial clínico do marcador proposto

Inicialmente, foi realizada uma comparação da expressão do marcador proposto em amostras de sangue periférico de pacientes com câncer ao diagnóstico e de mulheres saudáveis (doadoras, consideradas amostras-controle), para verificar se há detecção destes marcadores no sangue periférico de mulheres saudáveis e, em caso afirmativo, se há diferenças na intensidade desta expressão em relação às pacientes.

Em relação às doadoras saudáveis, o marcador sob estudo no sangue das pacientes apresenta expressão média aumentada em 1,95 vezes. O teste Mann-Whitney mostrou que há uma tendência ao aumento da expressão deste gene nas portadoras de câncer de mama ($0,004855 \pm 0,001991$ $n=12$, $p=0,0696$) em relação as doadoras saudáveis ($0,01436 \pm 0,01358$, $n=19$) (Figura 4).

Este resultado sugere que *GLUT1* possui potencial diagnóstico para câncer de mama em amostras de sangue periférico. O potencial diagnóstico da expressão aumentada de *GLUT1* já é bem conhecido. Como dito anteriormente, diversos estudos já demonstraram a presença de uma expressão elevada de *GLUT1* em diferentes tipos de tumores (Adekola e col., 2012). Entretanto, o valor diagnóstico da expressão deste gene medida em sangue periférico ainda não havia sido testada.

Figura 4 - Representação gráfica da diferença de expressão do gene *GLUT1* em amostras de sangue periférico de mulheres saudáveis (doadoras) e pacientes (coletadas ao diagnóstico). $*p < 0.05$ vs doadoras. Teste de Mann-Whitney.

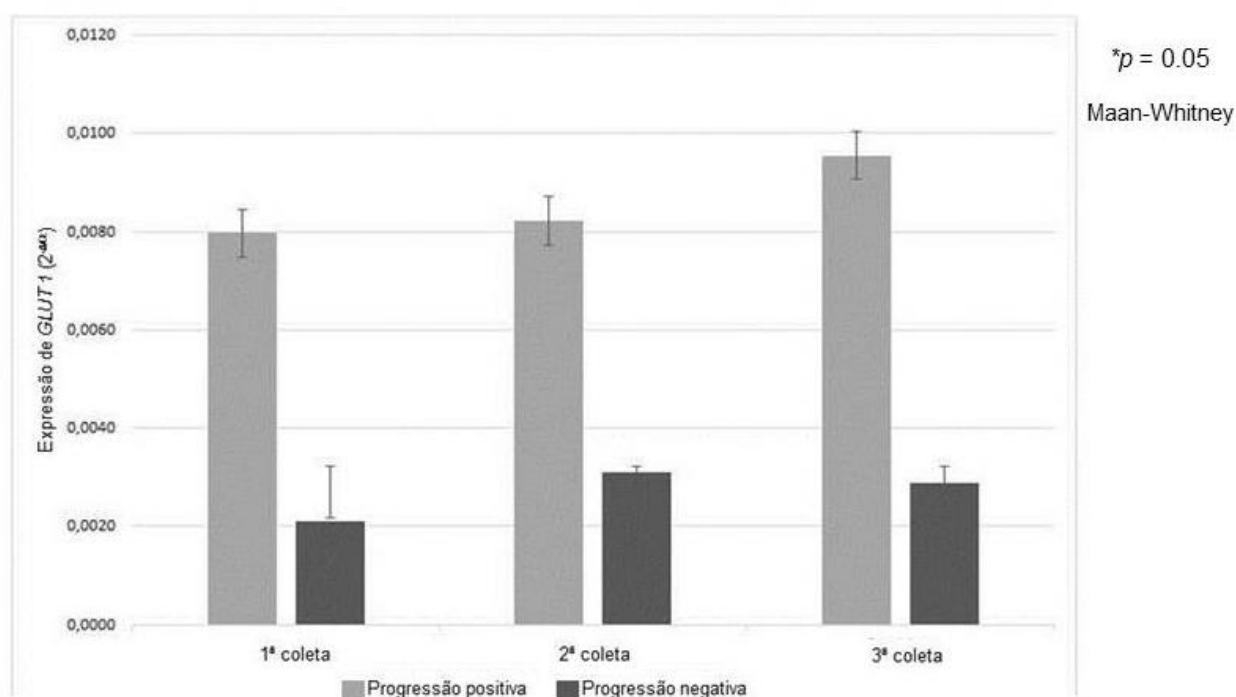


4.3.3 Análise comparativa entre a expressão do marcador no sangue periférico ao diagnóstico de acordo com a progressão da doença (positiva/ negativa) e seu estadiamento.

