

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

LICERIO VICENTE PADOIN

**INTEGRIDADE E AMPLIFICAÇÃO DO GENE *HER2* NA BIÓPSIA
LÍQUIDA NO CÂNCER DE MAMA**

Porto Alegre

2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTÍFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

Licerio Vicente Padoin

**INTEGRIDADE E AMPLIFICAÇÃO DO GENE *HER2* NA BIÓPSIA LÍQUIDA NO
CÂNCER DE MAMA**

Porto Alegre
2019

LICERIO VICENTE PADOIN

**INTEGRIDADE E AMPLIFICAÇÃO DO GENE *HER2* NA BIÓPSIA LÍQUIDA NO
CÂNCER DE MAMA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
Sul – PUCRS.

Orientador: André Poisl Fay, MD, PhD

Coorientador: Daniel Prá, PhD

Linha de Pesquisa: Aspectos Epidemiológicos, Clínico-patológicos, Radiológicos e
Moleculares de Neoplasias Malignas

Porto Alegre

2019

Ficha Catalográfica

P124i Padoin, Licerio Vicente

Integridade e amplificação do gene HER2 na biópsia líquida no
câncer de mama / Licerio Vicente Padoin . – 2019.
67 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e
Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Andre Poisl Fay.

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Pra.

1. cfDNA. 2. Imunoistoquímica. 3. HER2. 4. Sub-tipos moleculares. 5.
Câncer de mama. I. Fay, Andre Poisl. II. Pra, Daniel. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

LICERIO VICENTE PADOIN

**INTEGRIDADE E AMPLIFICAÇÃO DO GENE *HER2* NA BIÓPSIA LÍQUIDA NO
CÂNCER DE MAMA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
Sul – PUCRS como requisito para obtenção de título
de Doutor em Medicina e Ciências da Saúde

Aprovado em 30 de agosto de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Gabriela Teló, PhD, PUCRS

Prof. Dr. Leder Xavier, PhD, PUCRS

Prof^a Dr^a Fernanda Barbisan, PhD, UFSM

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”

Antonie de Saint Exupéry

Minha imensa gratidão a todos que, à sua maneira, contribuíram para que este estudo pudesse ser concretizado.

Ao Hospital Universitário de Santa Maria - RS, por possibilitar que minha pesquisa fosse conduzida com seus pacientes e equipe técnica.

Às pacientes, que mesmo passando por um momento extremamente difícil de suas vidas, compreenderam a importância de sua colaboração no estudo conduzido.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria, que de maneira desprendida, coletaram e receberam incansavelmente as amostras de sangue, sem empecilhos, na hora necessária.

À Equipe do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade de Santa Cruz do Sul, em especial ao professor Alexandre Rieger, que muito me estimulou a realizar essa pesquisa, e incansavelmente realizou todas as análises.

Ao Prof. Andre Poisl Fay, agradeço ao acolhimento do meu trabalho em curso, e pelo incentivo científico na continuidade e conclusão desse estudo.

Em especial e de maneira determinante, meu reconhecimento e gratidão ao professor Daniel Prá, da Universidade de Santa Cruz do Sul - RS, que pacientemente me ajudou e apoiou, com seu conhecimento e suas brilhantes ideias, e que no fim transformou-se em uma grande amizade.

A Caren, grande companheira, sempre presente nas inúmeras viagens, e me incentivando nas hesitações, e amparando nos momentos difíceis.

A minha filha Julia, aos meus pais Arthur e Vilma, e minha irmãs Lisete e Leonice, pela compreensão da minha ausência, que privou do meu tempo com eles nesse período.

Por fim, mas sempre em primeiro lugar a Deus, energia que dá sentido a tudo.

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é provavelmente o mais temido entre as mulheres, por ser de alta incidência e pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a sexualidade e a própria imagem pessoal. É considerado um grave problema de saúde pública no mundo, com aproximadamente 2,1 milhões de casos novos e 627 mil óbitos pela doença por ano. **Objetivo:** avaliar a integridade e quantificar a amplificação do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) no DNA circulante livre de células (cfDNA) no plasma (biópsia líquida) em cânceres mamários luminais. **Metodologia:** o plasma foi coletado para análise de cfDNA durante a core-biopsy (diagnóstico de câncer). O tamanho do tumor foi obtido a partir de ultrassom e mamografia e a imunoistoquímica foi realizada a partir de amostras de core-biopsy. Os níveis de cfDNA da sequência Alu, (as sequências Alu podem ser consideradas, fatores de instabilidade genômica), e os níveis de amplificação de HER2 foram quantificados por análise da expressão gênica via qPCR. **Resultados artigo 1:** foram analisados 19 pacientes e 14 controles. As quantidades de cfDNA total e de fragmentos longos (apoptose) e curtos (necrose) foram significativamente maiores em pacientes do que nos controles, com exceção da integridade cfDNA (relação de segmentos longos e curtos). Houve correlação entre o tamanho do tumor e a quantidade de fragmentos longos e curtos de Alu, bem como com a integridade do cfDNA. Nenhuma diferença nos níveis de Alu cfDNA foi observada quando comparada com os subtipos moleculares. **Resultados artigo 2:** Foram analisados 33 pacientes, sendo 22 HER2- e 11 HER2+, de acordo com a imunoistoquímica avaliada no momento do diagnóstico. O tamanho do tumor teve uma correlação positiva com o nível de cfDNA, e este evento foi significativo. O nível de amplificação do HER2 no cfDNA não se associou ao tipo histológico ou ao grau histológico dos tumores. Um aumento na amplificação de HER2 foi observado em pacientes positivas ao diagnóstico imunohistoquímico do HER2 ($p = 0,004$). A curva ROC foi significativa ($AUC = 0,76$, $p = 0,016$). **Discussão:** Os resultados indicam que a quantificação do Alu no cfDNA diferencia os pacientes e os controles, entretanto, pode não ser útil para diferenciar o diagnóstico precoce do câncer de mama. Futuros estudos usando o cfDNA são sugeridos em câncer avançado. A análise da amplificação do HER2 no cfDNA parece ter o potencial para uso clínico uma vez que poderia evitar que tumores HER2+ sejam sub diagnosticados pela imunoistoquímica, devido provavelmente à heterogeneidade histológica, bem como para revelar outros locais metastáticos onde possa ocorrer a amplificação do HER2. **Palavras-Chave:** cfDNA, imunoistoquímica, HER2, subtipos moleculares, câncer de mama.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is probably the most feared among women, because of its high incidence and its psychological effects, which affect sexuality and personal image. It is considered serious public health problem worldwide, with approximately 2.1 million new cases and 627.000 deaths from the disease each year. **Objective:** To evaluate the integrity and quantification of the human epidermal growth factor 2 (HER2) receptor gene amplification in plasma free cell circulating DNA (cfDNA) in luminal breast cancers. **Methodology:** Plasma was collected for cfDNA analysis during core-biopsy (cancer diagnosis). Tumor size was obtained from ultrasound and mammography and immunohistochemistry was performed from core-biopsy samples. CfDNA levels of the Alu sequence, (Alu sequences can be considered genomic instability factors), and HER2 amplification levels were quantified by qPCR gene expression analysis. **Results Paper 1:** 19 patients and 14 controls were analyzed. Total and long (apoptosis) and short (necrosis) cfDNA amounts were significantly higher in patients than in controls, except for cfDNA integrity (ratio of long and short segments). There was a correlation between tumor size and the amount of long and short Alu fragments, as well as cfDNA integrity. No differences in Alu cfDNA levels were observed when compared to molecular subtypes. **Results Paper 2:** We analyzed 33 patients, 22 HER2- and 11 HER2 +, according to the immunohistochemistry evaluated at the time of diagnosis. Tumor size had a positive correlation with cfDNA level, and this event was significant. HER2 amplification level in cfDNA was not associated with histological type or histological grade of tumors. An increase in HER2 amplification was observed in patients positive for immunohistochemical diagnosis of HER2 ($p = 0.004$). The ROC curve was significant ($AUC = 0.76$, $p = 0.016$). **Discussion:** The results indicate that cfDNA Alu quantification differentiates patients and controls, however, may not be useful in differentiating early diagnosis of breast cancer. Future studies using cfDNA are suggested in advanced cancer. Analysis of HER2 amplification in cfDNA appears to have potential for clinical use as it could prevent HER2 + tumors from being underdiagnosed by immunohistochemistry, probably due to histological heterogeneity, as well as to reveal other metastatic sites where HER2 amplification may occur.

Keywords: cfDNA, immunohistochemistry, HER2, molecular subtypes, breast cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS

AUC: Área Abaixo da Curva

Alu: *Artrobacter luteus*, bactéria cujo sítio de clivagem da enzima de restrição (AluI) deu origem ao nome das sequências Alu dos primatas

Alu: elementos curtos repetitivos no DNA

AluL: sequências Alu longas (247 pares de base)

AluS: sequências Alu curtas (115 pares de base)

BLS: biópsia de linfonodo sentinela

BRCA1: breast cancer 1, early onset

BRCA2: breast cancer 2

CEP17: locus centromérico de referência do cromossomo 17

cfDNA: DNA circulante livre de células

CRR: cirurgia redutora de risco

Curva ROC: Curva Característica de Operação do Receptor (Receiver Operating Characteristic)

HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2

IHQ: imunoistoquímica

Ki67: marcador de proliferação celular Ki-67

MRR: mastectomia redutora de risco

PCR: polymerase chain reaction

qtPCR: polymerase chain reaction quantitative real time

RE: receptor de estrogênio

RP: receptor de progesterona

SOB: salpingooforectomia bilateral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 DIAGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA: TESTES GENÉTICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS	12
2.2 TRATAMENTO E PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA	14
2.3 DNA CIRCULANTE LIVRE DE CÉLULAS (CFDNA) COMO UM MARCADOR ONCOLÓGICO	16
2.4 O GENE HER2 NO CÂNCER DE MAMA	18
3 HIPÓTESES	20
4 OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GERAL	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5 MÉTODOS GERAIS	22
5.1 AMOSTRA/POPULAÇÃO/SUJEITOS	22
5.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	22
5.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO: COLETA E PROCESSAMENTO	22
5.3 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE COLETA	23
5.3.1 CLASSIFICAÇÃO DAS PACIENTES EM CADA SUBTIPO MOLECULAR	23
5.3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CFDNA	23
5.3.3 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO CFDNA	23
5.3.4 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA AMPLIFICAÇÃO DO <i>HER2</i>	24
5.4 PROCESSAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	25
6 RESULTADOS	26
6.1 MANUSCRITO 1	26
6.2 MANUSCRITO 2	40
7 DISCUSSÃO	52
8 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE	63
Apêndice 1 – Carta de Aprovação do CEP	63
ANEXO	67
Anexo 1- Comprovante de submissão Manuscrito	67

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer de mama é uma doença de grande impacto epidemiológico no mundo, com aproximadamente 2,1 milhões de casos novos e 627 mil óbitos pela doença, e o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, não considerando os tumores de pele não melanoma (BRAY et al., 2018). É uma doença altamente prevalente, sendo que uma mulher que vive nos Estados Unidos da América, tem chance de 12,5% de ter a doença ao longo da vida (DE MELO GAGLIATO et al., 2016). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são estimados no Brasil 59.700 casos novos, o que representa 29,5% dos cânceres em mulheres (INCA, 2019).

Dentre os fatores de risco confirmados são relatados a menarca precoce, menopausa tardia, primeiro filho após os 30 anos, mamas densas, história familiar, terapia de reposição hormonal pós-menopausa, biópsia benigna com atipias, entre outros. Dentre estes, a densidade mamográfica tem sido apontada como o fator mais importante, condição essa até então praticamente desconsiderada clinicamente (SANTEN et al., 2007). Sabemos também que as mulheres portadoras de mutações dos genes *Breast Cancer 1, early onset (BRCA1)* têm risco aumentado de desenvolver câncer de mama em 80%, e 40 a 60% de chance de desenvolver câncer de ovário (DUFLOTH et al., 2005). Mulheres que possuem tumores com o *Human Epidermal growth factor Receptor-Type 2 (HER2)* amplificado, que são em torno de 30% dos casos, têm um prognóstico pior, com menor sobrevida global (DE MELO GAGLIATO et al., 2016).

Sabe-se que métodos tradicionais, como a imunoistoquímica, têm índice de falso negativo elevado, comprometendo o seu poder preditivo e prognóstico. O diagnóstico correto de status *HER2* positivo é de suma importância, devido a terapêutica personalizada (RAKHA et al., 2015). No entanto, encontra-se em análise métodos que permitem o prognóstico de risco de recorrência da doença, com relativa acurácia (SOBHANI et al., 2018).

Investigações acerca da genética e da biologia molecular do câncer têm sido feitas nas últimas décadas. No câncer de mama, as pesquisas têm sido promissoras na procura de um biomarcador ideal, que sirva de fator preditivo e prognóstico, para orientar com mais precisão as decisões terapêuticas. Atualmente estas decisões estão baseadas em análises imunoistoquímicas e assinaturas genéticas. Os estudos com cfDNA, também chamada de "biópsia líquida", prometem contornar o problema dos diagnósticos equivocados, gerados pela heterogeneidade do tecido tumoral (PAGE et al., 2017)

Com base no exposto, este estudo propõe identificar, na "biópsia líquida", a integridade da sequência Alu, elemento repetitivo de DNA mais abundante no genoma humano cujo nome advém destas serem clivadas por endonucleases de restrição originárias da bactérias *Arthrobacter luteus* (*Alu*) e a amplificação do *HER2* e compará-las com a análise imunoistoquímica, com o objetivo futuro de testar as suas usabilidades clínicas, estabelecendo-as como um biomarcador prognóstico e auxiliar em decisões terapêuticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A integridade do cfDNA, ou seja, a proporção de fragmentos curtos e longos, verificada pela qPCR, está sendo muito pesquisada, quando o assunto é biópsia líquida no câncer. O cfDNA consiste em fragmentos de DNA liberados na corrente sanguínea após a morte celular de células tumorais e células saudáveis. A expectativa é de que, como consequência de ruptura, as células saudáveis desprendam fragmentos de DNA de aproximadamente 200 pb, originárias de suas unidades nucleossômicas que sofreram clivagem: em contrapartida, espera-se que as células tumorais liberem cfDNA de diferentes tamanhos, já que sofrem distintos processos de morte, como necrose e autofagia (SOBHANI et al., 2018). A afirmação de que células tumorais produzam fragmentos circulantes longos ou curtos não tem a concordância total dos pesquisadores na área, contudo a integridade do cfDNA ainda é o método mais aplicado na biópsia líquida do câncer de mama (JIANG; LO, 2016).

2.1 DIAGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA: TESTES GENÉTICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS

No ponto de vista genético, em torno de 10% dos cânceres de mama estão relacionados com a hereditariedade em geral, com diagnóstico antes dos 50 anos e com pior prognóstico. Já 10 a 15% dos cânceres de mama são de origem familiar e a idade variável do diagnóstico é entre 55 e 70 anos. Predomina, com imensa maioria, o carcinoma de aparecimento esporádico, que ocorre devido a mutações genéticas adquiridas ao longo da vida, com aproximadamente 80% dos casos, e sendo diagnosticados entre os 65 e 80 anos de vida, em mulheres sem aparentes fatores de risco (FRASSON et al., 2018).

A complexidade da herança genética no câncer de mama, cada vez mais é evidenciada. De acordo com a frequência de portadoras de uma mutação em determinado gene relacionado ao câncer de mama ao longo da vida, ocorre a classificação em 3 grupos: genes de alta penetrância como o BRCA1 e BRCA3, cujo as mutações podem conferir um risco relativo cinco vezes maior de aparecimento do câncer de mama; genes de moderada penetrância como o ATM e o BRIP relacionados a um risco de 2 a 3 vezes maior no aparecimento do câncer de mama e por fim os genes de baixa penetrância como o FGFR2 e LSP que apresentam entre 1,01 e 1,5 vezes mais chances. É importante ressaltar que estes genes podem levar ao desenvolvimento da doença somente em conjunto com outros fatores de risco ou com outros genes mutados (FIGUEIREDO, 2014).