Embora poucas pacientes tenham apresentado progressão positiva da doença, o que inviabiliza as análises estatísticas da expressão diferencial de *GLUT1* de acordo com o status da doença, percebe-se que há uma tendência ao aumento da expressão de *GLUT1* ao longo do tratamento nestas pacientes (Figura 5). Ao contrário, as pacientes que apresentaram uma progressão negativa da doença tiveram uma queda da expressão deste gene após 6 meses de tratamento quimioterápico.

A diferença de expressão do gene *GLUT1* ao diagnóstico não está relacionada com o estadiamento da doença. O mesmo foi observado nas demais coletas após o início do tratamento (Figura 6). Estes resultados sugerem que este gene, em biópsias líquidas, é um marcador em potencial de resposta ao tratamento.

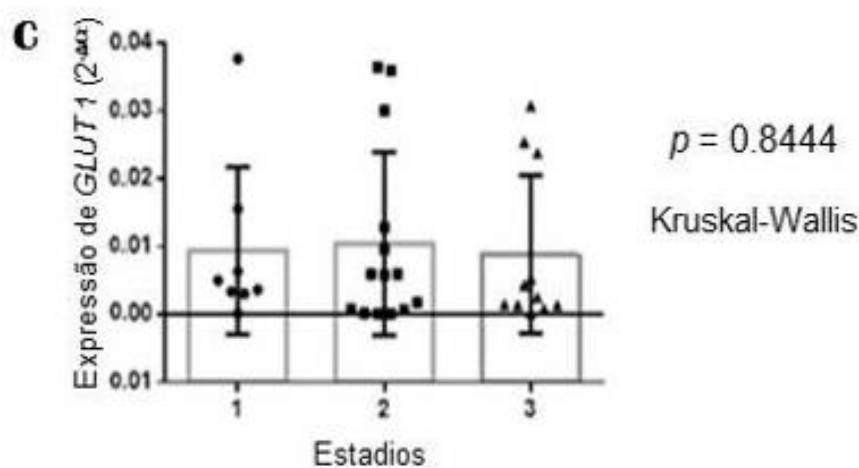
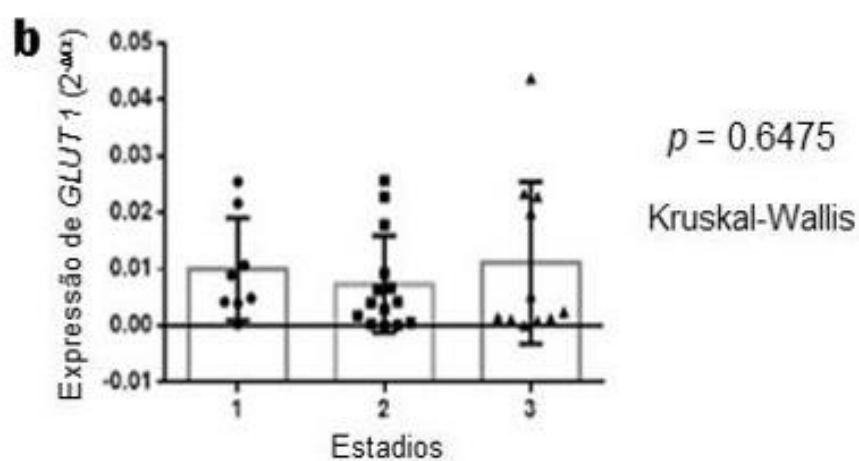
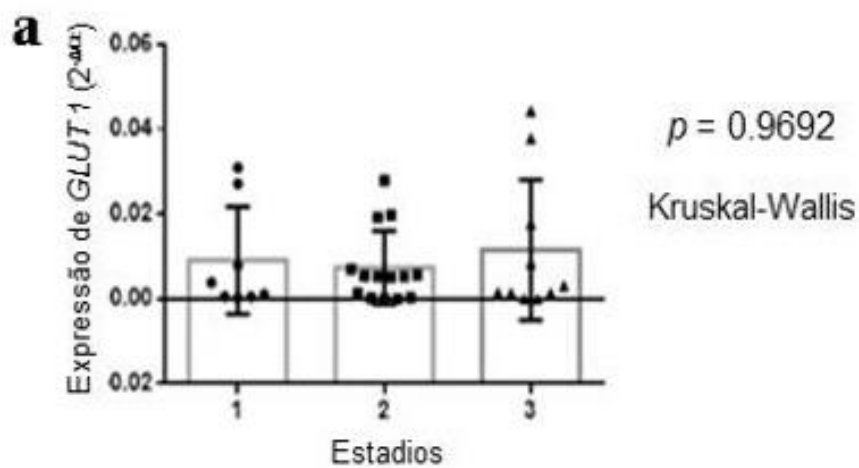
Figura 5 - Representação gráfica da diferença de expressão (valores absolutos) de *GLUT1* de acordo com a progressão da doença ao longo do tratamento. * $p < 0.05$ vs progressão positiva. Teste de Mann-Whitney. Valores expressos em média $\pm$ DP.



Trabalhando com cultura de células de câncer colorretal, Wang e col. (2018) determinam a atividade glicolítica através da expressão de *GLUT1*, consumo de glicose e produção de ATP. Segundo os autores, células com resistência ao tratamento com Fluorouracil (5-Fu IC50) apresentaram expressão aumentada de *GLUT1* em comparação com células sensíveis. Trabalhando com amostras tumorais de pacientes com câncer colorretal, o mesmo grupo já havia descrito o valor preditivo de resistência à quimioterapia (5-Fu IC50) da expressão de *GLUT1* (Wang e col. 2017). Neste trabalho, entretanto, os autores postulam que a expressão elevada de *GLUT1* está acompanhada – ou é – ativada – pela alta expressão de TrpC5 (*Ca²⁺-permeable transient receptor potential channel 5*), gene cuja proteína ativa a via de sinalização Wnt/B-catenina.

Em pacientes com leucemia mielóide aguda, a expressão de *GLUT1* também se mostrou maior em pacientes sem remissão quando comparada à obtida em pacientes em remissão completa ou parcial, resultados que fortalecem o valor prognóstico de *GLUT1* (Song e col., 2016). Ainda corroborando o papel de marcador de prognóstico de *GLUT1*, em uma meta-análise, Zhao e col. (2017) analisaram 41 estudos com um total de 4797 pacientes, nos quais a expressão aumentada de *GLUT1* foi significativamente associada com pior prognóstico de diferentes tipos de câncer.

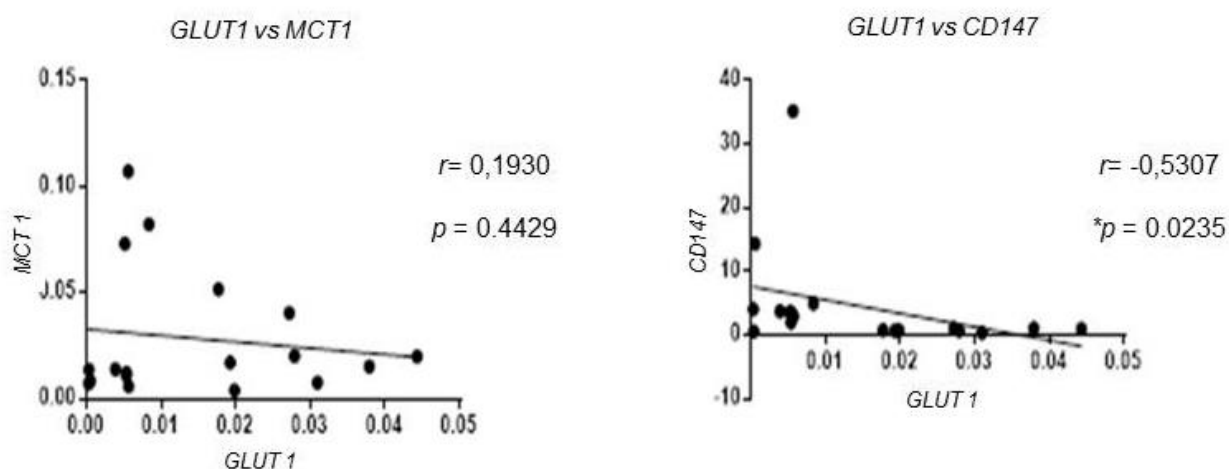
Figura 6 - Representação gráfica da diferença de expressão de *GLUT1* no sangue periférico das pacientes de acordo com o estadiamento da doença. a) 1ª coleta; b) 2ª coleta; c) 3ª coleta. Teste de Kruskal-Wallis.