Os genes supressores de tumores, como o *BRCA 1* e o *BRCA 2*, participam da regulação do ciclo celular e reparação do DNA, e indicam a necessidade da célula entrar em apoptose. Entretanto, possuem diferentes funções em estágios diferentes da resposta ao dano e reparo do DNA. Sendo que, *BRCA1* é uma proteína que atua de dois modos, na resposta ao dano no DNA, ativando mecanismos de checagem e no reparo do DNA, já a proteína *BRCA2* é um mediador do mecanismo de recombinação homóloga (ROY et al. 2011).

Mutações nestes genes são responsáveis pela gênese de 30% dos cânceres hereditários de mama e de ovário. O *BRCA 1* é responsável por 72% de probabilidade de desenvolver câncer de mama e 44% de probabilidade de desenvolver câncer de ovário nas mulheres que possuem a mutação. Já as portadoras do *BRCA 2* mutante têm 69% de chance de ter um câncer de mama no decorrer de sua vida (KUCHENBAECKER et al., 2017).

Dentre os critérios morfológicos, vários têm sido utilizados para tentar mensurar a agressividade do tumor, como: tipo histológico, resposta inflamatória, mitoses, invasão vascular, polimorfismo nuclear, entre outros. O polimorfismo nuclear, com a formação de micronúcleos, encontrado nos tumores, tem-se mostrado útil na predição do comportamento biológico destes, e também são considerados fatores associados à malignidade quando encontrados em algumas displasias mamárias (ELSTON; ELLIS, 2002).

Outros testes envolvendo mutações não-BRCA não estão bem estabelecidas, e em muitas vezes envolvem alto custo e contribuem pouco para as síndromes hereditárias do câncer de mama (VALENCIA et al., 2017). Os testes mais simples e menos custosos, como a análise imuno-histoquímica do tumor, utilizando os marcadores de receptores de estrogênio e progesterona, Ki67 e *HER2*, mostraram-se também eficientes na predição da recorrência do câncer e decisão terapêutica, sendo os mais usados e os únicos realmente estabelecidos atualmente na prática clínica (KOZ; DABBS, 2016).

Em suma, o câncer de mama tem fatores genéticos, bem descritos em painéis multigênicos, são chave para prever o risco em portadoras de mutações em genes de alta penetrância, como os BRCA. Já mutações presentes em genes *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* e *BRIP* que representam penetrância moderada ainda aguardam uma base de evidências para tomada de condutas personalizadas (TUNG et al., 2016; SHIOVITZ; KORDE, 2015).

O diagnóstico do câncer de mama envolve achados mamográficos, ecográficos, e/ou clínicos, dependendo de cada caso, e todos sempre seguidos de biópsia. Quando presente a história familiar, mutação dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, síndromes que envolvem câncer de mama, uso de próteses, mamas extremamente densas, suspeitas de multifocalidade/multicentricidade, tipos histológicos lobulares, linfonodos positivos com

tumor oculto, avaliação de resposta à quimioterapia neo-adjuvante, entre outras, a ressonância magnética pode ser necessária (SENKUS et al., 2013; SARDANELLI et al., 2010).

A utilização da mamografia e o aumento da preocupação pública com o câncer de mama têm resultado na detecção de tumores cada vez menores, levando a um risco menor de metástases, e por consequência, redução da mortalidade (SMITH; DUFFY; TABÁR, 2012).

As cirurgias redutoras de risco (CRR), nas mulheres portadoras da mutação em BRCA1 e 2, também são responsáveis por uma significativa diminuição na incidência de tumores primários, como também em tumores na mama contra-lateral. Dentre estas cirurgias, temos a mastectomia (MRR) e a salpingooforectomia bilateral (SOB) (HEEMSKERK-GERRITSEN et al., 2015).

A indicação da terapia para o tratamento do câncer de mama está sofrendo modificações profundas nas últimas décadas, influenciadas pelas transformações que ocorrem quanto ao melhor entendimento da doença, os genes e suas mutações, a melhor aplicação dos marcadores tradicionais, como os receptores hormonais, *HER-2* e *Ki67*, e a descoberta de novas ferramentas de complementação diagnóstica, que classificam a neoplasia nos seus graus de agressividade, como a plataforma de 21-genes (OncotypeDX).

O gene do receptor de progesterona (RP) está implicado no desenvolvimento da glândula mamária. Tal gene é um fator de transcrEm suas duas isoformas, A e B, ele é responsável por aumentar significativamente o risco do desenvolvimento do câncer de mama, e raramente está presente em tumores que possuem receptores de estrogênio negativos (PEREIRA et al., 2010).

O receptor HER 2 pertence a família dos receptores tirosina quinase, e é identificado em 20% das neoplasias de mama. Tem um comportamento mais agressivo e está relacionado a uma taxa maior de recorrência e mortalidade. É avaliado e quantificado por vários métodos, mas o mais usado é a imuno-histoquímica, e por responder bem a tratamentos com droga específica, tem chance de ser usado como fator preditivo do câncer de mama (RUBIN; YARDEN, 2001).

O *Ki67* é um biomarcador que analisa a proliferação celular, estando relacionado com um pior prognóstico quando superexpresso, mas com boa resposta à quimioterapia em qualquer estágio da doença (BUITRAGO et al., 2011).

2.2 TRATAMENTO E PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA

Confirmada a malignidade, o tratamento cirúrgico do câncer de mama está baseado na abordagem da mama (mastectomia ou cirurgia conservadora) e na abordagem da axila (linfadenectomia axilar ou biópsia do linfonodo sentinela). A morbidade do tratamento cirúrgico para o câncer de mama no estágio inicial foi reduzida com a introdução da cirurgia conservadora (RECHT et al., 1991) e da biópsia do linfonodo sentinela (BLS) (CHUNG, STANHOFFER, CADY, 2002).

O primeiro tratamento envolve, ou remoção cirúrgica do tumor, ou tratamento medicamentoso neo-adjuvante, de acordo com os achados imuno-histoquímicos. Após, segue-se geralmente quimioterapia adjuvante, terapia com drogas alvo, radioterapia e hormonioterapia, configurando a terapia personalizada para cada caso (BLITZBLAU; HORTON, 2013). A decisão sobre a necessidade de quimioterapia é baseada no prognóstico de recorrências locais ou a distância, bem como a estimativa de sobrevida. Rotineiramente a quimioterapia adjuvante (profilática) é recomendada sempre que a BLS for positiva.

Contudo, nos casos em que a BLS for negativa, a decisão clínica da necessidade de quimioterapia é difícil. Cabe lembrar que a quimioterapia adjuvante deve ser evitada ao máximo, visto a cardiotoxicidade, neurotoxicidade e o aumento de risco de leucemia associados. Vários métodos de decisão da necessidade de quimioterapia estão sendo testados. Existem basicamente dois métodos para decidir sobre a necessidade ou não de quimioterapia. O primeiro método são os nomogramas prognósticos, que são métodos que envolvem cálculos matemáticos e que levam em consideração características morfológicas e imunoistoquímicas do tumor para calcular um índice de risco, sendo os mais usados o *AdjuvantOnLine* e o *Predict*, este último incluindo o *HER2* (WISHART et al., 2012). O segundo método é a análise de expressão gênica (assinaturas genéticas), como o OncotypeDX (21 genes), Mammaprint (70 genes) e PAM50 (50 genes), todos com a finalidade de prever a ocorrência de metástases (MALO et al., 2012; KROP et al., 2017; SPARANO et al., 2018). Estas assinaturas genéticas são mais usadas em situações clínicas iniciais da doença, como tumores RE+, com grau 2, onde existe a maior dúvida do uso da quimioterapia. Em tumores de estádios menores ou maiores que a situação acima, os testes são desnecessários (ALLISON, 2012).

Quando o tumor é *HER2* positivo, a doença costuma ser mais agressiva e de pior prognóstico, e o tratamento medicamentoso deve ser diferenciado, com drogas específicas anti-*HER2*, as chamadas terapias-alvo. A medicação mais conhecida e usada neste cenário, desde o final da década de 1990, é o trastuzumab. Esse agente tem o *HER2* como alvo, e os mecanismos de ação ainda não são bem conhecidos. As evidências indicam que ele inibe o crescimento tumoral diminuindo a expressão do receptor, agindo em sua parte externa (PICCART-

GEBHART et al., 2005; MOJA et al., 2012). A resistência primária ao trastuzumab quando usado como única droga anti-*HER2* já é conhecida, e estima-se que seja em torno de 70% dos casos (BERNS et al., 2007; DE MELO GAGLIATO et al., 2016)). Isto fez com que outras drogas se estabeleçam no arsenal terapêutico anti-*HER2*, como o pertuzumab, lapatinib e T-DM1 (Von MINCKWITZ et al., 2017).

A análise da integridade do DNA também pode ser um indicador de prognóstico, potencialmente servindo como um terceiro método (CARDINALE; BRUZZI; BOLOGNESI, 2012). O primeiro método (nomograma) estabelece um escore, muitas vezes deixando a indicação quimioterápica duvidosa, e ela acaba sendo prescrita na maioria das pacientes com tumores iniciais. As assinaturas genéticas revelam um índice de recorrência que estabelece a decisão clínica, mas tem indicações restritas para doenças de médio risco (KROP et al., 2017). O terceiro método, que é o cfDNA, merece estudos adicionais. Ele poderia fornecer informações mais precisas, principalmente em relação ao sub-grupo *HER2* positivo, onde sabe-se que o índice de falso-positivos e negativos são significativos, na prática clínica em geral (PALACIUS et al., 2019).

Levando em consideração todos os itens comentados acima, a importância do diagnóstico correto implica sobremaneira no tratamento e sobrevida, visto a toxicidade miocárdica do trastuzumab no caso de supertratamento, e os benefícios da droga nos *HER2* realmente positivos.

2.3 DNA CIRCULANTE LIVRE DE CÉLULAS (CFDNA) COMO UM MARCADOR ONCOLÓGICO

A descoberta de um DNA circulante livre de células (*Circulating Cell-Free DNA* - cfDNA) ocorreu em 1948 e a primeira hipótese de que ele pudesse ser usado como um preditor da oncogênese foi em 1965. Desde então, vários autores têm sugerido que ele possa ser utilizado como um biomarcador para uma variedade de situações que incluem desde sexagem, traumatismo, até doenças como infarto e acidente vascular encefálico (AVE), porém a grande maioria das pesquisas tenta relacioná-lo ao câncer. Contudo, foi só a partir do início dos anos 2000 e com o desenvolvimento de novas tecnologias que permitiram uma melhor análise qualitativa e quantitativa do DNA, utilizando tecnologias de fluorescência, PCR em tempo real quantitativa (RT-qPCR), e novas estratégias de sequenciamento, que o cfDNA passou a ser utilizado de modo mais consistente como um biomarcador para câncer (DAWSON et al., 2013; ELSHIMALI et al., 2013).

A hipótese da utilização do cfDNA como um marcador de oncogênese ganhou força com o entendimento da origem destas moléculas no meio circulatório. Assim, foi proposto que o cfDNA tenha origem das células que morrem, embora possa também ser de liberação ativa por alguns tipos celulares como na hematopoiese.

Como as células tumorais sofrem um verdadeiro processo de seleção natural, as não sobreviventes acabam liberando o seu DNA para o meio circulatório, aumentando significativamente a concentração de cfDNA à medida que a doença progride. Desta forma, num primeiro momento, o aumento de cfDNA no sangue serviria como um indicativo de aumento de morte celular associado ao processo de oncogênese, entretanto isso também acontece em outras situações como trauma, infarto e acidente vascular encefálico, nos quais também ocorre morte celular (MÉHES et al., 2019).

Já existe um razoável conhecimento sobre os mecanismos de morte celular e, de modo geral, dois tipos diferentes são bem distintos: a apoptose e a necrose (GORMALLY et al., 2007). A partir dessa diferenciação, passou-se a investigar, além da quantidade, também a qualidade do cfDNA que pode ser obtido da circulação (WANG et al., 2003; UMETANI et al., 2006).

Embora ambos os mecanismos de morte celular ocorram nas células neoplásicas e contribuam para o aumento do cfDNA, a seleção natural que atua fortemente sobre as células filhas leva ao aumento de morte celular, principalmente por necrose durante o desenvolvimento do tumor. Enquanto a apoptose origina fragmentos de DNA pequenos, até 180 pares de bases, a necrose gera fragmentos usualmente maiores (GORMALLY et al., 2007). A partir desta constatação, pesquisadores têm proposto relacionar a origem do cfDNA na circulação a partir do tamanho dos seus fragmentos (SOBHANI et al., 2018).

Assim, diferentes estudos têm proposto a utilização da integridade do cfDNA como um marcador do desenvolvimento de tumores e de metástases, remissão da doença e até mesmo para a previsão de tratamento (DAWSON et al., 2013; ELSHIMALI et al., 2013; LEHNER et al., 2013). De modo simplificado, é feita a comparação da quantidade de fragmentos de cfDNA grandes em relação aos pequenos (até 180 pares de base-pb). Para isso têm sido usadas sequências que não se mobilizam por deslocamento de DNA, mas através da transcrição reversa do RNA transcrito a partir delas, seguida da integração cromossômica do produto desta transcrição reversa são exemplo destas sequências os elementos SINEs- Short Interspersed Nuclear Elements, dos quais a família *Alu* é a principal representante (MORALES et al, 2015).

Estima-se que a sequência *Alu* esteja presente em 1.5 milhões de cópias do genoma humano, correspondendo a 10% do genoma. Os elementos *Alu* afetam o genoma de várias

maneiras, causando mutações na inserção, recombinação entre elementos, conversão gênica e alterações na expressão gênica. Foi demonstrado que a recombinação Alu / Alu causa aproximadamente 0,5% de novas doenças genéticas humanas e contribui para uma ampla variação estrutural do genoma (MORALES et al, 2015).

Através, principalmente da utilização da PCR em tempo real quantitativa (qPCR), é realizada a amplificação de sequências *Alu* usando dois conjuntos de primers distintos: um para gerar fragmentos de 115 pb e outro para fragmentos de 247 pb. Dessa forma, é possível, através de um algoritmo, calcular um índice de integridade do cfDNA que pode ser correlacionado com a presença do tumor, bem como os achados clínicos e a progressão da doença (UMETANI et al., 2006).

2.4 O GENE HER2 NO CÂNCER DE MAMA

O *HER2* é a abreviatura de "*Human Epidermal growth factor Receptor-Type 2*" e constituem uma família de quatro receptores da superfície celular (*HER1*, *HER2*, *HER3* e *HER4*) envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação das células normais que revestem o organismo humano, bem como o tecido glandular. E essas células também estão presentes no tecido mamário. Em células normais, poucas moléculas de *HER2* existem na superfície da célula, de forma que a proteína por ele produzida se encontra em níveis adequados, e isso faz com que a célula se desenvolva normalmente. Quando o *HER2* é superexpresso, geralmente ocorrem múltiplas cópias do gene, havendo produção aumentada de proteínas, resultando em maior capacidade de resposta a fatores de crescimento maligno. Na clínica, essa superexpressão de *HER2* é um indicador de mau prognóstico em tumores de mama, com um comportamento mais agressivo e pior resposta aos tratamentos quimioterápicos convencionais. Então a determinação do status *HER2* tornou-se muito importante, porque além de influenciar na decisão terapêutica do câncer de mama, virou uma ferramenta prognóstica e preditiva. Sendo estudado exhaustivamente, *HER2* ficou um alvo altamente específico, além de muito promissor para novos tratamentos para o câncer de mama (RUBIN et al., 2001). Consequentemente, no final da década de 1990, surgiu o anticorpo monoclonal humano anti-*HER2* recombinante (rhuMAb-*HER2*, trastuzumab), que induz a remoção de *HER2* da superfície da célula, reduzindo assim reduzindo a oncogenicidade (HUDIS, 2007; MOJA et al., 2012).

As amplificações e a superexpressão respondem por até 15% das alterações no *HER2*, enquanto as demais alterações são mutações de ponto, inserções e deleções (Figura 1).

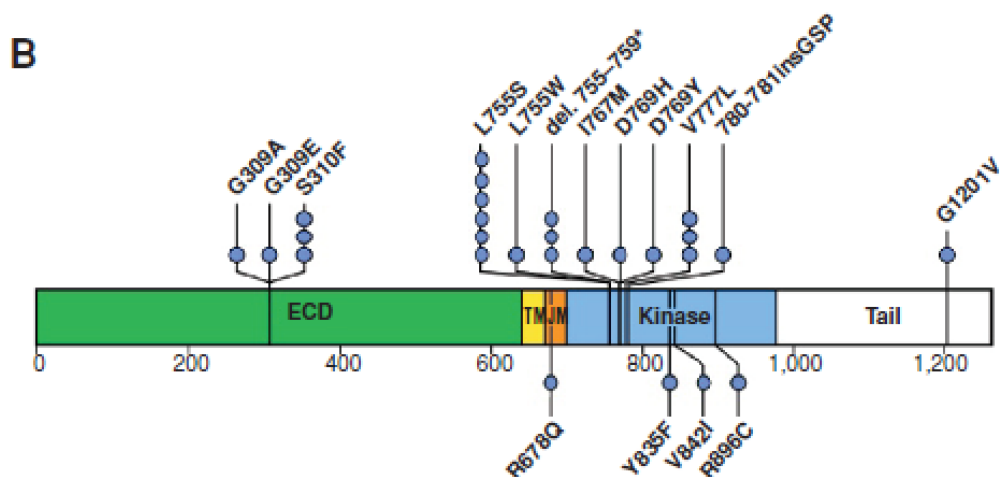


Figura 1. Principais mutações somáticas em *HER2* com relevância clínica no câncer de mama (Adaptado de Bose et al, 2012). ECD, domínio extracelular; JM, região justamembranar; SNP, single-nucleotide polypeptide TM, região transmembranar; WT, wild type.

3 HIPÓTESES

H₀- A integridade das sequência *Alu* no cfDBA não se correlaciona com a imunoistoquímica

H₁- A integridade das sequências *Alu* no cfDNA se correlaciona com a imunoistoquímica.

H₀- As pacientes com subtipos moleculares de pior prognóstico não terão maiores frequências relativas de integridade e amplificação de *HER2* no cfDNA.

H₁- As pacientes com subtipos moleculares de pior prognóstico terão maiores frequências relativas de integridade e amplificação de *HER2* no cfDNA.

H₀- A amplificação do *HER2* não se correlaciona com a imunoistoquímica.

H₁- A amplificação do *HER2* se correlaciona com a imunoistoquímica.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar, na biópsia líquida, a integridade da sequência *Alu* e a amplificação do *HER2* e compará-la com a análise imunoistoquímica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a integridade do cfDNA.
- Avaliar o número de cópias do *HER2* na biópsia líquida.
- Correlacionar o número de cópias do *HER2* com as características imunoistoquímicas do tumor.
- Avaliar a utilidade clínica da biópsia líquida em substituição da biópsia de tecido.

5 MÉTODOS GERAIS

5.1 AMOSTRA/POPULAÇÃO/SUJEITOS

As pacientes foram provenientes Hospital Universitário da UFSM, onde havia casuística abundante, por se tratar de centro de referência.

A seleção para o estudo incluiu pacientes de qualquer idade, diagnosticadas com câncer de mama, com estágios I, II e III, independente do tipo histológico, que possuíam linfonodo sentinela negativo ou positivo, receptores hormonais positivos, *HER2* negativos ou positivos e Ki67 baixo ou alto.

Havíamos estimado *a priori* cerca de 20 indivíduos com todas as variáveis. Para 4 variáveis, com beta de 0,8 e alfa de 0,05, seriam necessários cerca de 20 indivíduos para $r=0,6$. Correlacionando-se as variáveis independentemente seriam necessários 20 indivíduos para se testar $r=0,5$ nas mesmas premissas (GATSONIS; SAMPSON, 1989). Incluímos 18 indivíduos com câncer e 14 casos controle no primeiro estudo, e 33 pacientes com câncer no segundo estudo. Portanto, a amostra suporta o estudo.

5.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Este é um estudo observacional transversal.

5.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO: COLETA E PROCESSAMENTO

O sangue foi coletado por punção venosa em tubos contendo anticoagulante EDTA k3. O plasma foi obtido por centrifugação em duas etapas sucessivas. A primeira centrifugação foi realizada a 1.500g por 15 min, sendo realizada em até 2 horas após a coleta a fim de evitar a contaminação do meio por DNA oriundo da morte de células sanguíneas. Uma segunda centrifugação a 1.500g por 15 min foi realizada para obter-se um plasma mais livre de possíveis contaminantes celulares e restos de degradação (EL MESSAOUDI et al., 2013). O sobrenadante foi transferido para microtubos e armazenado a -20°C até o momento da extração do cfDNA (STOTZER et al., 2014).

5.3 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE COLETA

5.3.1 CLASSIFICAÇÃO DAS PACIENTES EM CADA SUBTIPO MOLECULAR

Foram utilizadas as seguintes variáveis: *status* dos receptores de estrogênio e progesterona, status da proteína *HER2* e Ki67. Os quatro subtipos moleculares são: Luminal A, Luminal B, *HER2* enriquecido e triplo negativo (basal). Na classificação dos subtipos moleculares, foram usadas as seguintes variáveis: receptores de estrogênio, receptores de progesterona, *HER2* e Ki67. Para avaliação do risco de metástase, levamos em consideração o status combinado do receptor de progesterona e do *HER2*.

5.3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CFDNA

O cfDNA foi extraído do plasma a partir de 200 µL utilizando-se o QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) conforme as instruções do fabricante sendo diluído em um volume final de 50 µL de TE (Tris-EDTA pH=8,0). A quantificação do cfDNA extraído foi realizada com o fluorímetro Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific©) e expressa em ng/mL de plasma. As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da qPCR.

5.3.3 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO CFDNA

Para a PCR em tempo real quantitativa (qPCR) da sequência *Alu* foram utilizados dois conjuntos de primers (Umetami et al, 2006a): Sequências curtas de 115 pb Senso 5'-CCTGAGGTCAGGAGTTCGAG-3' Antisense 5'-CCCGAGTAGCTGGGATTACA-3' Sequências longas de 260 pb Senso 5'-GTGGCTCACGCCTGTAATC-3' Antisense 5'-CAGGCTGGAGTGCAGTGG-3'

Para cada reação foram adicionados 10 µL de PowerUp SYBR Green Master Mix (2 x) (Applied Biosystems®), 0,3 µM primer, 0,3 µM sentido de primer antisense e 5 µL de amostra de cfDNA e completado com água ultrapura para um volume final de 20 µL de reação. As condições de reação foram as seguintes: um ciclo a 50°C por 2 minutos seguido de 1 ciclo a 95°C por 2 minutos; 40 ciclos a 95°C por 15 segundos com duas etapas sucessivas de 60°C por 30 segundos cada uma. A curva de dissociação para confirmação seguiu 100 ciclos de amplificação com variação de temperatura de 0,5°C por ciclo de 15 segundos na faixa de 40°C a 90°C. Todos os testes foram feitos em triplicata. As reações de qPCR foram realizadas no StepOne Plus (Applied Biosystems®). Os resultados da amplificação também foram confirmados por eletroforese em gel de agarose (2%).

Para a quantificação das sequências de AluS e AluL de cfDNA por qPCR, uma curva padrão com diluições seriadas (1; 1/10; 1/100; 1/1000; 1/10000; 1/1000000) foi testada em uma amostra de controle. A amostra de controle foi composta por um grupo de cfDNAs de 10 indivíduos saudáveis.

O índice de integridade do cfDNA foi calculado como a razão entre a concentração de fragmentos de cfDNA longos e curtos (UMETANI et al., 2006a). O algoritmo para calcular o cfDNA int usado é baseado no fato de que os sítios de anelamento da sequência de AluS estão dentro da sequência AluL. Nas células que passam por apoptose, o DNA gnômico é degradado em fragmentos de tamanho regular inferior a 180 pb, no entanto, em células que passam por necrose o DNA é degradado em fragmentos geralmente de tamanhos irregulares e maiores que 180 pb (STÖTZER et al, 2014). Assim, o cálculo da integridade do cfDNA pode ser usado para sugerir a origem do cfDNA que está em circulação para que quanto maior o valor o maior índice de integridade a quantidade de células que estão morrendo de necrose como no caso de células tumorais (UMETANI et al. 2006b; JUNG et al., 2010).

5.3.4 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA AMPLIFICAÇÃO DO *HER2*

O número relativo de cópias do gene *HER2* foi avaliado por PCR em tempo real. A quantificação da amplificação de *HER2* foi realizada com referência ao *CEP17* (WANG et al., 2017). Foi também utilizado outro gene de referência, o gene do fator *2C1* (*EIF2C1*) do fator de iniciação da tradução eucariótica humana 2C1, localizado em 1p34.3, como sondas alternativas do cromossoma 17. O uso de um gene de referência, fora do cromossomo 17, pode ser importante para identificar casos de co-amplificação de *HER2* e *CEP17* (TANTIWETRUEANGDET et al., 2018).

A análise de quantificação do número de cópias *HER2* foi realizada por qPCR no sistema StepOnePlus™ (Applied Biosystems®) em relação a *CEP17* e *EIF2C1*. Os seguintes conjuntos de primers e sondas foram utilizados para a reação:

HER2

Senso 5'-CTCATCGCTCACAACCAAGT-3',

Antisenso 5'-CAGGGCATAGTTGTCCTCAA-3',

Sonda 5'-/56FAM/TGTGCGAGG/ZEN/CACCCAGCTCT/3IABkFQ/-3';

CEP17

Senso 5'- GCTGATGATCATAAAGCCACAGGTA-3',

Antisenso 5'- CTGGTGCTCAGGCAGTGC-3',

Sonda 5'-/5HEX/ACGTGCTGC/ZEN/AATAGGCGGTTGCCTA/3IABkFQ/-3';

EIF2C1

Senso 5'- GAGTGATGAGAAGAGAATGGAGAG-3',

Antisenso 5'- GGATCAGGTTGGACTGGATAAA-3',

Sonda 5'-/5HEX/AAGGTGGGA/ZEN/AAGGAGAGCACTGTT/3IABkFQ/-3'.

As reações de qPCR foram preparadas em placas de 96 poços, em um volume final de 20 µL, contendo 4 µL de cDNA, 10 µL do Master Mix Universal de PCR TaqMan® (Applied Biosystems by Life Technologies™), sonda de 0,5 µL (250 nM), 1,8 µL primer frente (900 nM), 1,8 µL reverso primer (900 nM) e 1,9 µL de água miliq. Sondas e primers foram adquiridos da Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT)™.

Condições de qPCR: 2 min a 50°C (ativação de Uracil-N glicosilase - UNG) e 95°C 10 min (desnaturação completa de cfDNA e ativação de DNA Polimerase) seguido de 45 ciclos de 95°C, 5s e 60°C, 20 s.

5.4 PROCESSAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o processamento e análise de dados/estatística foram usados os softwares Excel e Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v.20. As variáveis foram comparadas utilizando-se o teste t de Student, teste U de Mann-Whitney, análise de variância (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis. A análise de correlação (Pearson ou Spearman) foi utilizada para buscar associação entre as variáveis. A análise através da curva Roc foi utilizada para analisar especificidade e sensibilidade na correlação cfDNA e demais marcadores. Todos os dados foram testados para homocedasticidade e normalidade. Nos casos em que os dados não apresentaram homocedasticidade e/ou normalidade, uma transformação logarítmica foi empregada. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

5.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Somente participaram desta pesquisa os indivíduos que consentirem formalmente em participar pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da PUCRS.

O material biológico coletado será utilizado especificamente para os propósitos da pesquisa e não terá qualquer outra finalidade. O material para coletas e armazenamento das amostras será descartado conforme rotina de descarte de materiais biológicos dos locais envolvidos.

6 RESULTADOS

Os resultados desta tese estão apresentados abaixo sob a forma de 2 manuscritos científicos:

6.1 MANUSCRITO 1

cfDNA associates with tumor size but not with molecular subtypes in breast cancer diagnosis

Licerio Vicente Padoin^{1,4}, Alexandre Rieger², Alessandra Koehler², Fabiele Cristina Hintz², Silvia Isabel Rech Franke³, Nathalia Nascimento Fontoura⁴, Daniel Prá^{2,3}, André Poisl Fay¹

¹Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Departamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Promoção da Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

⁴Serviço de Mastologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Corresponding Author: Daniel Prá. Programa de Pós-graduação em Promoção da Saúde. Av. Independência, 2293, Sala 4206. Bairro Universitário, Santa Cruz do Sul. CEP: 96815-900. RS, Brasil. Phone: +55-51-37177603; Fax: +55-51-37171855. E-mail: dpra@unisc.br.

Abbreviations: cfDNA: cell-free DNA; *AluL*: *Alu* long sequence with 160 bp; *AluS*: *Alu* short sequence with 111 bp.

Keywords: cfDNA, immunohistochemistry, tumor markers, molecular subtypes, breast cancer

Running Title: PADOIN et al: cfDNA IN BREAST CANCER LUMINAL MOLECULAR SUBTYPES

Abstract

To evaluate the association between the molecular subtype of breast cancer tumors with the integrity (apoptosis and necrosis) measured in the cell-free circulating DNA (cfDNA). During core-biopsy (cancer diagnosis), plasma was collected for cfDNA analysis. Tumor size was obtained from ultrasound and mammography and immunohistochemistry was obtained from core-biopsy samples. The cfDNA levels of *Alu* sequence were quantitated by qPCR in the serum of patients ($n = 19$) and healthy controls ($n = 14$). Whole cfDNA level, *Alu* cfDNA long (apoptosis) and short (necrosis) fragments were significantly higher in patients than controls, excepting cfDNA integrity (ratio of long and short segments). There was a correlation between the tumor size and *Alu* long and short fragments and cfDNA integrity. No difference in *Alu* cfDNA levels was observed with the molecular subtype. These results indicate that *Alu* cfDNA differentiate patients and controls however might not be useful to differentiate early breast cancer diagnosis. Future studies using cfDNA are suggested in advanced cancer.

Introduction

Breast cancer is the most feared type of tumor among women and one of the largest public health problems in the world, with approximately 1.2 million new cases yearly (Bacchi et al, 2010). According to Brazilian National Cancer Agency (INCA, 2019), for 2018 there were about than 60,000 new cases and more than 15,000 deaths per year in Brazil.

Breast cancer can be classified according to clinical and pathological features (Blows et al, 2010). Histology, especially with the aid of immunohistochemistry, has been shown to be useful in predicting the biological behavior of tumors. There are four molecular subtypes of breast cancer derived from immunohistochemical associations (Luminal A, Luminal B, HER2 and triple negative). These molecular subtypes help to guide the clinical decision. These subtypes are classified based on the hormonal (estrogen and progesterone) receptors, HER2, and Ki67 which have also been shown to be efficient in predicting cancer recurrence, at least in a comparative study with current genomic tests (Cuzick et al, 2009).

Hormonal receptor overexpression is linked to tumor cell's proliferation. Hormonal receptor positive tumors (Luminal types) generally have a good prognosis due to the use of tamoxifen, a hormonal drug targeting Luminal type cancers (Liu et al, 2014). HER2 belongs to the tyrosine kinase receptor family and is identified in 20% of breast neoplasms. HER2

positivity is associated with more aggressive tumors and is related to a higher rate of recurrence and mortality (Olopade et al, 2008; Blows et al, 2010). Ki67 is a biomarker that analyzes cell proliferation and is associated with a worse prognosis when overexpressed, but with a good response to chemotherapy at any stage of the disease (Dowsett et al, 2008).

More recently, a new perspective with the use of “liquid biopsy” is shedding light over cancer diagnosis and prognosis. In this context, circulating cell-free DNA (cfDNA) has been suggested as a molecular marker for cancer management (Bronkhorst, et al, 2019). Liquid biopsy of cfDNA can be used as a quanti and qualitative biomarker, allowing among others to investigate mutations, epigenetic alterations and the pattern of cell death. As example in breast cancer, it can allow genetic profiling of the tumors to enhance individualized treatment and longitudinal screening (Alimirzaie et al, 2019).