4.4 Correlação entre a expressão de *GLUT1* e *MCT1* e *GLUT1* e *CD147*

Em trabalho anterior, nosso grupo verificou que as amostras de sangue destas pacientes coletadas ao diagnóstico possuem expressão do transportador de monocarboxilato *MCT1* e de sua proteína chaperona *CD147* aumentada em relação às doadoras (mulheres saudáveis) podendo, desta maneira, serem utilizadas em avaliações de diagnóstico. Nas pacientes que apresentaram progressão positiva da doença, a expressão destes marcadores – especialmente *MCT1*, com significância estatística, é ainda maior do que naquelas com progressão negativa (Luz e col., 2017). Como os genes *MCT1* e *CD147* estão envolvidos no metabolismo energético celular, foi realizada uma análise de correlação da expressão de *GLUT1* com *MCT1* e *CD147* ao diagnóstico (Figura 7).

Figura 7 - Representação gráfica da correlação entre a expressão de *GLUT1* e *MCT1* e *GLUT1* e *CD147*. * $p < 0.05$ $r = 0,5307$. Teste de correlação de Spearman.



Como pode ser visto, não foi encontrada correlação entre a expressão de *GLUT1* e *MCT1* no sangue periférico no momento do diagnóstico. Ao analisar amostras de tumor renal com imunohistoquímica, Ambrosetti e col. (2018) identificaram uma forte correlação entre a expressão dos genes *MCT1* e *GLUT1*. Segundo os autores, quanto maior for a expressão destes dois marcadores, pior é o prognóstico do paciente. Nossos resultados mostram que esta correlação não é encontrada em biópsia líquida de pacientes com câncer de mama. Entretanto, nesta mesma matriz biológica, encontramos uma correlação entre a expressão de *GLUT1* e *CD147* ($r = 0,53$ e

$p=0,02$). *MCT1* é regulada por *CD147*, uma glicoproteína envolvida no tráfico e ancoragem das proteínas de membrana, angiogênese e modelagem de matriz extracelular (Weidle e col., 2010). A expressão de *CD147*, por sua vez, é regulada positivamente por estímulos que aumentem a atividade metabólica da célula e levam ao estímulo da glicólise e expressão aumentada de transportadores de glicose (Halestrap e Price., 1999). O valor prognóstico de *CD147* está aparentemente associada a sua co-expressão com *MCT1*, como visto em tumores de mama e gástrico (Pinheiro e col., 2010a). Esta correlação entre dois genes com potencial prognóstico reforça a possibilidade de uso na prática clínica.

5 CONCLUSÃO

Os trabalhos que analisam a expressão de *GLUT1* o fizeram ou por imunohistoquímica ou análise de expressão gênica na peça tumoral. Nossos resultados, entretanto, mostram que é possível utilizar amostras de sangue periférico para acessar diagnóstico, resposta ao tratamento e prognóstico, uma vez que os marcadores em estudo apresentam-se mais expressos em pacientes que apresentaram progressão positiva da doença ou em doadoras saudáveis. Curiosamente, a expressão deste marcador na peça tumoral não mostrou alteração entre as pacientes de acordo com status de progressão ou estadiamento da doença, o que mostra que a avaliação deste marcador para avaliação prognóstica no sangue periférico antes do início do tratamento quimioterápico é mais eficaz do que sua análise na peça tumoral, reforçando seu potencial papel como biópsia líquida.

REFERÊNCIAS

ADEKOLA, Kehinde; ROSEN, Steven T.; SHANMUGAM, Mala. Glucose transporters in cancer metabolism. **Current Opinion In Oncology**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.650-654, nov. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/cco.0b013e328356da72>.

AMBROSETTI, Damien et al. The two glycolytic markers GLUT1 and MCT1 correlate with tumor grade and survival in clear-cell renal cell carcinoma. **Plos One**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.1-19, 26 fev. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0193477>.

APOSTOLAKI, S et al. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. **Annals Of Oncology**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.851-858, 14 fev. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdl502>.

COLAS, Claire; UNG, Peter Man-un; SCHLESSINGER, Avner. SLC transporters: structure, function, and drug discovery. **Medchemcomm**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.1069-1081, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6md00005c>.

CURRY, Joseph M. et al. Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence. **Cell Cycle**, [s.l.], v. 12, n. 9, p.1371-1384, maio 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.24092>.

DIEL, I.j.; COTE, R.j.. Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.53-65, fev. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/ctrv.1999.0150>.

(EBCTCG), Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. **The Lancet**, [s.l.], v. 379, n. 9814, p.432-444, fev. 2012. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)61625-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(11)61625-5).

GODOY, Alejandro et al. Nutritional channels in breast cancer. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 9, p.3973-3984, 13 out. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00544.x>.

HALESTRAP, Andrew P.; PRICE, Nigel T.. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. **Biochemical Society**, Scotland, v. 343, n. 1, p.281-299, jun. 1999.

HE, Lei; VASILIOU, Konstandinos; NEBERT, Daniel W. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. **Human Genomics**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.195-206, 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1479-7364-3-2-195>.

IGNATIADIS, Michail et al. Molecular Detection and Prognostic Value of Circulating Cytokeratin-19 Messenger RNA–Positive and HER2 Messenger RNA–Positive Cells in the Peripheral Blood of Women with Early-Stage Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, [s.l.], v. 7, n. 11, p.883-889, dez. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.3816/cbc.2007.n.054>.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). O câncer e mama. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/mama/cancer_mama. Acesso em 20 de junho de 2018.

KANG, Sung Soo et al. Clinical Significance of Glucose Transporter 1 (GLUT1) Expression in Human Breast Carcinoma. **Japanese Journal Of Cancer Research**, [s.l.], v. 93, n. 10, p.1123-1128, out. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2002.tb01214.x>.

KUNKEL, Martin et al. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. **Cancer**, [s.l.], v. 97, n. 4, p.1015-1024, 3 fev. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.11159>.

LI, Qing; SHU, Yan. Role of solute carriers in response to anticancer drugs. **Molecular And Cellular Therapies**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.2-15, 2014. ClinTransMed, AB. <http://dx.doi.org/10.1186/2052-8426-2-15>.

LIMITED LIABILITY COMPANY. Warburg effect. 2018. Disponível em: <www.revolvy.com/page/Warburg-effect>. Acesso em: 20 set. 2018.

LUZ, Maria et al. Evaluation of MCT1, MCT4 and CD147 Genes in Peripheral Blood Cells of Breast Cancer Patients and Their Potential Use as Diagnostic and Prognostic

Markers. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.170-181, 23 mar. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18040170>.

MA, Mingwei et al. "Liquid biopsy"—ctDNA detection with great potential and challenges. **Annals Of Translational Medicine**, Beijing, v. 3, n. 3, p.235-241, 16 set. 2015.

MAZUREK, Sybille et al. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. **Seminars In Cancer Biology**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.300-308, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcan.2005.04.009>.

MUECKLER, Mike; THORENS, Bernard. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. **Molecular Aspects Of Medicine**, [s.l.], v. 34, n. 2-3, p.121-138, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>.