The cfDNA integrity, measured as the proportion of short and long fragments, after qPCR has been explored in cancer “liquid biopsy”. Theoretically, cfDNA consists of DNA fragments released after cell death processes from both tumor and normal cells. Normal cells are expected to release DNA fragments of about 200 bp as the result of enzymatic cleavage of nucleosome units; whereas, tumor cells undergo many different death processes, including necrosis and autophagy, and they can release DNA fragments of different sizes (Sobhani et al, 2018).

Therefore, we aimed to evaluate the quantities and the integrity of cfDNA in breast cancer patients and relate this finding to the immunohistochemistry and molecular subtyping of the patients.

Material and methods

This is a cross-sectional study. Selection for the study predicted patients of any age, diagnosed with luminal breast cancer. Eighteen cancer patients were included in the study. The control group was composed of healthy women who volunteered to donate blood for the research (n = 14). All patients and controls came from the University Hospital of the Federal University of Santa Maria (UFSM).

The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CAAE: 01509918.2.0000.5336; Evaluation Report: 3101887). Only patients and controls who signed the Informed Consent Form were included in the study. The collected biological material will be used specifically for research purposes and will not serve any other purpose.

The following data were collected from the medical records and examinations: age, primary tumor size, tumor histological type, histological grade, estrogen and progesterone status, HER2 and Ki67. In the classification of molecular subtypes, the following variables were used: estrogen receptors, progesterone receptors, HER2 and Ki67 (Wang et al, 2011).

Venous blood samples were collected during core-biopsy for cancer diagnosis. The blood was collected by venipuncture in tubes containing EDTA k3 as anticoagulant. The plasma was obtained by 2 successive centrifugations (first at 1,500g for 15 min and second at 15,000g for 15 min). The centrifugations were performed within 2 hours of the blood collection to avoid cfDNA contamination with DNA originated from blood cells degradation (El Messaoudi et al, 2013). The supernatant of the second centrifugation was transferred for microtubes and stored at -20° C until the cfDNA extraction (Stötzer et al 2014).

The cfDNA was extracted from 200 µL plasma using the QIAmp Blood DNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, being eluted in a final volume of 50 µL of TE (Tris-EDTA buffer pH = 8.0). CfDNA was quantification with a Qubit fluorometer® 3.0 (Thermo Fisher Scientific ©) and expressed in ng/mL of plasma. The cfDNA samples were stored at -20° C until qPCR.

For qPCR of *Alu* sequences, the following two sets of primers: short sequences of 115 pb – *AluS* (primer forward 5'-CCTGAGGTCAGGAGTTCGAG-3' and primer reverse 5'-CCCGAGTAGCTGGGATTACA-3'); long sequences of 247 pb – *AluL* (primer forward 5'-GTGGCTCACGCCTGTAATC-3' and primer reverse 5'-CAGGCTGGAGTGCAGTGG-3' (Umetami et al, 2006a).

Each was run with 10 µL of PowerUp SYBR Green Master Mix (2 x) (Applied Biosystems®), 0.3 µM primer, 0.3 µM sense of antisense primer and 5 µL sample of cfDNA and completed with ultrapure water to a final volume of 20 reaction µL. The reaction conditions were as follows: a cycle at 50° C for 2 minutes followed by 1 cycle at 95° C for 2 minutes; 40 cycles to 95° C for 15 seconds with two successive steps of 60° C for 30 seconds each. The dissociation curve for confirmation followed 100 amplification cycles with variation of 0.5° C temperature for 15 seconds cycle in the range of 40° C to 90° C. All tests were done in triplicate. The qPCR reactions were carried out on StepOne Plus (Applied Biosystems®). The amplification results were also confirmed by agarose gel electrophoresis (2%).

For quantification of *AluS* and *AluL* sequences of cfDNA by qPCR, a standard curve with serial dilutions (1; 1/10; 1/100; 1/1000; 1/10000; 1/1000000) was tested in a control sample. The control sample was composed by a pool of cfDNAs from 10 healthy individuals.

The cfDNA integrity index was calculated as the ratio between the concentration of long and short cfDNA fragments (Umetani et al., 2006a). The algorithm for calculating the cfDNA Int used is based on the fact that the *AluS* sequence annealing sites are included within the sequence *AluL*. In cells that undergo apoptosis, the genomic DNA is degraded in regular sized fragments less than 180 bp, however in cells that undergo necrosis DNA is degraded into fragments usually of irregular sizes and larger than 180 bp (Stötzer et al, 2014). Thus, the calculation of the integrity of the cfDNA can be used to suggest the origin of the cfDNA that is in circulation so that the higher the value the greater integrity index the amount of cells that are dying for necrosis as in the case of tumor cells (Umetani et al., 2006b; Jung et al., 2010).

For statistical data processing and analysis, the software GraphPad Prism 6.01 were used. The variables were compared using Student's t-test, Mann-Whitney U test, analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis test. Correlation analysis (Pearson or Spearman) was used to search for association between variables. All data were tested for homoscedasticity and normality. In cases where the data did not show homoscedasticity and / or normality, a logarithmic transformation was employed. The level of significance was $p < 0.05$.

Results

The mean age of breast cancer patients (64.1 ± 10.4) was higher than the patient control group (53.0 ± 8.5). The average tumor size was 22.0 ± 9.0 mm.

Regarding tumor characteristics, tumors of intermediate histological grade with predominance of luminal molecular subtype A were observed (Table 1).

Table 1: Tumor's characteristics

	n (%)	n (%)
	Type 1	Type 2
Histological degree	3 (16.7)	15 (83.3)
	Ductal invasive	Special type
Histological type	16 (88.9)	2 (11.1)
	Negative	Positive
Estrogen receptor	0 (0.0)	18 (100.0)
	Negative	Positive
Progesterone receptor		

	2 (11.1)	16 (88.9)
Her2 receptor	Negative	Positive
	14 (77.8)	4 (22.2)
Ki67 receptor	<14%	≥14%
	13 (72.2)	5 (27.8)
Molecular subtype	Luminal A	Luminal B or Luminal Her2
	11 (61.1)	7 (38.9)

Regarding the comparison of cfDNA levels between patients and controls, a significant increase in whole cfDNA and *AluS* and *AluL* were observed but not of cfDNA integrity (Figure 1).

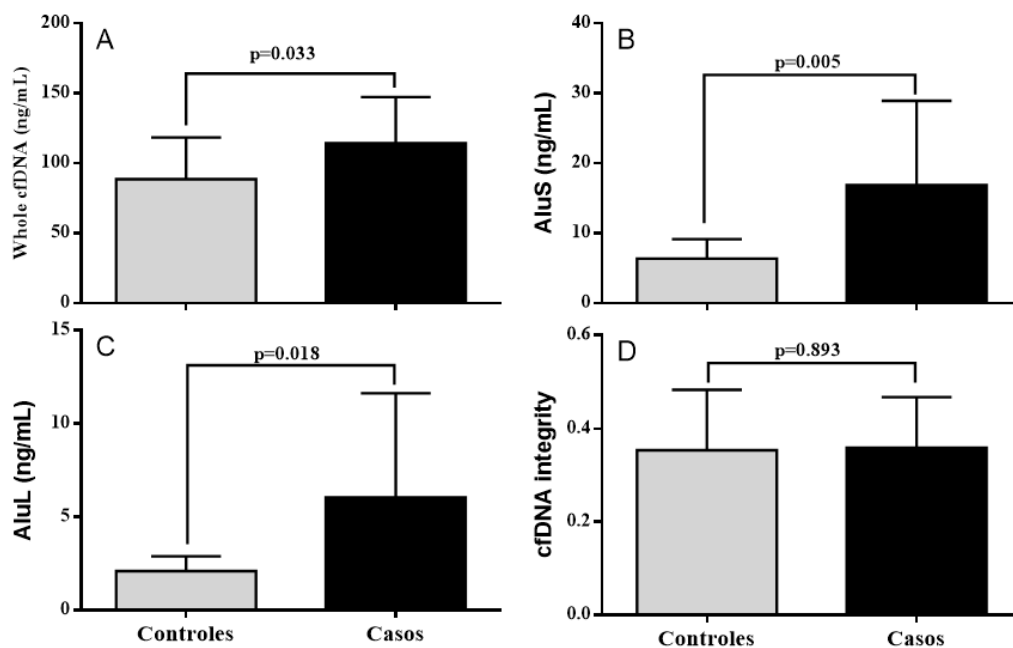


Figure 1. Comparison of cfDNA levels between the control group and patients with breast cancer. p = level of significance level according to Mann Withney U test.

When we compared the concentration of *AluS* and *AluL* in cfDNA with tumor immunohistochemistry, we found no difference for progesterone receptors (Figure 2A-C), Her2 (Fig. 2G-I) or Ki67 (Fig. 2D-F). Regarding the difference between the molecular subtypes, we also did not observe a significant difference (Figure 3).

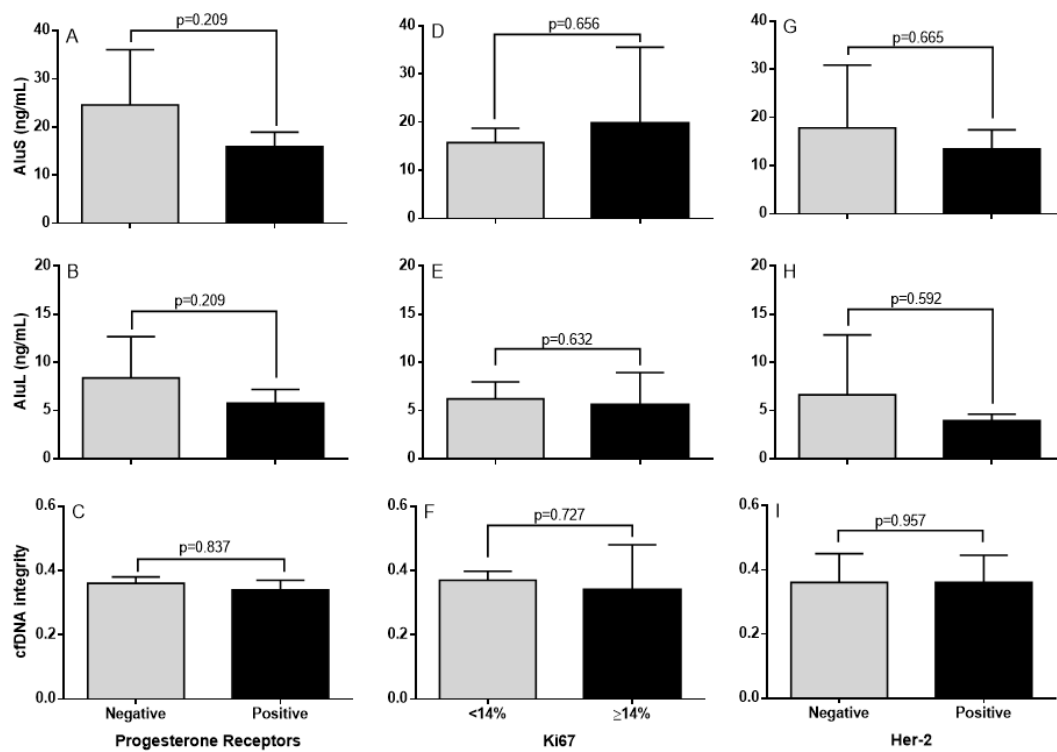


Figure 2. Concentration of *AluS* and *AluL* fragments and the relationship between concentrations, according to the status of the hormonal receptors (A-C), Ki67 (D-F) and Her-2 (G-I). p = level of significance according to the Mann Withney U test.

On the other hand, a significant correlation was observed the size of the tumor and either *AluS* and *AluL* concentrations as well as of the ratio between the cfDNA integrity (Figure 4).

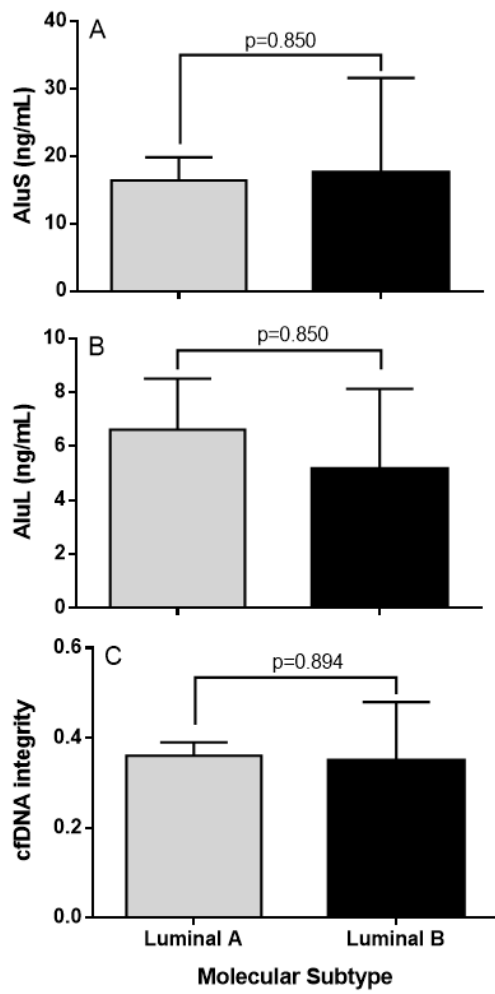


Figure 3 Concentration of *AluS* (A) and *AluL* (B) fragments and the relationship between concentrations (C), according to the luminal molecular subtype. p = level of significance according to the Mann Whitney U test.

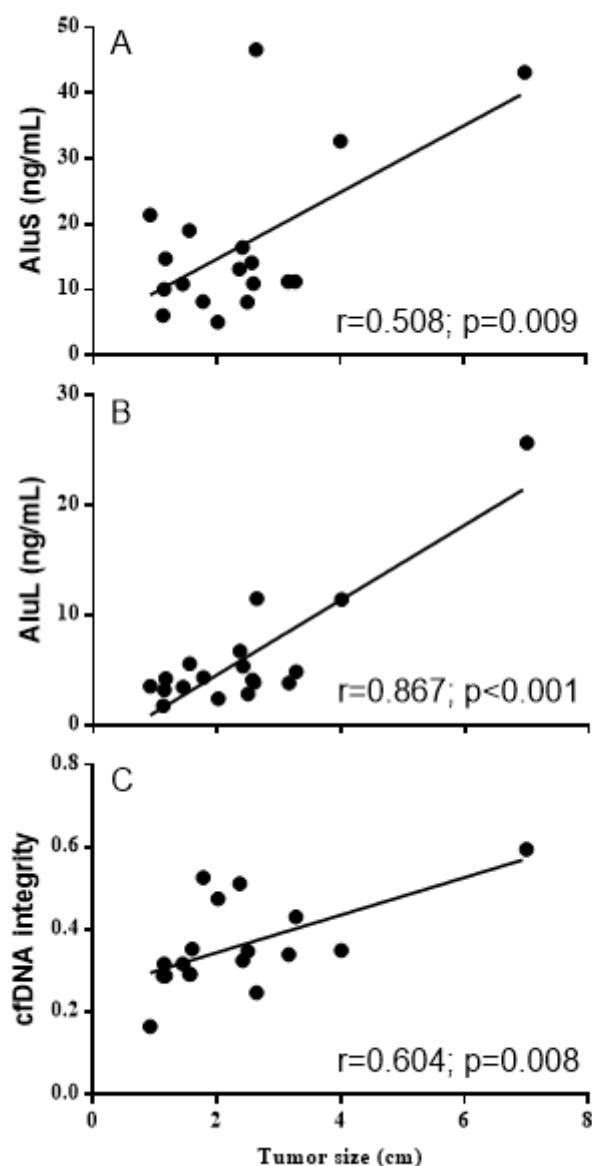


Figure 4. Correlation between the size of the tumors, *AluS* (A), *AluL* (B) and cfDNA integrity (C). r = correlation coefficient and p = significance level by the Spearman r test.