NOVAES, Mafalda et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of cytokeratin 19 expression in the peripheral blood mononuclear cells of normal female blood donors. **J Clin Pathol: Mol Pathol**, Sao Paulo, p.209-211, 6 mar. 1997.

OH, Sunhwa et al. Glut1 promotes cell proliferation, migration and invasion by regulating epidermal growth factor receptor and integrin signaling in triple-negative breast cancer cells. **Bmb Reports**, [s.l.], v. 50, n. 3, p.132-137, 31 mar. 2017. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology - BMB Reports. <http://dx.doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.3.189>.

A SCHEEPERS,; JOOST, Hg; A SCHURMANN,. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **Journal Of Parenteral And Enteral Nutrition**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.364-371, set. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1177/0148607104028005364>.

RING, Alistair; SMITH, Ian e; DOWSETT, Mitch. Circulating tumour cells in breast cancer. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.79-88, fev. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(04\)01381-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(04)01381-6).

SCHWEIZER, Michael T.; ANTONARAKIS, Emmanuel S.. Liquid biopsy: Clues on prostate cancer drug resistance. **Science Translational Medicine**, [s.l.], v. 7, n. 312, p.312-317, 4 nov. 2015. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aad4008>.

SLADE, Martin J. et al. Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Detection of Micrometastases in Patients With Breast Cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.870-870, mar. 1999. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.1999.17.3.870>.

SMITH, Brendan M. et al. Response of Circulating Tumor Cells to Systemic Therapy in Patients With Metastatic Breast Cancer: Comparison of Quantitative Polymerase Chain Reaction and Immunocytochemical Techniques. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.1432-1439, 7 abr. 2000. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2000.18.7.1432>.

SONG, Kui et al. Resistance to chemotherapy is associated with altered glucose metabolism in acute myeloid leukemia. **Oncology Letters**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.334-342, 17 maio 2016. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2016.4600>.

STRATI, Areti et al. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.422-434, 4 out. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-11-422>.

CONSORTIUM, International Transporter. Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.215-236, mar. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3028>.

THORNE, James L.; CAMPBELL, Moray J.. Nuclear receptors and the Warburg effect in cancer. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 137, n. 7, p.1519-1527, 16 jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29012>.

VAUPEL, P.. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. **The Oncologist**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.10-17, 1 nov. 2004. Alphamed Press. <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.9-90005-10>.

WANG, Teng et al. Elevated expression of TrpC5 and GLUT1 is associated with chemoresistance in colorectal cancer. **Oncology Reports**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.1059-1065, 15 dez. 2016. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2016.5322>.

WANG, Teng et al. Glycolysis is essential for chemoresistance induced by transient receptor potential channel C5 in colorectal cancer. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.207-216, 20 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-018-4123-1>.

WARBURG, O.. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, [s.l.], v. 123, n. 3191, p.309-314, 24 fev. 1956. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.

WEIDLE, Ulrich H. et al. Cancer-related Issues of CD147. **Cancer Genomics & Proteomics**, Vienna, v. 7, p.157-170, 24 mar. 2010.

WEIGELT, Britta; PETERSE, Johannes L.; VEER, Laura J. Van't. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 5, n. 8, p.591-602, ago. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1670>.

WOOD, I. Stuart; TRAYHURN, Paul. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 89, n. 01, p.3-9, jan. 2003. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1079/bjn2002763>

XIE, Jing et al. Solute carrier transporters: potential targets for digestive system neoplasms. **Cancer Management And Research**, [s.l.], v. 10, p.153-166, jan. 2018. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/cmar.s152951>.

ZHAO, Feng-qi; KEATING, Aileen F.. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. **Current Genomics**, Burlington, v. 8, n. 8, p.113-128, 17 dez. 2007.

ZHAO, Zheng-xiao et al. Glucose transporter-1 as an independent prognostic marker for cancer: a meta-analysis. **Oncotarget**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.2728-2738, 4 jul. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.18964>.

ANEXOS

FACULDADE DE MEDICINA DO
ABC/FUNDAÇÃO DO ABC -
FMABC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL PROGNÓSTICO DE GENES INDUZIDOS PELA HIPÓXIA (HIF, GLUT1 E CAIX) EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Pesquisador: Beatriz da Costa Aguiar Alves Reis

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 74089417.2.0000.0082

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina do ABC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.433.922

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo que tem como foco validar o uso da expressão de HIF-1A, CAIX e GLUT1 como marcadores de prognóstico em pacientes com câncer de mama e sua associação com outros genes da via energética anteriormente estudados.

Para avaliação da expressão de HIF-1a, GLUT1 e CAIX e associação com variáveis patológicas como tamanho do tumor, grau de diferenciação e número de linfonodos axilares acometidos, serão analisadas 50 pacientes com câncer de mama, provenientes do serviço de oncologia da FMABC. Destas pacientes, serão obtidas amostras de sangue periférico ao diagnóstico e 3 e 6 meses após o início do tratamento quimioterápico, bem como amostras de biópsia do tumor original, nos casos em que foi feita quimioterapia neoadjuvante, ou da peça operatória, nos casos em que se fez quimioterapia adjuvante. As características clínicas destas pacientes serão cadastradas no Laboratório de Análises Clínicas da FMABC. Amostras de RNA total serão extraídas e serão armazenadas a -80oC. Como controle, serão utilizadas amostras de sangue periférico de 25 mulheres saudáveis (doadoras), também já obtidas e armazenadas no laboratório de Análises Clínicas da FMABC. Todas as pacientes e doadoras saudáveis assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para estudo de expressão dos marcadores proposto e comparação com amostras biológicas de pacientes com câncer de mama, serão utilizadas 3 linhagens celulares derivadas de tecido mamário humano com características não tumorigênica (MCF-10A), tumorigênica (MCF-7)

emetastática (MDA-MB-231, adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estas linhagens serão cultivadas de acordo com o protocolo disponibilizado pelo BCRJ. Inicialmente, será realizada uma análise descritiva na qual as variáveis definidas serão expressas em frequências absolutas e relativas e as variáveis quantitativas serão resumidas em médias, desvios-padrão, valores mínimos e máximos. Para avaliação do comportamento (expressão) dos genes propostos nas pacientes com câncer de mama e nas doadoras (mulheres saudáveis = grupo controle) será utilizado o Teste t-Student. Além disso, a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas será usada para comparar a evolução da expressão dos genes propostos ao longo do tempo e segundo algumas variáveis (estadiamento, progressão, tempo de progressão, idade e presença de receptores de estrogênio e de progesterona). Os cálculos estatísticos serão realizados por meio do programa NCSS.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem delineado, com excelente explicação sobre a relação entre o câncer de Mama e os genes induzidos pela hipóxia, dos quais o pesquisador deseja verificar se é possível realizar um prognóstico através destes genes como parâmetro.

A metodologia para avaliação também foi bem descrita, assim como os métodos de análise de resultados.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTO ANDRE, 13 de Dezembro de 2017

Assinado por:

MARCIA RODRIGUES GARCIA TAMOSAUSKAS
(Coordenador)

Endereço: Av. Lauro Gomes, 2.000

Bairro: Vila Sacadura Cabral

UF: SP

Município: SANTO ANDRE

Telefone: (11)4993-5453

CEP: 09.060-870

E-mail: cep@fmabc.br

FACULDADE DE MEDICINA DO ABC

**Termo de consentimento livre e esclarecido**

Você está sendo convidado a participar do estudo intitulado **“avaliação do valor prognóstico de transportadores de monocarboxilatos (MCT) em pacientes com câncer de mama”** para avaliar substâncias que possam detectar precocemente a volta da doença. Este estudo será conduzido pela Faculdade de Medicina do ABC - FMABC.

OBJETIVO: O objetivo desta pesquisa é avaliar qual substância pode servir como sinalizador de você voltar a desenvolver o câncer e/ou de ter resposta inadequada ao tratamento.