Discussion

The data obtained in this research showed already expected situations and new situations in relation to “liquid biopsy” in breast cancer. First, we observed differences between the cases and controls in total level of cfDNA, *AluL* and *AluS* concentrations but not in the *AluL/AluS* ratio (cfDNA integrity). This result is in agreement with Umetami et al (2006a)

which observed no difference in Alu cfDNA integrity in lower stages tumors (stages 0-I) versus healthy controls and with Stötzer et al (2014) that did not observe changes in integrity in relation to healthy controls irrespective of the severity of the disease. In the case of our study patients were predominantly of stages I and 2 (data not shown).

Similarly to our study, Stötzer et al (2014), Iqbal et al (2015) and Hussein et al (2019) observed increase in either Alu short and long fragments (115 bp amplicon) and long (247 bp amplicon) in relation to controls.

There is no consensus if cfDNA integrity increases or decreases in tumor tissues in relation to non-tumor tissues. Therefore, the proportion of short and long cfDNA molecules derived directly from the tumor tissues seem to depend on the tumor aggressiveness and of which DNA sequence is being evaluated (repetitive DNA elements versus single copy genes) (Sobhani et al, 2018). Moreover, the DNA extraction kit and the type of PCR can also impact results (Liang et al, 2016).

Both necrosis and apoptosis contribute to the increase of cfDNA concentration. The natural selection that strongly affects daughter cells leads to increased cell death, mainly due to necrosis during tumor development. While apoptosis causes small DNA fragments, up to 180 base pairs, necrosis generates usually larger fragments (Jung et al, 2010; Gormally et al, 2007; Sobhani et al, 2018). Therefore, the proportion between short and long cfDNA (integrity) has been applied in different studies (Jiang & Lo, 2016). Notwithstanding, Madhavan et al (2014) showed that cfDNA integrity reduces as a consequence of tumor severity. Cheng et al (2017) observed significant decrease of cfDNA integrity in recurrent breast cancer patients and Cheng et al (2018) observed cfDNA integrity reduction after chemotherapy in breast cancer patients. In our study, cfDNA integrity did not change significantly according to the immunohistochemistry.

In our study we did not observe a correlation between the whole level of cfDNA and tumor size ($r=-0.02$, $p=0.95$) but observed a correlation between tumor size and AluS, AluL and cfDNA integrity. In agreement, Agostini et al (2012) also observed a significant correlation however only for AluL. On the contrary, Umetami et al (2006a) observed a correlation between tumor sizes and cfDNA integrity in breast cancer.

When comparing blood concentrations of cfDNA with immunohistochemistry markers or the molecular subtypes, we did not observe any significant difference. In agreement, Agostini et al (2012) did not observe significant changes in Alu cfDNA integrity according to hormonal receptor status. Also Stötzer et al (2004) did not observe differences in Alu cfDNA according to Her2 and estrogen receptor status but observed a difference in AluL in relation to

progesterone receptor status. In our study, we observed 22% of HER2 positive patients, a number in agreement with the literature. However, no significant association was observed between cfDNA and Her2. The Luminal B subtype also has a worse prognosis, with a lower overall survival, as it is frequently of high histological grade and presents a higher degree of proliferation, with a higher incidence of brain metastases (Cirqueira et al., 2015). However, we did not observe a significant difference in Alu cfDNA in relation to the molecular subtypes.

cfDNA has been indicated as an alternative source of tumor genomic information at different points in the clinical course of the disease (Liang et al., 2016). The discovery of specific tumor markers for diagnosis and post-treatment follow-up of breast cancer is a challenge for researchers. The analysis of cfDNA in plasma, which is being referred to as a "liquid biopsy," is a viable promise, as more and more accurate detection methods are emerging. We know that it is still unlikely to replace the usual diagnostic imaging and biopsy methods by the measurement of cfDNA, but cfDNA could be used as an auxiliary method to monitor the progression of the disease and, consequently, to collaborate in indications of therapies.

The results of the present study indicate that Alu cfDNA differentiate patients and controls however might not be useful to replace immunohistochemistry. Future studies using cfDNA are suggested in advanced cancer. Therefore, in the future and with more studies, cfDNA could be used as an additional indicator of prognosis, since it is a cheaper and minimally invasive compared to the available methods.

Acknowledgments

The authors thank the University Hospital of Santa Maria for allowing the patients participating in the research and for making available the clinical analysis laboratory for collections. The authors also thank the *Laboratório de Biologia Molecular da UNISC*, the *Laboratório de Patologia da UFSM* and the *Laboratório de Análises Clínicas do HUSM*, for performing the lab analysis.

Funding

This study was funded by CAPES and CNPq.

Availability of data and materials

Raw data will be available with the corresponding author and can be obtained upon request.

Authors' Contribution

SIRF and DP participated in study design and data analysis. LP participated in all stages of the research. AR was responsible for lab analysis. All participated in manuscript preparation and review.

Competing interests

Authors declare no conflict of interest.

References

- Agostini M, Enzo MV, Bedin C, Belardinelli V, Goldin E, Del Bianco P, Maschietto E, D'Angelo E, Izzi L, Saccani A, Zavagno G. Circulating cell-free DNA: a promising marker of regional lymphonode metastasis in breast cancer patients. *Cancer Biomarkers*. 1; 11(2-3):89-98, 2002.doi: 10.3233/CBM-2012-0263.
- Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clinical genetics*. 2019. doi: 10.1111/cge.13514.
- Bacchi CE, Prisco F, Carvalho FM, Ojopi EB and Saad ED: Potential economic impact of the 21-gene expression assay on the treatment of breast cancer in Brazil. *Rev Assoc Med Bras* 1992 56: 186-191, 2010. doi: 10.1590/S0104-42302010000200017.
- Blows FM et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*. 25;7(5):e1000279, 2010. doi: 10.1371/journal.pmed.1000279.
- Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomolecular detection and quantification*. 1; 17: 100087, 2019. doi: 10.1016/j.bdq.2019.100087.
- Burstein HJ: The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* 353: 1652-1654, 2005.doi:10.1056/NEJMp058197.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, *et al*: The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-622, 2009. doi:10.1373/clinchem.2008.

Cheng J, Cuk K, Heil J, Golatta M, Schott S, Sohn C, Schneeweiss A, Burwinkel B, Surowy H. Cell-free circulating DNA integrity is an independent predictor of impending breast cancer recurrence. *Oncotarget*. 15; 8(33):54537, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.17384.

Cheng J, Holland-Letz T, Wallwiener M, Surowy H, Cuk K, Schott S, Trumpp A, Pantel K, Sohn C, Schneeweiss A, Burwinkel B. Circulating free DNA integrity and concentration as independent prognostic markers in metastatic breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1; 169(1):69-82, 2018. doi: 10.1007/s10549-018-4666-5.

Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Cysneiros MADPC, Vilela MHT and Freitas-Junior R: Effect of Ki-67 on Immunohistochemical Classification of Luminal A to Luminal B Subtypes of Breast Carcinoma. *Breast J* 21: 465-472, 2015. doi: 10.1111/tbj.12441 PMID:26138552

Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, Zabaglo L, Mallon E, Green AR, Ellis IO, *et al*: Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol* 29: 4273-4278, 2011. doi:10.1200/JCO.2010.31.2835

Dowsett M and Dunbier AK: Emerging biomarkers and new understanding of traditional markers in personalized therapy for breast cancer. *Clin Cancer Res* 14: 8019-8026, 2008. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0974.

El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F and Thierry AR: Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* 424: 222-230, 2013. doi: 10.1016/j.cca.2013.05.022 .

Gormally E, Caboux E, Vineis P and Hainaut P: Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. *Mutat Res* 635: 105-117, 2007. doi:10.1016/j.mrrev.2006.11.002

Hussein NA, Mohamed SN, Ahmed MA. Plasma ALU-247, ALU-115, and cfDNA Integrity as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Breast Cancer. *Applied biochemistry and biotechnology*. 15; 187(3):1028-1045, 2019. doi: 10.1007/s12010-018-2858-4.

Iqbal S, Vishnubhatla S, Raina V, Sharma S, Gogia A, Deo SS, Mathur S, Shukla NK. Circulating cell-free DNA and its integrity as a prognostic marker for breast cancer. *Springerplus*. 1;4(1):265, 2015. doi: 10.1186/s40064-015-1071-y.

INCA: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019. Available at: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Last update: 05/Feb/2019, 16h47. Acessado em 31 de maio de 2019.

Jiang P, Lo YD. The long and short of circulating cell-free DNA and the ins and outs of molecular diagnostics. *Trends in Genetics*. 32(6):360-371, 2016. doi: 10.1016/j.tig.2016.03.009.

Jung K, Fleischhacker M and Rabien A: Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker-a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta* 411: 1611-1624, 2010. doi: 10.1016/j.cca.2010.07.032 PMID:20688053.

Liang DH, Ensor JE, Liu ZB, Patel A, Patel TA, Chang JC and Rodriguez AA: Cell-free DNA as a molecular tool for monitoring disease progression and response to therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 155: 139-149, 2016. doi: 10.1007/s10549-015-3635-5 PMID:26667234

Liu CY, Hung MH, Wang DS, Chu PY, Su JC, Teng TH, Huang CT, Chao TT, Wang CY, Shiau CW, *et al*: Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 16: 431, 2014. doi:10.1186/s13058-014-0431-9 PMID:25228280.

Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, Zucknick M, Nees J, Schott S, Cuk K, Riethdorf S, Trumpp A, Pantel K, Sohn C, Schneeweiss A, Surowy H, Burwinkel B. *Breast Cancer Res Treat* 146: 163, 2014. doi:10.1007/s10549-014-2946-2 PMID:24838941.

Olopade OI, Grushko TA, Nanda R and Huo D: Advances in breast cancer: Pathways to personalized medicine. *Clin Cancer Res* 14: 7988-7999, 2008. doi: 10.1158/1078-0432.

Ormenisan C, Kubik M, Legrand S, Kraemer D, Smotherman C and Masood S: The potential of ki67 and p53 assessment in development of individualized targeted therapy in breast cancer patients. *Pathologica* 107: 177-180, 2015. _PMID: 26946872.

Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol.* 26(7):1291-9, 2015. doi: 10.1093/annonc/mdv022.

Sobhani N, Generali D, Zanconati F, Bortul M, Scaggiante B. Cell-free DNA integrity for the monitoring of breast cancer: Future perspectives?. *World journal of clinical oncology.* 10;9(2):26, 2018. doi: 10.5306/wjco.v9.i2.26.

Stötzer OJ, Lehner J, Fersching-Gierlich D, Nagel D and Holdenrieder S: Diagnostic relevance of plasma DNA and DNA integrity for breast cancer. *Tumour Biol* 35: 1183-1191, 2014. doi: 10.1007/s13277-013-1158-4.

Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S and Hoon DS: Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol* 24: 4270-4276, 2006a. doi:10.1200/JCO.2006.05.9493.

Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ *et al*. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem.* 52(6):1062-1069, 2006b. doi:10.1373/clinchem.2006.068577.

Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC, Roden R, Sokoll LJ, Chan DW and Shih IeM: Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res* 63: 3966-3968, 2003. PMID:12873992.

Wang Y, Yin Q, Yu Q, Zhang J, Liu Z, Wang S, Lv S and Niu Y: A retrospective study of breast cancer subtypes: The risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Res Treat* 130: 489-498, 2011. doi:10.1007/s10549-011-1709-6.

6.2 MANUSCRITO 2

HER2 gene amplification in cfDNA in patients with breast cancer

Licerio Vicente Padoin^{1,2}, Dandara Garlet³, Bernardo Reckziegel Bohn⁴, Caren Ferreira do Nascimento¹, Alexandro Cagliari⁵, Alexandre Rieger⁶, Daniel Prá⁶, Andre Poisl Fay¹

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil

² Serviço de Mastologia, Hospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil

³ Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS), Santa Cruz do Sul, RS, Brasil

⁴ Curso de Química, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS, Brasil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Sustentabilidade, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS), Santa Cruz do Sul, RS, Brasil

⁶ Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS, Brasil

Corresponding Author: Andre Poisl Fay . Av. Ipiranga, 6690 - Prédio 60 (HSL) – Sala 317.
CEP: 90610-000. Porto Alegre/RS, Brazil. Phone: +55513320.3318 - Ext: 3318. E-mail:
andre.fay@pucrs.br

Abstract

The aim of the study was to quantify *HER2* gene amplification in circulating free DNA (cfDNA) in breast cancer patients and to evaluate its concordance with immunohistochemistry results. During core-biopsy at diagnosis, plasma was collected for cfDNA analysis. Tumor size was obtained from ultrasound and mammography and immunohistochemistry was obtained from core-biopsy specimens. The levels of Her2 amplification in cfDNA were quantified by qPCR in a total of 33 cancer patients, being 22 Her2- and 11 Her2+, according to core-biopsy immunohistochemistry. Tumor size correlated positively with the whole cfDNA level. HER2 amplification level in cfDNA did not associate with the tumors' histological subtype or histological grade. An increase in Her2 amplification in cfDNA was observed in immunohistochemistry-positive Her2 patients ($p = 0.004$). The ROC curve was significant (AUC = 0.76, $p=0.016$). Clinical use of HER2 amplification in cfDNA may help to prevent underdiagnosis of HER2 positive tumors due to intratumor heterogeneity.

Key words: breast cancer, Her2, gene amplification, liquid biopsy.

Introduction

Breast cancer is a very common type of tumor among women. It is also considered a heterogeneous group of diseases with various pathological and molecular classes (Liu et al, 2014). Target-specific therapy has been among the most pivotal tools to improve breast cancer survival (Pernas & Tolaney, 2019).

When an anomalous group of cells was recognized in the 1980s, there was a milestone in the treatment and prognosis of breast cancer. This subgroup, which was renamed Her2 positive, was discovered due to expression of the HER2 / neu gene, an oncogene located on chromosome 17, and showed that patients with this higher expression had an unfavorable prognosis in the evolution of breast cancer (Pondé et al., 2018). Her2 is included in the tyrosine kinase receptor family and is recognized in about 20% of malignant breast tumors. The presence of Her2 overexpression is related to greater aggressiveness of the disease with higher rates of relapse and mortality (Olopade et al, 2008; Blows et al, 2010).

A new concept is emerging today regarding the diagnosis and management of breast cancer, which is the “liquid biopsy” (Bronkhorst et al. 2019). The cfDNA liquid biopsy being improved, and its inclusion in breast cancer management is becoming a reality. It can be used as a biomarker in early diagnosis to treatment monitoring and relapse prediction. As an example, in breast cancer, it may allow genetic design of tumors to improve personalized treatment, such as the use of targeted therapies. (Alimirzaie et al, 2019). Because it has a very heterogeneous tumor tissue and immunohistochemistry is performed by a single biopsy, usually core-biopsy, there is a risk that this biopsy will not demonstrate the complete genomic profile of the tumors. In view of this, cfDNA can provide a new, more comprehensive alternative to information and even point to a new course in treatments as the disease develops (Liang et al. 2016).

Therefore, we aimed to quantify the HER2 gene copy number in cfDNA of breast cancer patients and compare it with immunohistochemical findings.

Material and methods

Study design

This is a cross-sectional study. Selection for the study predicted patients of any age, diagnosed with luminal breast cancer. Thirty-three patients were included in the study (22 Her2- and 11 Her2+). All patients and controls came from the University Hospital of the Federal University of Santa Maria (UFSM).

Ethical considerations

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CAAE: 01509918.2.0000.5336; Evaluation Report: 3101887). Only individuals who formally consent to participate by signing the Informed Consent Form were included in the study. The collected biological material will be used specifically for research purposes and will not serve any other purpose.

Patients data

The following data were collected from the medical records and examinations: age, primary tumor size, tumor histological type, histological grade, estrogen and progesterone status, HER2 and Ki67. In the classification of molecular subtypes, the following variables were used: estrogen receptors, progesterone receptors, HER2 and Ki67 (Wang et al, 2011).

Blood collection

Venous blood samples were collected during core-biopsy for cancer diagnosis. The blood was collected by venipuncture in tubes containing EDTA k3 as anticoagulant. The plasma was obtained by 2 successive centrifugations (first at 1,500g for 15 min and second at 15,000g for 15 min). The centrifugations were performed within 2 hours of the blood collection to avoid cfDNA contamination with DNA originated from blood cells degradation (El Messaoudi et al, 2013). The supernatant of the second centrifugation was transferred for microtubes and stored at -20° C until the cfDNA extraction (Stötzer et al 2014)

cfDNA extraction

The cfDNA was extracted from 200 µL plasma using the Biopur Kit Extraction Mini SpinPlus (Biometrix, Brazil) and following the manufacturer's recommendations, being eluted

in a final volume of 50 µL of TE (Tris-EDTA buffer pH = 8.0). CfDNA was quantification with a Qubit fluorometer® 3.0 (Thermo Fisher Scientific ©) and expressed in ng/mL of plasma. The cfDNA samples were stored at -20° C until qPCR.

Quantitative PCR

Quantification of HER2 amplification was performed with reference to CEP17 (Wang et al, 2017). Another reference gene was also used, the human eukaryotic translation initiation factor 2C1 (EIF2C1) gene located at 1p34.3 as an alternative chromosome 17 probes. The use of a reference gene outside chromosome 17 may be important to identify cases of HER2 and CEP17 co-amplification (Tantiwetrueangdet et al. 2018).

HER2 copy number quantification analysis was performed by qPCR on StepOnePlus™ System (Applied Biosystems®) in relation CEP17 and EIF2C1. The following sets of primers and probes were used for the reaction:

HER2

forward 5'-CTCATCGCTCACAACCAAGT-3',
reverse 5'-CAGGGCATAGTTGTCCTCAA-3',
probe 5'-/56FAM/TGTGCGAGG/ZEN/CACCCAGCTCT/3IABkFQ/-3';

CEP17

forward 5'- GCTGATGATCATAAAGCCACAGGTA-3',
reverse 5'- CTGGTGCTCAGGCAGTGC-3',
probe 5'-/5HEX/ACGTGCTGC/ZEN/AATAGGCGGTTGCCTA/3IABkFQ/-3';

EIF2C1

forward 5'- GAGTGATGAGAAGAGAATGGAGAG-3',
reverse 5'- GGATCAGGTTGGACTGGATAAA-3',
probe 5'-/5HEX/AAGGTGGGA/ZEN/AAGGAGAGCACTGTT/3IABkFQ/-3'.

The qPCR reactions were set up in 96-well plates, in a final volume of 20 µL containing up 4 µL of cDNA, 10 µL of the TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems by Life Technologies™), 0,5 µL probe (250 nM), 1,8 µL primer forward (900 nM), 1,8 µL primer reverse (900 nM) and 1,9 µL miliq water. Probes and primers were purchased from Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT)™.

Conditions of qPCR: 2 min at 50°C (activation of Uracil-N glycosylase - UNG) and 95°C 10 min (complete denaturation of cfDNA and activation of DNA Polymerase) followed by 45 cycles of 95°C, 5 s and 60°C, 20 s.

Statistical analysis

For statistical data processing and analysis, the software GraphPad Prism 6.01 were used. The variables were compared using Student's t-test, Mann-Whitney U test, analysis of

variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis test. Correlation analysis (Pearson or Spearman) was used to search for association between variables. All data were tested for homoscedasticity and normality. In cases where the data did not show homoscedasticity and / or normality, a logarithmic transformation was employed. The level of significance was $p < 0.05$.

Results

The average age of breast cancer patients was 56.3 ± 13.0 years, out of 33 patients. The average size of the tumors was 29.4 ± 17.3 mm. Regarding the characteristics of the tumors, the predominant histological type was ductal (87.9%). The predominant histological grade was G2 (72.7%), followed by G1 (9.1%). Her2 tumors predominated (66.7%). Staging is summarized in table 1.

Table 1. Tumor's characteristics

	Ductal	Lobular	Tubular	
Histological type	29 (87.9%)	3 (9.1%)	1 (3.0%)	
	No info	G1	G2	G3
Histological grade	4 (12.1%)	03 (9.1%)	24 (72.7%)	2 (6.1%)
	E1	E2	E3	
Staging	13 (39.4%)	17 (51.5%)	3 (9.1%)	
	Negative		Positive	
Her2 Status	22 (66,7%)		11 (33,3%)	

There was no statistically significant difference between tumor size according to molecular subtype ($p = 0.886$).

A significant correlation was observed between tumor size and whole cfDNA concentration ($r = 0.359$, $p = 0.040$). There was no correlation between tumor size and Her2 amplification ($r = -0.021$, $p = 0.907$).

Comparison between HER2 amplification level and histological type ($p = 0.444$) and histological grade ($p = 0.227$) indicated no significant difference.

A significant increase in fold-change was observed between cfDNAs from negative and positive Her2 patients when CEP17 was used as a reference (Figure 1A).

The ROC curve comparing the fold-changes between cfDNA Her2- and Her2 + was significant when the reference was CEP17 (Figure 1B). A fold-change > 3,122 had a sensitivity of 72% and a specificity of 80% for the CEP17 reference.

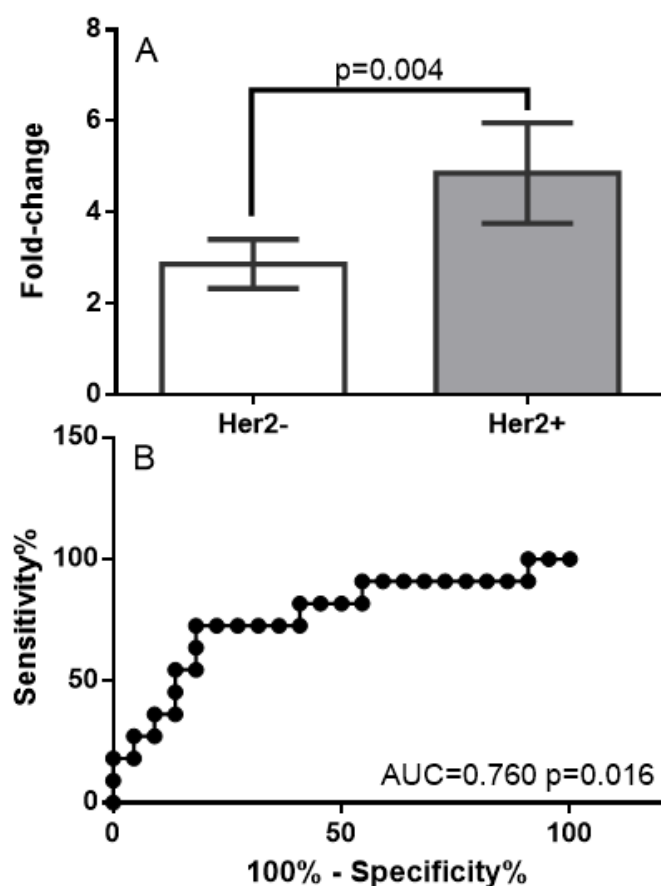


Figure 1. A. Delta-delta cT fold-change of Her2/CEP17 in Luminal Subtype breast cancer patients according to Her2 status. p: level of significance according to Mann-Whitney U test. B. ROC curve of the relationship between the proportions of Her2 / CEP17 in qPCR and immunohistochemical finding for Her2. AUC: area under the curve and P = level of significance.

Discussion

Anti-Her2 target therapy have dramatic improvements in survival in breast cancer both early and advanced settings. Trastuzumab was the first Anti-Her2 drug clinically available from the end of the 1990s and since then Her2-directed therapeutics is continuously evolving (Pernas

& Tolaney, 2019). The analysis of Her2 amplification in cfDNA has been discussed as useful therapeutic tool to guide treatment decisions in breast cancer (Sakai et al, 2018). Her2 profiling has been suggested in tumor biopsies or cell-free DNA from blood at the time of resistance to chemotherapy in people with luminal metastatic breast cancer (Nayar et al 2019).

The amplification or overexpression of HER2 gene occurs between 15%-30% of breast cancers, which is associated with a worse prognosis and an increased risk of recurrence (Burstein, 2005). Recent gene sequencing studies have identified HER2 mutations in approximately 2% of breast cancers, most of which are not associated with HER2 amplification or overexpression (Ding et al, 2019). HER2 alterations have been recently recognized as a mechanism of acquired resistance to estrogen receptor-directed therapy in luminal metastatic breast cancer (Nayar et al, 2019).

In spite of the clinical utility of evaluating Her2 amplification in early cancer diagnosis, many studies quantifying Her2 amplification in cfDNA address advanced breast cancer aiming to monitor metastasis. As an example, Siravegna et al (2017) used clinically Her2 cfDNA measurement in cerebrospinal fluid of Her2-positive cancer patient to track brain metastasis. Conversely, our study attempted to evaluate cfDNA Her2 amplification in the moment of cancer diagnosis.

In our study we only addressed luminal tumors, as they make up over most breast tumors. Estrogen receptor is positive in about 70% of the tumors and acts as target for a well-defined therapy (Nayar et al, 2019). Among the luminals, we separated tumors according to Her2 status. Some authors follow a similar approach (Maisonneuve et al, 2014). This separation makes sense, as Her2 has specific treatment with targeted therapy, including neoadjuvant therapy (Loibl & Gianni, 2017). Moreover, Her2 positive tumors are more aggressive (Cuzik et al, 2009) and are linked to increased long-term mortality (Blows et al, 2010). It is known that Her2 has a function of inhibiting the apoptosis rate (Carpenter & Lo, 2013).

In the present study, we did not observe a relationship between tumor size and Her2 status, neither observed a correlation between cfDNA Her2 amplification and tumor size. Nevertheless, a significant correlation was observed between tumor size and whole cfDNA level.

Contrary to the literature (Kasangian et al., 2017; Jung et al, 2015), the tumors of larger diameters in the diagnosis were not the most undifferentiated. Therefore, it is reiterated that molecular biology is more important than tumor size for disease prognosis (Jung et al, 2015).

We already know that immunohistochemistry and hybridization tests often yield misleading results, and also that Her2 negative tumors can acquire positive status throughout

the disease, greatly impacting appropriate therapy. Therefore, tissue-based techniques can be complemented with cfDNA Her2 analysis both in metastasis monitoring and in those patients who, after negative initial biopsy, acquire amplification (Rich et al, 2019). In agreement, Her2 amplification as identified by cfDNA, which circumvents tissue heterogeneity issues, is emerging as a robust biomarker predictive of response to anti-HER2 agents (Lee et al, 2019).

The fact that there are significantly more Her2 copies in cfDNA from Her2-positive patients in our study indicates the possibility of monitoring Her2 by patient plasma, an inexpensive and minimally invasive method. It can show tumor heterogeneity and also detect some tumor mutations, helping to select patients who may benefit from targeted therapeutic regimens, or indicate other treatment changes (Lee et al, 2019).

Therefore, the perspective of this paper is to test the clinical usability of Her2 amplification in cfDNA. For example, they could submit patients whose core-biopsy immunohistochemistry was negative, and HER2 amplification was elevated, to undergo a new IHQ test on the surgical specimen, and to be monitored at shorter intervals. Clinical use in HER2 amplification in cfDNA has the potential to prevent HER2 positive tumors from being underdiagnosed due to histological heterogeneity, and also to reveal other metastatic sites where HER2 amplification may occur.

Acknowledgement

The authors thank the University Hospital of Santa Maria and the São Lucas Hospital of PUCRS, for allowing patients participating in the research and making clinical laboratory analyzes available for collections. The authors also thank the UNISC Molecular Biology Laboratory, UFSM Pathology Laboratory and HUSM Clinical Analysis Laboratory for the laboratory analysis.

Support

This study was supported by CAPES.

Data and Material Availability

Raw data will be available from the corresponding author and can be obtained on request.

Authors' Contribution

APF and CFN participated in the study design and data analysis. AC, AR, DP and LVP participated in all stages of the research. DG and BRB were responsible for the laboratory analysis. All participated in the preparation and review of the manuscript.

Patient Consent for Publication

The Informed Consent Form contained detailed guidelines for protecting patient data during publication.

Competitive Interests

Authors declare no conflicts of interest.

References

- Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clinical genetics*. 2019. doi: 10.1111/cge.13514.
- Blows FM et al. *PLoS Med*. 25;7(5):e1000279, 2010. doi:10.1371/journal.pmed.1000279.
- Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomolecular detection and quantification*. 1;17: 100087, 2019. doi:10.1016/j.bdq.2019.100087.
- Burstein, H. J. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1652-1654, 2005. doi: 10.1056/NEJMp058197.
- Carpenter, RL. & Lo HW. (2013). Regulation of apoptosis by HER2 in breast cancer. *Journal of carcinogenesis & mutagenesis*, 2013(Suppl 7)., 2013. doi: 10.4172/2157-2518.S7-003
- Cuzick J. Predicting late recurrence in ER-positive breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 15:1, 2019. doi: 10.1038/s41571-019-0228-y.
- Ding, Q. et al. HER2 somatic mutation analysis in breast cancer: correlation with clinicopathological features. *Human pathology*. 24;92:32-38, 2019. doi:10.1016/j.humpath.2019.07.006.

El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, & Thierry AR. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta*, 424, 222-230, 2013. doi:10.1016/j.cca.2013.05.022.

Jung, HA, Park YH, Kim M, Kim S, Chang WJ, Choi MK, Nam SJ. Prognostic relevance of biological subtype overrides that of TNM staging in breast cancer: discordance between stage and biology. *Tumor Biology*, 36(2), 1073-1079, 2015. doi: 10.1007/s13277-014-2730-2.

Lee J, Franovic A, Shiotsu Y, Kim ST, Kim KM, Banks, KC, Lanman, RB. Detection of ERBB2 (HER2) gene amplification events in cell-free DNA and response to anti-HER2 agents in a large Asian cancer patient cohort. *Frontiers in oncology*, 9, 212, 2019. doi:10.3389/fonc.2019.00212.

Liang DH, Ensor JE, Liu ZB, Patel A, Patel TA, Chang JC and Rodriguez AA: Cell-free DNA as a molecular tool for monitoring disease progression and response to therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 155: 139-149, 2016. doi: 10.1007/s10549-015-3635-5.

Liu CY, Hung MH, Wang DS, Chu PY, Su JC, Teng TH, Huang CT, Chao TT, Wang CY, Shiau CW, et al: Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 16: 431, 2014. doi: 10.1186/s13058-014-0431-9.

Loibl, S., & Gianni, L. HER2-positive breast cancer. *The Lancet*, 389(10087), 2415-2429, 2017. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32417-5

Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, Curigliano G., Colleoni M, Dellapasqua S, ... & Pagani G. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Research*, 16(3), R65, 2014. doi:10.1186/bcr3679.

Nayar U, Cohen O, Kapstad C., Cuoco MS, Waks AG, Wander SA, Helvie K. Acquired HER2 mutations in ER+ metastatic breast cancer confer resistance to estrogen receptor-directed therapies. *Nature genetics*, 51(2), 207, 2019. doi: 10.1038/s41588-018-0287-5.

Olopade OI, Grushko TA, Nanda R and Huo D: Advances in breast cancer: Pathways to personalized medicine. *Clin Cancer Res* 14: 7988-7999, 2008. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1211.

Pernas S & Tolaney SM. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. *Therapeutic advances in medical oncology*, 11, 2019. doi: 10.1177/1758835919833519.

Pondé N, Brandao M, El-Hachem G, Werbrouck E, Piccart M. Treatment of advanced HER2-positive breast cancer: 2018 and beyond. *Cancer treatment reviews*. 67:10-20, 2018. doi: doi:10.1016/j.ctrv.2018.04.016.

Rich TA, Raymond VM, Ahn ER, Banks KC, Brufsky A, Lee C, Lippman M, Pluard TJ, Schwab RB, Lanman RB. Cell free DNA analysis identifies actionable ERBB2 amplifications in patients with HER2 equivocal breast cancer [abstract]. In: *Proceedings of the 2018 San Antonio Breast Cancer Symposium*; 2018 Dec 4-8; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res*79(4 Suppl), 2019.

Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(9), 531, 2017. doi:10.1038/nrclinonc.2017.14.

Stötzer OJ, Lehner J, Fersching-Gierlich D, Nagel D and Holdenrieder S: Diagnostic relevance of plasma DNA and DNA integrity for breast cancer. *Tumour Biol* 35: 1183-1191, 2014. doi: 10.1007/s13277-013-1158-4.

Tantiwettrueangdet A, Panvichian R, Wongwaisayawan S, Sueangoen N, & Lertsithichai P (2018). Droplet digital PCR using HER2/EIF2C1 ratio for detection of HER2 amplification in breast cancer tissues. *Medical Oncology*, 35(12), 149. doi:10.1007/s12032-018-1210-8.

Wang Y, Tsang JY, Cui Y, Cui, J, Lin Y, Zhao S, Ke Z. Robust and accurate digital measurement for HER2 amplification in HER2 equivocal breast cancer diagnosis. *Scientific reports*, 7(1), 6752, 2017. doi:10.1038/s41598-017-07176-x.

Wang Y, Yin Q, Yu Q, Zhang J, Liu Z, Wang S, Lv S and Niu Y: A retrospective study of breast cancer subtypes: The risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Res Treat* 130: 489-498, 2011. doi:10.1007/s10549-011-1709-6.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou identificar, na biópsia líquida, a integridade da sequência *Alu* e a amplificação do *HER2* e compará-la com a análise imunoistoquímica. De um modo geral, os resultados mostraram que a integridade das sequências *Alu* do cfDNA parece não ser um marcador relevante, e a amplificação do *HER2* no cfDNA apresentou boa sensibilidade e especificidade em relação à imunoistoquímica.

Os dados obtidos nesta pesquisa mostraram situações já esperadas e novas situações em relação à “biópsia líquida” no câncer de mama. Primeiro, observamos diferenças entre os casos e os controles no nível total das concentrações de cfDNA, *AluL* e *AluS*, mas não na relação *AluL/AluS* (integridade do DNA). Este resultado está de acordo com Umetani et al (2006a), que não observou diferenças na integridade do *Alu* cfDNA nos estágios de tumores inferiores (estágios 0-I) versus controles saudáveis, e com Stötzer et al (2014) que não observaram mudanças na integridade em relação de controles saudáveis, independentemente da gravidade da doença. No caso do nosso estudo, os pacientes eram predominantemente de estágios I e 2 (dados não mostrados).

Similarmente ao nosso estudo, Stötzer et al (2014), Iqbal et al (2015) e Hussein et al (2019) observaram aumento, tanto em fragmentos curtos quanto longos, de *Alu* amplificado (115pb) e longo (amplicon de 247 pb), em relação aos controles.

Não há consenso se a integridade da cfDNA aumenta ou diminui nos tecidos tumorais em relação aos tecidos não tumorais. Portanto, a proporção de moléculas de cfDNA curtas e longas derivadas diretamente dos tecidos tumorais parecem depender da agressividade do tumor e da qual a sequência de DNA está sendo avaliada (elementos de DNA repetitivos versus genes de cópia única) (SOBHANI et al., 2018). Além disso, o kit de extração de DNA e o tipo de PCR também podem afetar os resultados (LIANG et al., 2016).

Tanto a necrose como a apoptose contribuem para o aumento da concentração de cfDNA. A seleção natural que afeta fortemente as células filhas leva ao aumento da morte celular, principalmente devido à necrose durante o desenvolvimento do tumor. Enquanto a apoptose causa pequenos fragmentos de DNA, até 180 pares de bases, a necrose geralmente gera fragmentos maiores (JUNG et al., 2010; GORMALLY et al., 2007; SOBHANI et al., 2018). Portanto, a proporção entre cfDNA curto e longo (integridade) foi aplicada em diferentes estudos (JIANG; LO, 2016). No entanto, Madhavan et al (2014) mostraram que a integridade de cfDNA reduz como consequência da gravidade do tumor. Cheng et al (2017) observaram uma diminuição significativa da integridade do gene cfDNA em pacientes com câncer de mama

recorrente e Cheng et al (2018) observaram redução da integridade do gene após a quimioterapia em pacientes com câncer de mama. Em nosso estudo, a integridade do cfDNA não se alterou significativamente de acordo com a imunoistoquímica.

Apesar da utilidade clínica da avaliação da amplificação de *HER2* no cfDNA no início do diagnóstico de câncer, muitos estudos estão quantificando a amplificação de *HER2* no cfDNA de câncer de mama avançado com o objetivo de monitorar metástases. Como um exemplo, Siravegna et al (2017) usaram clinicamente a dosagem de *HER2* no cfDNA em líquido cefalorraquidiano de paciente com câncer *HER2* positivo para rastrear metástases cerebrais.

Por outro lado, nosso estudo avaliou a amplificação de *HER2* no cfDNA no momento do diagnóstico do câncer. Em nosso estudo, abordamos apenas tumores luminais, já que eles são a maioria dos tumores de mama. O receptor de estrogênio, cujo status é o mais determinante para os tumores serem caracterizados como luminais, é positivo em cerca de 70% dos tumores e atua como alvo para uma terapia bem definida (NAYAR et al., 2019). Entre os luminais, separamos os tumores de acordo com o status de *HER2*. Alguns autores seguem uma abordagem semelhante (MAISONNEUVE et al., 2014). Esta separação faz sentido, sendo que o tumor *HER2* tem tratamento específico com terapia direcionada, incluindo terapia neoadjuvante (LOIBL; GIANNI, 2017). Além disso, os tumores *HER2* positivos são mais agressivos (CUZIK, 2009) e estão ligados ao aumento da mortalidade a longo prazo (BLOWS et al., 2010). Sabe-se que o *HER2* tem a função de inibir a taxa de apoptose (CARPENTER; LO, 2013).

No presente estudo, não observamos relação entre o tamanho do tumor e o status *HER2*, não observamos uma correlação entre a amplificação do *HER2* no cfDNA e tamanho do tumor. No entanto, uma correlação significativa foi observada entre o tamanho do tumor e o nível total de cfDNA.

Ao contrário da literatura (KASANGIAN et al., 2017; JUNG; FLEISCHHACKER; RABIEN, 2010), os tumores de maiores diâmetros no diagnóstico não foram os mais indiferenciados. Portanto, reitera-se que a biologia molecular é mais importante que o tamanho do tumor para o prognóstico da doença (JUNG et al., 2015). Nós já sabemos que os testes imunohistoquímicos e de hibridização geralmente produzem resultados enganosos, e que os tumores negativos *HER2* podem adquirir status positivo no decorrer da doença, afetando muito a terapia apropriada. Portanto, técnicas baseadas em tecidos podem ser complementadas com a análise de *HER2* no cfDNA, tanto na monitoração de metástases, quanto naqueles pacientes que, após biópsia inicial negativa, adquirem amplificação (RICH et al., 2019). Assim sendo, a amplificação do *HER2*, identificada pelo cfDNA, que contorna os problemas de

heterogeneidade do tecido, está emergindo como um biomarcador robusto, que prediz a resposta aos agentes anti-*HER2* (LEE et al., 2019).

O fato de haver significativamente mais cópias de *HER2* em cfDNA de pacientes *HER2* positivos em nosso estudo indica a possibilidade de monitorar *HER2* pelo plasma do paciente, um método barato e minimamente invasivo. Pode mostrar heterogeneidade do tumor e detectar algumas mutações no tumor, ajudando a selecionar pacientes que podem se beneficiar de regimes terapêuticos direcionados, ou indicar outras mudanças no tratamento (LEE et al., 2019).

Portanto, a perspectiva deste estudo é testar a usabilidade clínica da amplificação de *HER2* no cfDNA. Por exemplo, poderíamos submeter pacientes cuja imunoistoquímica da biópsia de fragmento for negativa para *HER2*, e a amplificação de *HER2* no cfDNA estivesse elevada, para se submeter a um novo teste de imunoistoquímica na peça cirúrgica, e para serem monitorados em intervalos mais curtos. A utilização clínica da detecção da amplificação do *HER2* no cfDNA tem o potencial para evitar que os tumores positivos para *HER2* sejam subdiagnosticados devido a heterogeneidade da neoplasia, e, também, indicar a necessidade de pesquisa de outros locais metastáticos, onde possa ocorrer a amplificação do *HER2*.

Algumas limitações metodológicas inerentes a este trabalho precisam ser consideradas como: o número relativamente baixo de pacientes que participaram do estudo, a heterogeneidade da amostra na questão de estilo de vida e idade, bem como a análise de um número relativamente baixo de variáveis. Entretanto, mesmo diante destas limitações os resultados aqui encontrados são relevantes.

8 CONCLUSÃO

- A integridade das sequências *Alu* do cfDNA parece não ser um marcador a ser considerado, nas condições avaliadas.
- A amplificação do *HER2* no cfDNA apresentou boa sensibilidade e especificidade em relação à imunoistoquímica.
- A amplificação do *HER2* tem grande potencial para uso clínico.

REFERÊNCIAS

- ALLISON, K. H., KANDALAFT, P. L., SITLANI, C. M., DINTZIS, S. M., GOWN, A. M. (2012). Routine pathologic parameters can predict Oncotype DX™ recurrence scores in subsets of ER positive patients: who does not always need testing? **Breast cancer research and treatment**. v.131(2), p.413-424, 2012.
- BERNS, K., HORLINGS, H. M., HENNESSY, B. T., MADIREDO, M., HIJMANS, E. M., BEELEN, K. BEIJERSBERGEN, R. L. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. **Cancer cell**. v.12(4), p.395-402, 2007.
- BLITZBLAU, R. C., J. K. HORTON. Radiotherapy after mastectomy. **Surgical Oncology Clinics of North America**. v.22(3); p.563-577, 2013.
- BLOWS, F. M., DRIVER, K. E., SCHMIDT, M. K., BROEKS, A., VAN LEEUWEN, F. E., WESSELING, J., HEIKKILÄ, P. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **PLoS medicine**. v.7(5), e1000279, 2010.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A., JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **A cancer journal for clinicians**. v.68(6), p.394-424, 2018.
- BUITRAGO, F., UEMURA, G., FERREIRA SENA, M.C. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Comunicação em Ciências da Saúde**. v.22, Sup 1:S69-S82, 2011
- BURSTEIN, H. J. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. **New England Journal of Medicine**. v. 353(16), p.1652-1654, 2005.
- BUSTIN, S. A., V. BENES, J. A. GARSON, J. HELLEMANS, J. HUGGETT, M. KUBISTA, R. MUELLER, T. NOLAN, M. W. PFAFFL, G. L. SHIPLEY, J. VANDESOMPELE AND C. T. WITTEWER. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**. v. 55(4): p.611-622, 2009.
- CADY. B., M. D. STONE., J. G. SCHULER, R. THAKUR, M. A. WANNER, P. T. LAVIN. The new era in breast cancer. Invasion, size, and nodal involvement dramatically decreasing as a result of mammographic screening. **The Archives of Surgery**. v. 131(3):p. 301-308, 1996.
- CARDINALE. F., BRUZZI, P., BOLOGNESI, C. Role of micronucleus test in predicting breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. **British journal of cancer**. v. 106(4), p.780, 2012.
- CARPENTER. R.L., LO, H.W. Regulation of Apoptosis by HER2 in Breast Cancer. **Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis**. 2013.
- CHENG, J., CUK, K., HEIL, J., GOLATTA, M., SCHOTT, S., SOHN, C., SUROWY, H. Cell-free circulating DNA integrity is an independent predictor of impending breast cancer recurrence. **Oncotarget**. v.8 (33), 54537, 2017.

CHENG, J., HOLLAND-LETZ, T., WALLWIENER, M., SUROWY, H., CUK, K., SCHOTT, S., BURWINKEL, B. Circulating free DNA integrity and concentration as independent prognostic markers in metastatic breast cancer. **Breast cancer research and treatment**. v.169(1), p.69-82, 2018.

CHUNG, M. A., STEINHOFF M. M., CADY B. Clinical axillary recurrence in breast cancer patients after a negative sentinel node biopsy. **The American Journal of Surgery**. v. 184(4): p.310-314, 2002.

CUZICK, J. Predicting late recurrence in ER-positive breast cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**. 2019.

Dawson, S. J. et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. **The New England Journal of Medicine**. v. 368(13): p.1199-1209, 2013.

DE MELO GAGLIATO, D., JARDIM, D. L. F., MARCHESI, M. S. P., HORTOBAGYI, G. N. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. **Oncotarget**. v.7(39), p.64431, 2016.

DING, Q., CHEN, H., LIM, B., DAMODARAN, S., CHEN, W., TRIPATHY, D., SAHIN, A. A. HER2 somatic mutation analysis in breast cancer: correlation with clinicopathological features. **Human pathology**. 2019.

DUFLOTH, R. M., S. CARVALHO, J. K. HEINRICH, J. Y. SHINZATO, C. C. DOS SANTOS, L. C. ZEFERINO AND F. SCHMITT . Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo Medical Journal**. v. 123(4): p.192-197, 2005.

El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F., Thierry, A. R. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. **Clinica Chimica Acta**. v. 424, p.222-230, 2013.

ELSHIMALI, Y. I., H. KHADDOUR, M. SARKISSYAN, Y. WU AND J. V. VADGAMA. The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. **International Journal of Molecular Sciences**. v.14 (9): p.18925-18958, 2013.

ELSTON, C. W., ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. CW Elston & IO Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403–410: AUTHOR COMMENTARY. *Histopathology*. v.41(3a), 151-151, 2002.

FIGUEIREDO, M.C.P. **Câncer de mama hereditário: rastreamento de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e busca de novos genes de susceptibilidade**. Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia. 117p., 2014.

FRASSON, A., NOVITA, G., MILEN, E. C. **Doenças da mama: guia de bolso baseado em evidências**. In Doenças da mama: guia de bolso baseado em evidências. 2018.

GATSONIS, C., A. R. SAMPSON. Multiple correlation: exact power and sample size calculations. **Psychological Bulletin Journal**. v. 106(3): p.516-524, 1989.

GIERACH, G.L., BURKE, A., ANDERSON, W.F. Epidemiology of triple negative breast cancers. **Breast Diseases**. v.32 (1-2):p.5-24, 2010.

GORMALLY, E., CABOUX, E., VINEIS, P. HAINAUT P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental**. v. 635(2-3): p.105-117, 2007.

HAFETY, B. G., WARD, B., PATHARE, P., SALEM, R., MCKHANN, C., BEINFELD, M., FISCHER, D., REISS, M. Reappraisal of the role of axillary lymph node dissection in the conservative treatment of breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v. 15(2): p.691-700,1997.

HAN, X., WANG, J., SUN, Y. Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection. **Genomics Proteomics Bioinformatics**. v.15 (2):p.59-72, 2017.

HEEMSKERK-GERRITSEN, B. A., ROOKUS, M. A., AALFS, C. M., AUSEMS, M. G., COLLÉE, J. M., JANSEN, L., MOOIJ, T. M. Improved overall survival after contralateral risk-reducing mastectomy in BRCA1/2 mutation carriers with a history of unilateral breast cancer: a prospective analysis. **International journal of cancer**. v.136 (3), p.668-677, 2015.

HUDIS, C. A. Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. **New England journal of medicine**. v. 357(1), p.39-51, 2007.

HUSSEIN, N. A., MOHAMED, S. N., & AHMED, M. A. Plasma ALU-247, ALU-115, and cfDNA Integrity as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Breast Cancer. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 187(3), p.1028-1045, 2019.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

IQBAL, S., VISHNUBHATLA, S., RAINA, V., SHARMA, S., GOGIA, A., DEO, S. S., SHUKLA, N. K. Circulating cell-free DNA and its integrity as a prognostic marker for breast cancer. **Springerplus**. v. 4(1), 265, 2015.

JIANG, P., LO, Y. D. The long and short of circulating cell-free DNA and the ins and outs of molecular diagnostics. **Trends in Genetics**. v. 32(6), 360-371, 2016.

JUNG, H.A. et al. Prognostic relevance of biological subtype overrides that of TNM staging in breast cancer: discordance between stage and biology. **Tumor Biology**. v. 36: 1073, 2015.

JUNG, K., FLEISCHHACKER, M., RABIEN, A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. **Clinica chimica acta**. v. 411(21-22), p.1611-1624, 2010.

KASANGIAN, A.A. et al. The prognostic role of tumor size in early breast cancer in the era of molecular biology. **PLoS One**.12(12):e0189127, 2017.

KOS, Z., DABBS, D. J. Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer. **Histopathology**. v. 68(1), p.70-85, 2016.

KROP, I., ISMAILA, N., ANDRE, F., BAST, R. C., BARLOW, W., COLLYAR, D. E., VAN POZNAK, C. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline focused update. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**. v. 35(24), 2838, 2017.

KUCHENBAECKER, K. B., HOPPER, J. L., BARNES, D. R., PHILLIPS, K. A., MOOIJ, T. M., ROOS-BLOM, M. J., GOLDGAR, D. E. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Jama**. v. 317(23), p.2402-2416, 2017.

LEE, J., FRANOVIC, A., SHIOTSU, Y., KIM, S. T., KIM, K. M., BANKS, K. C., LANMAN, R. B. Detection of ERBB2 (HER2) gene amplification events in cell-free DNA and response to anti-HER2 agents in a large Asian cancer patient cohort. **Frontiers in oncology**. v. 9, 212, 2019.

LEHNER, J., STOTZER, O. J., FERSCHING, D., NAGEL, D., HOLDENRIEDER S. Circulating plasma DNA and DNA integrity in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. **Clinica Chimica Acta**.v.425, p.206-211, 2013.

LIANG, D. H., ENSOR, J. E., LIU, Z. B., PATEL, A., PATEL, T. A., CHANG, J. C., RODRIGUEZ, A. A. Cell-free DNA as a molecular tool for monitoring disease progression and response to therapy in breast cancer patients. **Breast cancer research and treatment**. v. 155(1), p.139-149, 2016.

LOIBL, S., GIANNI, L. HER2-positive breast cancer. **Lancet**. v. 389(10087), p.2415-2429, 2017.

MADHAVAN, D., M. WALLWIENER, K. BENTS, M. ZUCKNICK, J. NEES, S. SCHOTT, K. CUK, S. RIETHDORF, A. TRUMPP, K. PANTEL, C. SOHN, A. SCHNEEWEISS, H. SUROWY, B. BURWINKEL. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 146(1), p. 163-174, 2014.

MAISONNEUVE, P. et al. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. **Breast Cancer Research**. v. 16(3):R65, 2014.

MAKKI J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**. v.8, p.23-31, 2015.

MALO, T. L., LIPKUS, I., WILSON, T., HAN, H. S., ACS, G., VADAPARAMPIL, S. T. Treatment choices based on OncotypeDx in the breast oncology care setting. **Journal of cancer epidemiology**. 2012.

MÉHES, G. Liquid biopsy for predictive mutational profiling of solid cancer: The pathologist's perspective. **Journal of Biotechnology**. v. 20, p. 66-70, 2019.

MOJA, L., TAGLIABUE, L., BALDUZZI, S., PARMELLI, E., PISTOTTI, V., GUARNERI, V., D'AMICO, R. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. **Cochrane database of systematic reviews**. 2012.

MORALES, M.E., WHITE, T.B., STREVA, V.A., DEFREECE, C.B., HEDGES, D.J., DEININGER, P.L. The contribution of alu elements to mutagenic DNA double-strand break repair. **PLoS Genetics**. 2015.

NAYAR, U., COHEN, O., KAPSTAD, C., CUOCO, M. S., WAKS, A. G., WANDER, S. A., HELVIE, K. Acquired HER2 mutations in ER+ metastatic breast cancer confer resistance to estrogen receptor-directed therapies. **Nature genetics**. v. 51(2), p.207, 2019.

PAGE, K., GUTTERY, D. S., FERNANDEZ-GARCIA, D., HILLS, A., HASTINGS, R. K., LUO, J., COOMBES, R. C. Next generation sequencing of circulating cell-free DNA for evaluating mutations and gene amplification in metastatic breast cancer. **Clinical chemistry**. v. 63(2), p.532-541, 2017.

PALACIOS, J., ANDREU, X., CALASANZ, M. J., CONCHA, Á., COROMINAS, J. M., GARCÍA-CABALLERO, T., COLOMER, R. Recomendación para la determinación de HER2 en cáncer de mama. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). **Revista Española de Patología**. v. 42(1), p.3-16, 2009.

PERNAS, S., TOLANEY, S. M. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. **Therapeutic advances in medical oncology**. 2019.

PEREIRA, C.M.B.L. **Expressão dos genes C-MYC, HER2 e receptores hormonais como preditores de resposta á quimioterapia neoadjuvante em câncer mamário**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Neurociências e Biologia Celular. 71p., 2010

PICCART-GEBHART, M. J., PROCTER, M., LEYLAND-JONES, B., GOLDBIRSH, A., UNTCH, M., SMITH, I., CAMERON, D. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **New England Journal of Medicine**. v. 353(16), p.1659-1672, 2005.

QIU, P. F., LIU, J. J., WANG, Y. S., YANG, G. R., LIU, Y. B., SUN, X., WANG, C. J., ZHANG, Z. P. Risk factors for sentinel lymph node metastasis and validation study of the MSKCC nomogram in breast cancer patients. **Japanese Journal of Clinical Oncology**. v. 42(11): p.1002-1007, 2012.

RAKHA, E. A., PINDER, S. E., BARTLETT, J. M., IBRAHIM, M., STARCZYNSKI, J., CARDER, P. J., ELLIS, I. O. Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer. **Journal of clinical pathology**. v. 68(2), p.93-99, 2015.

RECHT, A. et al. Integration of conservative surgery, radiotherapy, and chemotherapy for the treatment of early-stage, node-positive breast cancer: sequencing, timing, and outcome. **Journal of Clinical Oncology**. v. 9(9), p.1662-1667, 1991.

RICH, T.A., RAYMOND, V.M., AHN, E.R., BANKS, K.C., BRUFISKY, A., LEE, C., LIPPMAN, M., PLUARD, T.J., SCHWAB, R.B., LANMAN, R.B. Cell free DNA analysis

identifies actionable ERBB2 amplifications in patients with HER2 equivocal breast cancer [abstract]. In: Proceedings of the 2018 San Antonio Breast Cancer Symposium; 2018 Dec 4-8; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Research 2019;79(4 Suppl):Abstract nr P4-01-05.

ROA, J. C., ANABALON, L., TAPIA O., MARTINEZ, J., ARAYA, J. C., VILLASECA, M., GUZMAN, P., ROA, I. Promoter methylation profile in breast cancer. **Revista Médica do Chile**. v. 132(9), p.1069-1077, 2004.

RUBIN, I., YARDEN, Y. The basic biology of HER2. **Annals of oncology**. v. 12(suppl_1), S3-S8, 2001.

SAKAI, H. et al. HER2 genomic amplification in circulating tumor DNA and estrogen receptor positivity predict primary resistance to trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. **Breast Cancer**. v. 25(5), p.605-613, 2018.

SANTEN, R. J., BOYD, N. F., CHLEBOWSKI, R. T., CUMMINGS, S., CUZICK, J., DOWSETT, M., HOWELL, A. Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. **Endocrine-related cancer**. v.14(2), p.169-187, 2007.

SARDANELLI, F., BOETES, C., BORISCH, B., DECKER, T., FEDERICO, M., GILBERT, F. J., MANSEL, R. E. Magnetic resonance imaging of the breast: recommendations from the EUSOMA working group. **European journal of cancer**. v. 46(8), p.1296-1316, 2010.

SENKUS, E., KYRIAKIDES, S., PENAULT-LLORCA, F., POORTMANS, P., THOMPSON, A., ZACKRISSON, S. ESMO Guidelines Working Group. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. 2013.

SIRAVEGNA, G., MARSONI, S., SIENA, S., BARDELLI, A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. **Nature reviews Clinical oncology**. v. 14(9), p.531, 2017.

SHIOVITZ, S., KORDE, L. A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. **Annals of Oncology**. v. 26(7), p.1291-1299, 2015.

SMITH, R. A., DUFFY, S. W., TABÁR, L. Breast cancer screening: the evolving evidence. **Oncology**. v. 26(5), 2012.

SOBHANI, N., GENERALI, D., ZANCONATI, F., BORTUL, M., & SCAGGIANTE, B. Cell-free DNA integrity for the monitoring of breast cancer: Future perspectives?. **World journal of clinical oncology**. v. 9(2), p.26., 2018.

SPARANO, J. A., GRAY, R. J., MAKOWER, D. F., PRITCHARD, K. I., ALBAIN, K. S., HAYES, D. F., LIVELY, T. Adjuvant chemotherapy guided by a 21-gene expression assay in breast cancer. **New England Journal of Medicine**. v. 379(2), p.111-121, 2018.

STOTZER, O. J., LEHNER, J., FERSCHING-GIERLICH, D., NAGEL, D., HOLDENRIEDER, S. Diagnostic relevance of plasma DNA and DNA integrity for breast cancer. **Tumour Biology**. v.35(2): p.1183-1191, 2014.

TANTIWETRUEANGDET, A., PANVICHIAN, R., WONGWAISAYAWAN, S., SUEANGOEN, N., LERTSITHICHA, P. Droplet digital PCR using HER2/EIF2C1 ratio for detection of HER2 amplification in breast cancer tissues. **Medical Oncology**. v. 35(12), p.149, 2018.

TUNG, N., DOMCHEK, S. M., STADLER, Z., NATHANSON, K. L., COUCH, F., GARBER, J. E., ROBSON, M. E. Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations. **Nature reviews Clinical oncology**. v. 13(9), p.581-588, 2016.

VALENCIA, O. M., SAMUEL, S. E., VISCUSI, R. K., RIAL, T. S., NEUMAYER, L. A., AZIZ, H. The role of genetic testing in patients with breast cancer: a review. **JAMA surgery**. v. 152(6), p.589-594, 2017.

UMETANI, N., KIM, J., HIRAMATSU, S., REBER, H. A., HINES, O. J., BILCHIK A. J., HOON, D. S. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or perianapillary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. **Clinical Chemistry**. v. 52(6), p. 1062-1069, 2006.

WANG, B. G., HUANG, H. Y., CHEN, Y. C., BRISTOW, R. E., KASSAU, K., CHENG, C. C., RODEN, R., SOKOLL, L. J., CHAN, D. W., SHIH I.M. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. **Cancer Research**. v. 63(14), p.3966-3968, 2003.

WISHART, G. C. et al. Predict Plus : development and validation of a prognostic model for early breast cancer that includes HER2. **British journal of cancer**. v. 107(5), p.800-807, 2012.

VON MINCKWITZ, G., PROCTER, M., DE AZAMBUJA, E., ZARDAVAS, D., BENYUNES, M., VIALE, G., KNOTT, A. Adjuvant pertuzumab and trastuzumab in early HER2-positive breast cancer. **New England Journal of Medicine**. v. 377(2), p.122-131, 2017.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Carta de Aprovação do CEP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Quantificação da amplificação do gene Her2 na biópsia líquida e no fragmento de core-

biopsy no câncer de mama. **Pesquisador:** André Poisl Fay

Area Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise

ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 01509918.2.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA **Patrocinador**

Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.101.887

Apresentação do Projeto:

Título: Quantificação da amplificação do gene Her2 na biópsia líquida e no fragmento de core-biopsy no câncer de mama.

Pesquisador Responsável: André Poisl Fay

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo: Quantificar a amplificação do gene Her2 através da amostra do plasma (biópsia líquida) e da análise do fragmento de core-biopsy de pacientes com câncer de mama e avaliar a relação dos resultados destes com os subtipos moleculares e com a integridade do DNA circulante livre de células (cfDNA)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O principal risco ou dificuldade que pode-se encontrar com o presente estudo é a dificuldade de obter todos os participantes estimados para a amostra.

Benefícios: Gerar dados que possam comprovar a utilização do teste de integridade do cfDNA e da amplificação do Her2 como marcadores moleculares para câncer de mama, subsidiando a validação da biópsia líquida como técnica mais sensível e específica.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703 **Bairro:** Partenon

UF: RS **Município:** **Telefone:** (51)3320-3345

CEP: 90.619-900

Fax: (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

PORTO ALEGRE

Página 01 de 03

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 3.101.887

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Proposta de doutorado, adequadamente planejada e estruturada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos adequados e pertinentes.

Recomendações:

Atualizar Cronograma de execução (data de início das etapas) nas Informações Básicas do Projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovação com recomendação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o CEP-PUCRS, de acordo com suas atribuições definidas nas Resoluções CNS nº 466 de 2012, nº 510 de 2016 e Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1230144.pdf	19/10/2018 20:40:03		Aceito
Outros	Documento_Unificado.pdf	19/10/2018 20:39:04	André Poisl Fay	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	19/10/2018 20:36:53	André Poisl Fay	Aceito

Outros	carta_pendencias.pdf	19/10/2018 20:31:55	André Poisl Fay	Aceito
Outros	cartacep.pdf	19/10/2018 20:22:17	André Poisl Fay	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_biomol.pdf	28/09/2018 19:53:33	André Poisl Fay	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_sigilo.pdf	28/09/2018 19:52:50	André Poisl Fay	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_onco.pdf	28/09/2018 19:52:28	André Poisl Fay	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_pato.pdf	28/09/2018 19:47:35	André Poisl Fay	Aceito
Declaração de Instituição e	Carta_radio.pdf	28/09/2018 19:46:19	André Poisl Fay	Aceito

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703 **Bairro:** Partenon

UF: RS **Município:** **Telefone:** (51)3320-3345

CEP: 90.619-900

Fax: (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

PORTO ALEGRE

Página 02 de 03

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 3.101.887

Infraestrutura	Carta_radio.pdf	28/09/2018 19:46:19	André Poisl Fay	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	28/09/2018 19:33:56	André Poisl Fay	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/09/2018 19:33:20	André Poisl Fay	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	28/09/2018 19:18:00	André Poisl Fay	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_autoriz_Unisc.pdf	28/09/2018 19:16:11	André Poisl Fay	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_autoriz_HUSM.pdf	28/09/2018 19:15:57	André Poisl Fay	Aceito

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_autoriz_HSL.pdf	28/09/2018 19:15:45	André Poisl Fay	Aceito
--	-----------------------	------------------------	--------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 24 de Dezembro de 2018

Assinado por:**Paulo Vinicius Sporleder de Souza (Coordenador(a))****Endereço:** Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703 **Bairro:** Partenon**UF:** RS **Município:** **Telefone:** (51)3320-3345**CEP:** 90.619-900**Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@puers.br

PORTO ALEGRE

ANEXO

Anexo 1- Comprovante de submissão Manuscrito

Dear Dr Daniel Pra,

Thank you for submitting your manuscript.

Your submission has been received successfully, and has been assigned the electronic submission number: 236066

Please click on the link below and log in to access and track the progress of your submission:

<https://www.spandidos-publications.com/osats/>

Your submission will first be checked for completeness and conformance to our guidelines. In the event that any corrections are required prior to evaluation you will be notified shortly. Once your submission has passed our initial checks it will be sent for evaluation by our Editorial Office.

Subsequently, the final decision will be forwarded to you at that time.

Kind
Spandidos Publications

regards

Publication charges for Molecular and Clinical Oncology

We offer two publication options:

Option 1

Basic charge (for up to 5 pages): £230

Additional pages: £100

Color pages: £340

Option 2

A fixed charge is applied irrespective of the total number of pages or color figures. This option complies with a number of funding bodies

International Journal of Molecular Medicine £1,320

Molecular Medicine Reports £1030

Oncology Letters £840

Experimental and Therapeutic Medicine £840

Molecular and Clinical Oncology £840

Biomedical Reports £840

Note: this is an automatically generated email. Please do not reply to this email address.

Queries can be directed to: contact@spandidos-publications.com



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br