PROCEDIMENTOS: Sua participação no estudo consistirá na consulta de dados de seu prontuário e de seu passado médico. Serão utilizadas sobras de tecido do tumor retirado no momento da biópsia que diagnosticou sua doença e amostras de sangue periférico coletadas rotineiramente ao longo de seu tratamento quimioterápico. As amostras de sangue serão colhidas nas dependências da Faculdade de Medicina do ABC.

RISCO E CONFIDENCIALIDADE: os riscos físicos são apenas aqueles associados ao procedimento de biópsia já realizada para o diagnóstico, anteriormente explicados pelo médico solicitante. O uso destas sobras de biópsias não prejudicará o seu exame patológico. A punção venosa para a coleta de amostras de sangue consiste em risco leve. Pode haver uma vermelhidão pequena no local, mas que não impedirá a realização de suas atividades cotidianas. Asseguramos que sua identidade não será revelada e seus dados serão mantidos em sigilo pela equipe que conduzirá a pesquisa. Você não terá custo algum para participar da pesquisa ou em qualquer etapa da mesma. Não receberá da mesma maneira nenhuma quantia pela sua participação. Você poderá consultar os dados e o andamento da pesquisa a qualquer momento que achar conveniente. Caso necessite de assistência financeira para o transporte para a coleta de exames ou alimentação, os mesmos serão providenciados pelos pesquisadores.

BENEFÍCIOS: Ao longo do estudo, independentemente dos achados no seu tumor e no seu sangue, seu tratamento será o mesmo das demais pacientes com as suas características tratadas em nosso setor de quimioterapia. O benefício de sua participação será um aumento no conhecimento dos fatores que levam à volta do câncer (recorrência). Sua identidade e seus dados clínicos serão mantidos em absoluto sigilo.

DESISTÊNCIA: Você tem a opção de deixar de participar do estudo em qualquer momento após o seu aceite, caso mude de ideia por algum motivo, sem prejuízo da continuidade de seu tratamento.

CONSULTA: Você pode consultar os resultados do andamento da pesquisa a qualquer momento que achar conveniente. No final deste termo constam os contatos telefônicos para isso. Os resultados desta pesquisa podem ser apresentados em congressos e publicações; no entanto nós garantimos que sua identidade será preservada.

FACULDADE DE MEDICINA DO ABC



ASSISTÊNCIA: Esta pesquisa não causará dano algum a você por se tratar de consulta a seus dados clínicos e utilização de sobras de amostras do tumor e de sangue periférico.

Este estudo clínico foi analisado por um comitê de ética em pesquisa (CEP) desta Instituição. O CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) é um órgão que tem por objetivo proteger o bem-estar dos indivíduos pesquisados. Se você tiver dúvidas e/ou perguntas sobre seus direitos como participante deste estudo, ou se estiver insatisfeito com a maneira como o estudo está sendo realizado, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina do ABC pelo endereço: Av. Lauro Gomes, 2000 – 2º andar - Prédio: CEPES – Santo André – SP – ou pelo telefone: (11)-4993-5453. O horário de atendimento é de segunda à sexta das 08H00 ÀS 16H00. O COMITÊ DE ÉTICA É RESPONSÁVEL PELA AVALIAÇÃO E COMPANHAMENTO DOS ASPECTOS ÉTICOS DE TODAS AS PESQUISAS ENVOLVENDO SERES HUMANOS, VISANDO ASSEGURAR A PROTEÇÃO, A DIGNIDADE, OS DIREITOS, A SEGURANÇA E O BEM-ESTAR DO PARTICIPANTE DA PESQUISA.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.

Local : _____

Data : _____

Nome: _____

Documento (RG): _____ Sexo : M () F () Data de Nascimento: ____/____/____

Endereço : _____ Telefone : _____

Responsável (se aplicável): _____ Grau : _____

Assinatura : _____

Assinatura do Pesquisador (Faculdade de Medicina do ABC)

Dra Beatriz da Costa Aguiar Alves Reis (Investigadora Principal)
Faculdade de Medicina do ABC- Laboratório de Análises Clínicas- Anexo 3
Av. Lauro Gomes, 2000 – Vila Príncipe de Gales – Santo André- São Paulo
Telefone : (11) 991349379/ 49935488

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do Participante: