

**DETECÇÃO DE MARCADORES DE INVASÃO EM
MICROÊMBOS TUMORAIS CIRCULANTES E SUA
CORRELAÇÃO COM EVOLUÇÃO CLÍNICA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

MARCELLO FERRETTI FANELLI

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Ludmilla Thomé Domingos
Chinen**

**São Paulo
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Fanelli, Marcello Ferretti

Deteccão de marcadores de invasão em microêmbolos tumorais circulantes e sua correlação com evolução clínica em pacientes com câncer de cabeça e pescoço / Marcello Ferretti Fanelli – São Paulo, 2017.
54p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores: 1. Neoplasias de Cabeça e Pescoço/Head and Neck Neoplasms. 2. Células Neoplásicas Circulantes/Neoplastic Cells, Circulating. 3. Incidência/Incidence. 4. Evolução Clínica/Clinical Evolution

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.” (Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Ludmilla T. D. Chinen, por acreditar na viabilidade de um projeto de pesquisa de longo prazo e de difícil execução, pela dedicação e perseverança poucas vezes vista. Pelo tempo dedicado e renúncias feitas em função de um trabalho. Pelo convívio e pela amizade. Por tudo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani (*in memoriam*) que anteviu o potencial de pesquisa do tema abordado nesta tese. Pelo privilégio de ter concedido a mim a direção do Departamento de Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center, num momento tão inicial de minha carreira. Pelas longas conversas, pela confiança em mim depositada, meu respeito e admiração.

Ao Departamento de Oncologia Clínica, a todos que lá estão hoje e que um dia por lá passaram. À oportunidade de aprendizado contínuo, troca de experiências e o enfrentamento das várias adversidades, durante tantos anos, que puderam nos ensinar e fortalecer. Pelo respeito e amizade de muitos de vocês.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, que apoiou o início do projeto de células tumorais circulantes na Instituição e que sempre trabalhou pelo ensino e pesquisa no A.C.Camargo Cancer Center.

Ao A.C.Camargo Cancer Center, nossa querida Instituição, que me ensinou muito do que faço hoje e ofereceu-me a oportunidade de muitos anos de convívio com grandes profissionais de qualidades difíceis de serem descritas e igualadas.

Aos médicos residentes, de tantas turmas. Pela amizade, pelo brilhantismo, pela dedicação aos pacientes e à Instituição. Por onde quer que estejam,

dentro dos muros do próprio Hospital ou fora dele, honrando tudo que lhes foi ensinado.

Aos nossos pacientes e suas famílias, que nos confiaram suas vidas em um momento tão delicado.

Ao Sr. Ronald Tamborelli, pelo profissionalismo, disponibilidade e dedicação. Meu respeito, reconhecimento, gratidão e amizade.

À Sras. Maria Sueli Barbosa e Vanessa da Silva Lima, pelos anos de trabalho, dedicação e compreensão.

Aos funcionários do Departamento de Oncologia Clínica e de todo A.C.Camargo Cancer Center.

À minha família, pela paciência, apoio e compreensão. À minha esposa, Adriana, meu reconhecimento por tudo que faz e representa, além de minha gratidão eterna. Aos meus queridos filhos, meu muito obrigado pela simples existência de vocês.

RESUMO

Fanelli MF. **Detecção de marcadores de invasão em microêmbolos tumorais circulantes e sua correlação com evolução clínica em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O entendimento do processo de metástase é objeto de estudo da medicina por mais de um século. O conhecimento vigente aponta as células tumorais circulantes (CTCs) como uma importante ferramenta na prática oncológica, devido a sua significância clínica prognóstica e preditiva em muitos tipos de tumores sólidos. Contudo, pouco se sabe a respeito dos microêmbolos tumorais circulantes (MTCs), CTCs dispostas em agrupamentos. Teoricamente, MTCs podem escapar do sistema imune de forma mais efetiva. Este projeto visa observar a incidência de MTCs e CTCs, e, sobretudo, caracterizar de forma molecular estes *clusters* de células.

Objetivos: Este estudo teve como objetivo determinar a incidência de MTCs em uma população de pacientes portadores de câncer epidermóide de cabeça e pescoço atendidos no A.C.Camargo Cancer Center; caracterizar e sobrevida livre de progressão (SLP) dos pacientes portadores de MTCs; caracterizar molecularmente as CTCs contidas nos MTCs para avaliar presença de marcadores de invasão nas mesmas, como TGF- β e MMP-2.

Pacientes e Métodos: Foram avaliados de forma retrospectiva os dados e as membranas de ISET dos pacientes incluídos no estudo: **CEP 1777/13C** (estudo do papel das CTCs em pacientes com câncer epidermóide de cabeça e pescoço). As membranas de ISET para análise imunocitoquímica das CTCs e MTCs estavam estocadas a -20°C. **Resultados:** foram incluídos 53 pacientes. Os pacientes com MTCs presentes no *baseline* (MTC1) e no primeiro seguimento (MTC2), apresentaram SLP inferior, embora sem significância estatística ($p > 0,05$). Comparando MTC1 com MTC2, pacientes com MTC1-positivos que se tornaram MTC2-negativos foram classificados

como evolução favorável (ILP = 20 meses). Os pacientes com evolução desfavorável (MTC1-negativo / MTC2-positivo) tiveram SLP mediana de 17,5 meses. Pacientes sempre negativos para MTC mostraram PFS de 22,42 meses e aqueles sempre positivos, 4,7 meses ($p < 0,001$). A expressão de TGF- β RI em CTC no primeiro seguimento (iCTCs e MTC) significou SLP desfavorável (12 meses x 26 meses; $p = 0,007$) e foi um fator prognóstico independente (HR = 6,088; $p = 0,033$). MMP-2 não mostrou relação com PFS. **Conclusões:** Ficou caracterizada a expressão de TGF- β RI em iCTCs / MTC, assim como o papel da CTM em pacientes com CCP localmente avançado e sua relação com SLP desfavorável.

SUMMARY

Fanelli MF. **[Detection of invasion markers in circulating tumor microemboli and their correlation with clinical evolution in patients with head and neck cancer]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Understanding the process of metastasis has been the subject of medical study for more than a century. Current knowledge suggests circulating tumor cells (CTCs) as an important tool in cancer practice because of its prognostic and clinical significance in many types of solid tumors. However, little is known about circulating tumor microemboli (CTMs), CTCs arranged in clusters. Theoretically, CTMs can escape from the immune system more effectively. This project analyses the incidence of CTMs and CTCs, and above all, characterize from a molecular point of view these cell clusters. **Objectives:** This study aimed to determine the incidence of CTMs in a population of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated at the A.C.Camargo Cancer Center; to evaluate overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in the first line of patients with CTMs; molecular characterization of the CTCs contained in the CTMs to verify the presence of invasion markers, such as TGF- β and MMP-2. **Patients and Methods:** The data and ISET membranes of the patients included in the study CEP 1777/13C were retrospectively evaluated (study of the role of CTCs in patients with epidermoid cancer of the head and neck). ISET membranes for immunocytochemical analysis of CTCs and CTMs were stored at -20 °C. **Results:** 53 patients were included. Patients with CTMs present at the baseline (CTM 1) and at the first follow-up (CTM 2) had lower PFS, although not statistically significant ($p > 0.05$). Comparing CTM 1 with CTM 2, patients with CTM -positive that became CTM -negative were classified as favorable evolution (PFS = 20 months). Patients with unfavorable evolution (CTM 1-negative / CTM 2-positive) had median PFS of

17.5 months. Patients always negative for CTM showed PFS of 22.42 months and those always positive, 4.7 months ($p < 0.001$). Expression of TGF- β RI in CTCs, at the first follow-up (isolated CTCs and CTM), meant unfavorable PFS (12 months x 26 months; $p = 0.007$) and was an independent prognostic factor (HR = 6.088; $p = 0.033$). MMP-2 showed no relationship with PFS. **Conclusions:** The expression of TGF- β RI in iCTCs / CTM was characterized, as was the role of CTM in patients with locally advanced CCP and its relation with unfavorable PFS.

LISTA DE FIGURA, QUADROS E TABELAS

Figura 1	Principais vias celulares e moleculares implicadas na gênese tumoral dos carcinomas espinocelulares dos tumores de cabeça e pescoço.....	7
Quadro 1	Opções no tratamento do CCP em estágio inicial.....	11
Quadro 2	QT de indução versus Quimiorradioterapia.....	16
Tabela 1	Taxa de sobrevida, segundo estadiamento.....	2
Tabela 2	Cetuximabe no tratamento do CCP, recidivado ou metastático.....	17
Tabela 3	QT no tratamento da doença metastática.....	18
Tabela 4	CTCs em câncer de cabeça e pescoço.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracil
AJCC	<i>American Joint Commission on Cancer</i>
CCP	Câncer de Cabeça e Pescoço
CDDP	Cisplatina
CDK	Ciclina dependente de Quinase
CEC	Carcinoma espinocelular
CPNPC	Câncer de Pulmão Não Pequenas Células
CRT	Quimioradioterapia
CTC(s)	Células Tumorais Circulante(s)
DTCs	<i>Disseminating Tumor Cells</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	<i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i>
EPV	<i>Epstein Barr Virus</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency virus</i>
HPV	<i>Human papilloma virus</i>
iCTC(s)	Células tumorais circulantes isolada(s)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISSET	<i>Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells</i>
LAv	Localmente avançado
MTC(s)	Microêmbolos tumorais circulante(s)
MTX	<i>Metotrexate</i>
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
SG	Sobrevida Global
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
SLR	Sobrevida Livre de Recorrência
TPP	Tempo para progressão

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Cabeça e Pescoço: epidemiologia, estadiamento e tratamento...	1
1.1.1	Estadiamento.....	8
1.1.2	Tratamento Dos CCP	10
1.1.3	Doença Inicial (Estádio I e II).....	10
1.1.4	Tratamento da Doença Localmente Avançada	12
1.1.5	Tratamento da Doença Recidivada ou Metastática.....	17
1.2	Células Tumorais Circulantes (CTCs) e microêmbolos tumorais circulantes	19
1.3	CTCS e MTC em Câncer de Cabeça e Pescoço	27
2	OBJETIVOS.....	32
3	ARTIGO PUBLICADO – <i>HEAD AND NECK</i>	33
4	CONCLUSÕES	43
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	44

ANEXOS

Anexo 1 Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Capítulo de Livro

Anexo 3 Artigo 2 Publicado-*Oncotargets and Therapy*

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO: EPIDEMIOLOGIA, ESTADIAMENTO E TRATAMENTO

Os tumores de cabeça e pescoço compreendem tumores presentes na cavidade oral, faringe, laringe, cavidade nasal, seios paranasais, tireóide e glândulas salivares, incluindo uma grande variedade de tipos histológicos, podendo se referir aos seguintes sítios anatômicos:

- Cavidade oral: lábios, mucosa oral, face anterior da língua, assoalho da boca, palato duro e gengiva;
- Faringe: nasofaringe, orofaringe e hipofaringe;
- Laringe: região supraglótica, laringe glótica e laringe infraglótica;
- Cavidade nasal e seios paranasais;
- Glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) e glândulas salivares menores.

Além destas topografias, a tireóide também pode ser acometida; entretanto, por diferir em etiopatogenia, aspectos patológicos e tratamentos, não será aqui discutida.

Os tumores de cabeça e pescoço representam cerca de 687.000 casos novos por ano, no mundo (FERLAY et al. 2012), excluindo os tumores de tireóide. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer-INCA,

para o ano de 2016, a estimativa de CCP foi de 17.400 casos novos (Ministério da Saúde 2016).

O principal fator prognóstico para a maior parte das neoplasias, e no câncer de cabeça e pescoço (CCP) não é diferente, continua sendo a extensão do tumor (T), comprometimento linfonodal (N) e a presença de doença à distância (M), o TNM. Apesar dos recentes avanços no tratamento do câncer de cabeça e pescoço (CCP) (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), essa doença ainda representa um dos tumores mais frequentes e com elevadas taxas de mortalidade e morbidade, mesmo quando diagnosticada em estágios iniciais, devido à agressividade do tratamento e sua restrita eficácia.

Tabela 1 - Taxa de sobrevida, segundo estadiamento

SOBREVIDA OBSERVADA	ESTÁDIO	1 ANO (%)	2 ANOS (%)	3 ANOS (%)	4 ANOS (%)	5 ANOS (%)
LÁBIO	1	95,5	88,8	82	74,3	68,7
	2	93,7	83,7	75,3	69,8	61,8
	3	85,5	64,4	53,1	48,3	43,1
	4	71,2	58,5	50,7	49,3	38,7
CAVIDADE ORAL	1	92,4	81,3	73,6	66,4	59,2
	2	85,8	69,8	60,2	52,8	46,9
	3	74,9	56,4	47,9	41,1	36,3
	4	63,6	43,7	35,8	30,7	26,5
OROFARINGE	1	92,7	81,6	74,1	67	60
	2	85,8	69,4	60	52,6	46,7
	3	74,5	55,3	47,5	41	36,5
	4	63,6	43,6	35,9	31	26,8
FARINGE	1	77,1	60,4	47	42,7	30,4
	2	75	60,2	44,9	35,3	32,5
	3	69,5	54,2	44,3	36,6	27,7
	4	55,6	34,1	26,5	21,6	16,3
LARINGE	1	98,3	93,5	90,4	87,6	84,3
	2	91,3	82,7	75,8	70,8	66
	3	84,1	71	62,6	57,2	52,1
	4	73,1	53,6	45,9	39,9	35,5

Fonte: Adaptado EDGE et al. (2010)

A maior parte das neoplasias são representadas por carcinomas espinocelulares (CEC), cerca de 90 - 95% das lesões, principalmente em cavidade oral e laringe. Podem ser bem diferenciadas (menos de 25% de células indiferenciadas), moderadamente diferenciadas (menos de 50% de células indiferenciadas), pouco diferenciadas (menos de 75% de células indiferenciadas) ou indiferenciadas (mais de 75% de células indiferenciadas). O grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, número de mitose, profundidade da invasão e invasão vascular, também são considerados na classificação. Histologias menos frequentes são o carcinoma verrucoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide cístico e carcinoma mucoepidermóide (AKHTER et al. 2011).

Globalmente, os CCPs acometem mais indivíduos do sexo masculino do que o feminino, numa proporção que pode variar de 2:1 até 5:1, dependendo da região do planeta e dos hábitos locais, principalmente relacionados ao consumo de tabaco. Em linhas gerais, acomete a população entre as 6^a e 7^a décadas de vida, quando não associado ao *Human Papiloma Virus*-HPV.

Do ponto de vista etiológico, podem estar associados a um processo químico, quando guardam forte relação com consumo de álcool e tabaco, ou viral, quando induzidos por HPV ou EPV (*Epstein Barr Virus*).

O tabaco ainda é causador da maior parte dos casos de tumores de CCP e tem um conhecido efeito sinérgico com o álcool. Cerca de 90% desses tumores ocorrem em pacientes com história de uso de tabaco, com aumento entre 4 e 5 vezes no risco de desenvolver câncer de cavidade oral,

orofaringe e hipofaringe, e 10 vezes no risco de desenvolver câncer de laringe (VINEIS et al. 2004; HASHIBE et al. 2007; ARGIRIS et al. 2008).

Quanto ao álcool, o uso independente do tabaco aumenta o risco para desenvolvimento de CCP em 1 - 4%, principalmente na hipofaringe. Contudo, o maior efeito carcinogênico do álcool se dá quando associado ao uso de tabaco. Em usuários que ingerem mais de 4 doses de álcool por dia e que fumam 2 ou mais maços de cigarro por dia, o risco é aumentado em 35 vezes (BLOT et al. 1988).

Outros fatores de risco incluem: presença de lesões pré-malignas (leucoplasia e eritroplasia), HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) ou outras imunodeficiências, dieta pobre em folatos, higiene oral inadequada, exposição solar, anemia de Fanconi, Síndrome de Li Fraumeni e Disceratose Congênita (RETTIG e D'SOUZA 2015).

Mutações ativadoras somáticas, incluído oncogenes clássicos como PIK3CA e RAS, são relativamente incomuns. Entretanto, parece haver uma contribuição de múltiplas vias de supressão tumoral, incluindo p53, Rb /INK4 /ARF e Notch na iniciação, progressão e manutenção do tumor (ROTHENBERG e ELLISEN 2012).

Nos pacientes HPV negativos, mutações no gene supressor de tumor *p53* parecem ter um papel central no desenvolvimento deste tipo de neoplasia (84% dos casos). Mutações nesse gene desregulam o ciclo celular, incapacitando as células em manter sua integridade genômica, causando proliferação celular aberrante, interrupção da apoptose e perpetuação de um DNA defeituoso (OHNISHI et al. 2002).

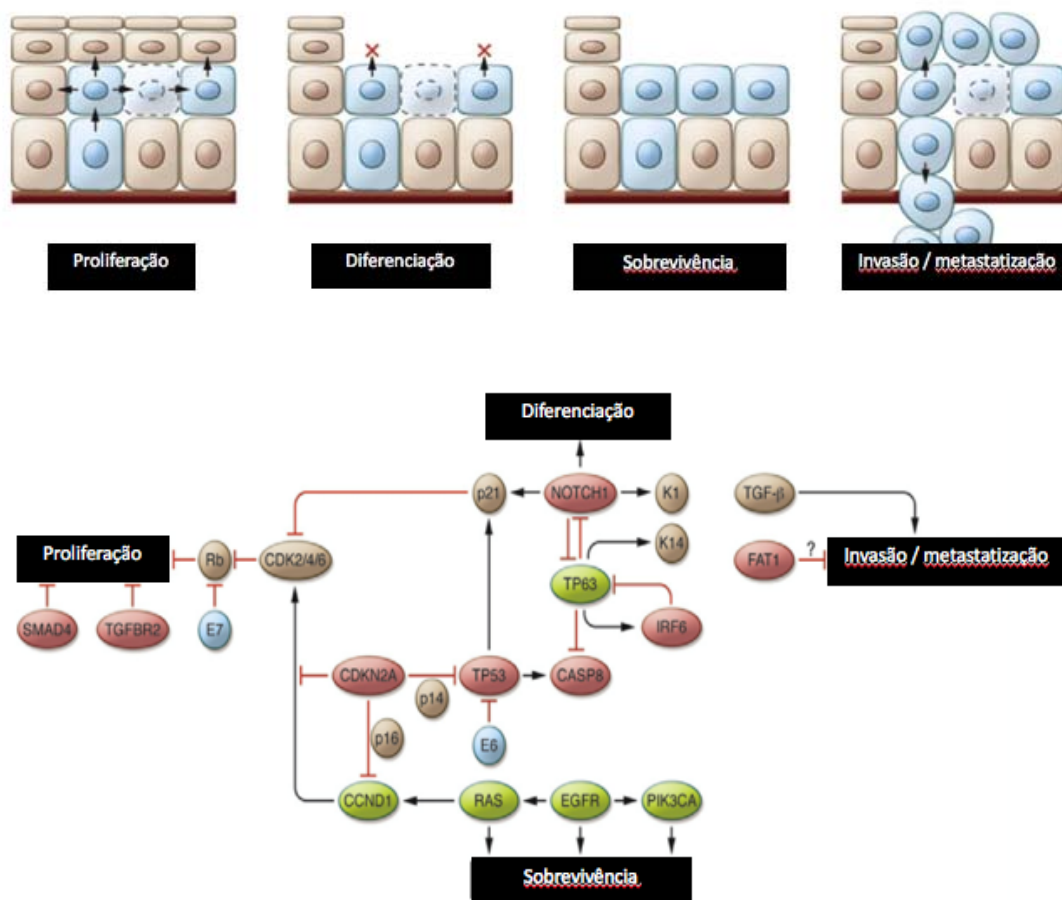
Além disso, mutações no funcionamento do gene p53 estão associadas a resistência a radioterapia e quimioterapia com cisplatina (CDDP). Outra mutação presente em 58% dos tumores induzidos por tabaco e álcool, é no gene CDKN2A que também é supressor de tumor e regula o ciclo celular pela inibição do complexo ciclina CDK4 e CDK6, responsáveis por iniciar a transição da fase G1 para fase S (STRANSKY et al. 2011; Cancer Genome Atlas Network 2015).

Além das alterações citadas acima, mutações no receptor TGF β , SMAD2 e SMAD 4 foram identificadas. Tais alterações, juntamente com ativação da via do KRAS podem levar ao processo de progressão e metástase. Outras vias com potencial terapêutico identificadas estão relacionadas a alterações no NOTCH1 e ao gene supressor FAT1 (regulador de migração celular e invasão) – Figura 1 (PURAM e ROCCO 2015).

Ao contrário de outras neoplasias, como tumores de mama e leucemias que apresentam forte relação com mecanismos ativadores relacionados ao *Epithelial Growth Factor Receptor*-EGFR, os tumores de cabeça e pescoço têm uma relação limitada com tais proteínas. Estudos *in vitro* mostram que apenas 15% dos tumores HPV negativos e 6% dos tumores HPV positivos contêm mutações ou amplificações no EGFR (Cancer Genome Atlas Network 2015). Diante dessa limitada dependência, não é surpresa que os inibidores de EGFR tenham sucesso limitado nos ensaios clínicos (VERMORKEN et al. 2008).

Por outro lado, há mais de uma década já é sabido que os tumores de cabeça e pescoço relacionados ao HPV, são entidades distintas, com

etiologia, distribuição geográfica, patofisiologia e comportamento clínico distinto. Nesses tumores, geralmente relacionados a infecção pelo subtipo 16 do HPV, ocorre uma integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, ativando reguladores moleculares específicos, incluindo o p16 e proteínas virais (E6 e E7) – Figura 1. Os mecanismos biológicos que explicam as diferenças nos desfechos clínicos em pacientes acometidas por HPV são provavelmente multifatoriais. A ausência de tumor residual após cirurgia ou radioterapia, certamente reduz a incidência de recorrência loco-regional e a distância; além disso, a persistência do p53 funcional pode explicar a melhor resposta à quimioterapia e radioterapia. Há também evidências crescentes de que as interações imunes tumorais podem explicar o melhor resultado no tratamento dos tumores relacionados ao HPV: a positividade do HPV está associada a uma resposta de linfócitos mais substancial e modelos animais sugerem que a imunocompetência é essencial para a erradicação completa do tumor. Em comparação com os tumores de HPV negativos, os tumores relacionados ao HPV têm taxas mais baixas de mutações e menos alterações de número de cópias de DNA, com menos instabilidade genômica. (PURAM e ROCCO 2015)



Fonte: Modificado a partir de ROTHENBERG e ELLISEN (2012)

Figura 1 - Principais vias celulares e moleculares implicadas na gênese tumoral dos carcinomas espinocelulares dos tumores de cabeça e pescoço.

Vermelho: genes supressores de tumor Verde: oncogenes; Marrom: outros genes / proteínas relevantes; Azul: proteínas virais. A perda de TP53 e CDKN2A, a amplificação de CCND1 e a perda de TGFB2 / SMAD4 permitem a proliferação anormal e diminuem a apoptose. A perda de NOTCH1 e / ou expressão anormal de TP63, juntamente com alterações nos genes de "sobrevivência" (por exemplo, CASP8, PIK3CA, EGFR), podem remover barreiras adicionais à proliferação e sobrevivência de células tumorais. A perda de genes de adesão celular (FAT, por exemplo) poderia permitir o desprendimento de células a partir do revestimento da mucosa, enquanto a invasão através da membrana basal é promovida por TGFβ1 e SMAD3.

Na mucosa oral, alguns tumores desenvolvem-se a partir de lesões pré-malignas como a leucoplasia e eritroplasia. A displasia é uma definição histológica para a presença de mitoses e nucléolos proeminentes, comprometendo toda profundidade da mucosa, sendo denominada carcinoma *in situ*.

Como descrito por Rivera, os tumores de cavidade oral acontecem em múltiplos passos. Os queratinócitos normais da mucosa oral são cronicamente expostos a fatores de risco, que podem quebrar a homeostase e gerar instabilidade genética. Alterações no TP53, NOTCH1, EGFR, genes STAT3, Ciclina D1, Rb (retinoblastoma) podem ocorrer. Entre os fatores secretados pelas células tumorais estão MMP-2 (metaloproteinase de matriz 2), MMP-9 (metaloproteinase de matriz 9), MMP-13 (metaloproteinase de matriz 13), ROS (do inglês, *reactive oxygen specimens*), VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*), CXCL1, CXCL8, PDGF (do inglês, *platelet derived growth factor*), IL-8 (interleucina 8), FGF-2 (do inglês, *fibroblast growth factor 2*), TNF- α (do inglês, *tumor necrosis factor- α*), IL-1, GMCSF (do inglês, *granulocyte macrophage colony stimulating factor*). Este microambiente promove a perda de adesão celular (ex. E-caderina) e facilita a transição epitélio-mesênquima (TEM) (RIVERA 2015).

1.1.1 Estadiamento

O exame físico deve ser cuidadoso, com inspeção, palpação e visualização indireta por espelho ou laringoscopia flexível direta. Devem ser examinadas a cavidade nasal, cavidade oral, assoalho da boca, língua,

fossa amigdalina, palato, boca, gengiva e parede da faringe. Para pacientes com lesões extra laríngeas, mas com exposição ao tabaco e/ou álcool, a laringoscopia é recomendada na intenção de visualizar outras lesões e documentar a mobilidade das cordas vocais. O exame das cadeias ganglionares adjacentes é imperativo.

Não é incomum o achado de segunda neoplasia pulmonar. Outra situação a ser considerada é o achado de neoplasia em regiões do trato digestivo alto.

Para pacientes com doença localmente avançada, o rastreamento para doença metastática em pulmão deve ser realizado, preferencialmente com tomografia computadorizada (TC). Achados de metástases em fígado podem ocorrer.

Em relação aos métodos de imagem utilizados em CCP, a ressonância magnética (RM) parece ser superior à tomografia computadorizada (TC) para detectar comprometimento perineural, invasão da base da língua e extensão intracraniana. Para avaliação do envolvimento linfonodal, a sensibilidade, tanto da TC quanto da RM não é alta. Entretanto, deve-se considerar que a aquisição de imagens por TC é mais rápida e reduz artefatos relacionados à respiração e deglutição (ABRAHAM 2015).

O PET/CT com 18-FDG parece ser igualmente sensível a TC/RM na detecção de lesões primárias, porém mais sensível para avaliação do comprometimento linfonodal locoregional. Em linfonodos menores que 0,5 cm, contudo, o número de exames falso negativo não é desprezível (ESCOTT 2013).

1.1.2 Tratamento Dos CCP

Atualmente, o tratamento da maior parte das neoplasias de cabeça e pescoço é multidisciplinar, envolvendo cirurgia, radioterapia e tratamento sistêmico. Entretanto, principalmente em tumores iniciais, a cirurgia *up front* tem um papel fundamental. Quanto maior o volume do tumor e a consequente dificuldade para ressecção R0, terapias complementares ganham espaço e participam de maneira relevante do tratamento dos pacientes.

1.1.3 Doença Inicial (Estádio I E II)

O tratamento da doença inicial, geralmente, é baseado em ressecção do tumor primário ou radioterapia definitiva, com sobrevida em 5 anos variando entre 70 e 90%.

Além das taxas de cura, deve haver um equilíbrio quanto a preservação de estruturas críticas como função orofacial, convívio social e qualidade de vida. Margens comprometidas ou ressecções inadequadas podem ter impacto determinante no desfecho do paciente (BADDOUR et al. 2016). Uma metanálise recente para CEC de cavidade oral sugere uma redução de risco absoluto na ordem de 21% quando as margens são maiores que 5mm (ANDERSON et al. 2015).

Apesar do tratamento da doença inicial seguir basicamente o princípio de cirurgia conservadora com margens livres sempre que possível ou radioterapia como opção de alta eficácia para os tumores de cabeça e

pescoço de forma geral, vale abordar rapidamente as opções dirigidas por sítio anatômico (Quadro 1).

Quadro 1 - Opções no tratamento do CCP em estágio inicial

		Risco DE N+	Cirurgia	RT	Linfade- nectomia	Técnicas. Minima- mente Invasivas	OBS
Cavidade Oral	Lábios assoalho de boca língua trígono retromolar palato duro mucosa oral	21% alta	x x x x x*	x x x**	x x		SG 5 anos 85% SG 5 anos 70%
Orofaringe	palato mole amígdalas base de língua faringe valécula	alta	x x x x x	x x x x x	x x x x x	x x x x x	
Hipofaringe		30 – 50%	x	x	x	x	SG 5 anos 75%
Laringe			x	x		x	

reabilitação complexa; ** risco de radionecrose

Fonte: ZITSCH et al. (1995), BYERS et al. (1988), HICKS et al. (1998), TRUITT et al. (1999), INOUE et al. (2001), HINERMAN et al. (2004), LEVENDAG et al. (2004), HAO et al. (2006), CHARBONNEAU et al. (2006), HALL et al. (2008), GANLY et al. (2013), BRICKMAN e GROSS (2014), KELNER et al. (2014), HARTL e BRASNU (2015).

A toxicidade aguda à RT inclui os seguintes sintomas: mucosite, reação cutânea, alteração do paladar e disfagia. Tardamente, podem ocorrer fibrose atrofia das partes moles adjacentes, osteoradionecrose, linfedema, trismo e xerostomia.

1.1.4 Tratamento da Doença Localmente Avançada

Pacientes com CEC localmente avançado de cabeça e pescoço, podem ser tratados com cirurgia, seguido de RT isolada ou com QT combinada.

Dois estudos publicados em 2004, EORTC 22931 e o RTOG 9501, avaliaram o tratamento com RT e QT concomitantes, neste cenário. Em ambos, os pacientes eram randomizados ao tratamento adjuvante com RT exclusiva ou associação de quimioterapia com cisplatina ($100\text{mg}/\text{m}^2/3$ semanas) e RT concomitante. Os resultados dos dois estudos mostraram superioridade em sobrevida livre de progressão e menor taxa de progressão local para os pacientes tratados com a combinação. No que se refere a sobrevida global, apenas o estudo do EORTC demonstrou tal benefício (BERNIER et al. 2004; COOPER et al. 2004). Para os pacientes não operados, o papel da QT com CDDP ($100\text{mg}/\text{m}^2/3$ semanas, por 3 ciclos) concomitante a RT é bem estabelecido. Duas metanálises publicadas por PIGNON et al. (2000) e BLANCHARD et al. (2011) demonstram o ganho absoluto em sobrevida para esse tipo de abordagem, com benefício de 7% em 2 anos e 8% em 5 anos ($\text{HR} = 0,81$ IC- $0,76-0,88$; $p < 0,0001$), em relação aos pacientes que receberam RT exclusiva.

Vale ressaltar que a opção de RT e QT adjuvante é empregada para pacientes com alto risco de recidiva, ou seja, aqueles com margem comprometida, invasão linfática, vascular e perineural e comprometimento linfonodal com extravasamento capsular..

A associação de RT com cetuximabe já foi objeto de estudo.

BONNER et al. (2006) demonstraram por estudo fase III, que a radiosensibilização com cetuximabe é factível. Os pacientes foram sorteados em dois grupos: um grupo tratado com RT exclusiva e outro, tratado com RT associada a cetuximabe. O braço experimental atingiu sobrevida global de 49 meses, enquanto o braço tratado com RT exclusiva alcançou 29,3 meses ($p = 0,03$). Em relação a sobrevida livre de recorrência locorregional, a diferença a favor da associação foi de 10 meses ($p = 0,005$) (BONNER et al. 2006).

Por outro lado, a associação de RT com cisplatina e cetuximabe não se mostrou eficaz quando comparada ao tratamento padrão de cisplatina e radioterapia (RTOG 0522), tanto em desfechos de sobrevida livre de progressão, sobrevida em 3 anos, recaída locorregional e a distância (ANG et al. 2014).

No câncer de laringe localmente avançado, o tratamento de escolha para doença T4Nx é a laringectomia. Para pacientes portadores de doença em estágio T3Nx, a combinação de radioterapia e quimioterapia, como descrita acima, é uma opção tão aceitável quanto a cirurgia radical. Entretanto, deve-se considerar que o principal objetivo no tratamento desse tipo de doença é o equilíbrio entre o controle oncológico e a qualidade de vida.

Apesar de parecer claro que a decisão terapêutica deve ser tomada diante de cada estágio de doença localmente avançada, muitos outros aspectos devem ser considerados, como: desejo do paciente, experiência da equipe em relação as opções disponíveis, capacidade de um

acompanhamento adequado, morbidades e a expectativa em relação a capacidade de fala e deglutição.

Diante dos eventuais distrúrbios gerados por cirurgias agressivas ou sequelas de radioterapia, na década de 1990, protocolos que buscavam a preservação das funções dos órgãos ganharam espaço (SANABRIA et al. 2017).

Apesar da abordagem com RT e QT concomitante ser bem aceita como opção à cirurgia radical, o resultado de tal associação ainda não é o ideal, seja por sequelas do tratamento radioterápico ou por uma eventual evolução desfavorável (recaída local, à distância ou progressão metastática). Com a intenção de melhorar esses desfechos, novas abordagens vêm sendo propostas com o uso de novos medicamentos ou estratégias de quimioterapia neoadjuvante ou de indução.

Os tumores de orofaringe também podem ser tratados sob a mesma estratégia de RT com QT sensibilizante, baseada em altas doses de CDDP, sendo esta a abordagem o tratamento padrão para os tumores localmente avançados (DENIS et al. 2004).

Diante das taxas de resposta proporcionadas pela QT neoadjuvante, descrita nos estudos citados anteriormente que buscavam a preservação da laringe, a quimioterapia de indução, antes do tratamento local definitivo, foi uma consequência natural. O caminho imediato foi associar ao esquema tradicional de cisplatina e 5fluorouracil, o docetaxel (TPF). Os estudos TAX 323 e TAX 324 demonstraram que adição de docetaxel proporcionava ganho em taxa de resposta, sobrevida livre de progressão e sobrevida global,

quando comparados ao esquema padrão (VERMORKEN et al. 2007; POSNER et al. 2007; POSNER et al. 2009).

Outros estudos buscaram uma comparação direta entre a abordagem QT de indução seguido de radioquimioterapia, *versus* radioquimioterapia. A maior parte destes estudos tem limitações metodológicas, seja pelo próprio desenho do estudo, pelo baixo recrutamento ou até mesmo interpretação equivocada – Quadro 2 - (CHAU e HADDAD 2015).

O fato é que nem todos os pacientes são bons candidatos a receberem tratamento de indução, seguido de QT e RT concomitantes. Alguns fatores de alto risco, como tumores extensos (T4) ou comprometimento linfonodal maciço (N2/N3), podem ser sugestivos de um eventual benefício do tratamento de indução ou neoadjuvante. Outros aspectos como necessidade de início imediato do tratamento, sem poder aguardar o planejamento radioterápico ou sintomatologia exuberante, também podem se beneficiar deste tipo de tratamento.

Quadro 2 - QT de indução versus Quimiorradioterapia

Estudo	N	Critérios de inclusão	Braços de Tratamento	Objetivo primário	Resultados	Obs
PARADIGM	145	EC III ou IV LAv, ou irressecável	A: TPF x 3 → QT/RT B: QT/RT	SG	SG 3 anos (73% vs 78%) <i>p</i> : NS SLP 3 anos (67% vs 69%) <i>p</i> : NS RL (16% vs 15%) - NS	Não atingiu recrutamento (200 pcts)
DeCIDE	285	N2 ou N3 LAv Cirurgia evitada por preservação	A: TPF x 2 → DHF-RT B: DHF + RT	SG	SG, SLR, SRDist <i>p</i> : NS	Não atingiu recrutamento (400 pcts)
Estudo Espanhol	439	LAv	A: TPF x 3 → QT/RT B: PF x 3 - CTR C: QT/RT	ILP TPP	ILP: 14.6 vs 14.3 vs 13.8 meses (<i>p</i> : NS) TPP: 7.9 vs 7.9 vs 8.2 meses (<i>p</i> : NS) OS: 27 vs 27.2 vs 26.2 meses (<i>p</i> : NS)	
GSTTC HeN07	421	EC III e IV (excluído laringe)	A1: CRT A2: cetuximabe + RT B1: TPF 3 / CRT B2: TPF 3 / cetuximabe + RT	SG 3 anos (A1 + A2 vs B1 + B2) Toxicidade G3/G4 (A1+B1 vs A2+B2)	TS X CRT SG mediana: 53,7 vs 30,3 meses SG 3 anos: 58% vs 46% - HR 0,72, IC 95% (0,55-0,96) <i>p</i> = .025 SLP mediano: 29,7 vs 18,5 meses SLP 3 anos: 47% vs 37% - HR 0,73, IC 95% (0,57-0,94) <i>p</i> = .0155	Sem diferença em toxicidade

LAv: localmente avançado; TPF: Docetaxel, Cisplatina e 5Fluorouracil; NS: não significativo; TS: tratamento sequencial

1.1.5 Tratamento da Doença Recidivada ou Metastática

Pacientes portadores de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, recorrente ou metastático tem sobrevida mediana variando entre 6 e 9 meses, com taxas de sobrevida em um ano de 20 – 40%, sendo raros os casos de pacientes que tenham sobrevida superior a 2 anos.

Vários quimioterápicos têm sido testados e utilizados ao longo dos anos, para o tratamento desse tipo de doença. Dentre eles, os mais usados são: methotrexate, cisplatina, carboplatina, paclitaxel, docetaxel e 5fluorouracil, com taxas de resposta entre 15% a 42%. A partir da identificação do EGFR, (*do inglês, Epitelial Growth Factor Receptor*), o uso de terapias alvo como o Cetuximabe, tornou-se uma nova opção para o tratamento desses pacientes, embora as taxas de resposta alcançadas, em população previamente exposta á terapia padrão com cisplatina, varie entre 6% e 25%, conforme mostra a tabela a seguir.

Tabela 2 - Cetuximabe no tratamento do CCP, recidivado ou metastático

ESTUDO	N	CARACTERÍSTICAS	QT	TR (%)	SLP MEDIANA (MESES)	SG MEDIANA (MESES)
Herbest e cols	79	CEC – QT prévia com CDDP	CDDP + Cetuximabe	6-20	2 - 3	4,3 – 6,1
Baselga e cols	96	CEC – QT prévia com análogo de platina	CDDP + Cetuximabe	10 - 11	2,4 – 2,8	4,9 – 6,0
Trigo e cols	103	CEC – QT prévia com análogo de platina	Cetuximabe	13	2,3	5,9
Burtneess e cols	117	CEC (sem QT prévia)	CDDP	10	2,7	8,0
			CDDP + Cetuximabe	26 (p= 0.003)	4,2 (p = 0,09)	9,2 (p = 0,21)

Se por um lado as taxas de resposta e sobrevida proporcionadas por agente únicos é desapontadora, a combinação de quimioterápicos se mostra mais competente em proporcionar resposta mais robusta, entretanto ineficaz se considerada a sobrevida global.

Uma outra questão foi abordada pelo estudo EXTREME: a adição de cetuximabe ao tratamento padrão com cisplatina e 5fluorouracil proporcionaria algum ganho aos pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço metastáticos ou recorrentes? Foram randomizados 442 pacientes em dois braços: (a) pacientes tratados com cisplatina e 5FU e (b), pacientes tratados com o regime padrão e cetuximabe, por 6 ciclos no máximo, seguido por tratamento com cetuximabe, até toxicidade inaceitável ou progressão de doença. Foi demonstrado o benefício da associação com cetuximabe em sobrevida global (7,4 versus 10,1 meses / $p = 0,04$) (VERMORKEN et al. 2008).

Tabela 3 - QT no tratamento da doença metastática

<i>Autor</i>	<i>QT</i>	<i>Taxa de resposta</i>	<i>Sobrevida Mediana (meses)</i>
Jacobs et al. *	CDDP / 5FU	32	5,5
	CDDP	17	5
	5FU	13	6,1
Forastiere et al.	CDDP / 5FU	32	6,6
	Carboplatina	21	5
	MTX	10	5,6
Gibson et al.	CDDP / 5FU	27	8,7
	CDDP / PACLITAXEL	26	8,1

$p < 0,05$

A despeito dos avanços em técnicas cirúrgicas, radioterapia mais precisa e eficaz e novos fármacos incorporados no tratamento deste tipo de neoplasia, a maior parte dos pacientes com doença localmente avançada ou metastática, vão evoluir com progressão local ou a distância em curto intervalo de tempo, vindo a falecer em sua esmagadora maioria. Diante deste indesejável desfecho, um melhor conhecimento nos mecanismos de progressão e resistência ao tratamento padrão se faz necessário.

1.2 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES (CTCs) E MICROÊMBOLS TUMORIAIS CIRCULANTES (MTCs)

O entendimento do processo de metástase é objeto de estudo da medicina por mais de um século. Há muito é sabido da característica da célula tumoral de migrar do tumor onde se originou e invadir outros órgãos, criando focos distantes e múltiplos da doença inicial. Várias foram as hipóteses criadas para justificar o processo, e talvez a melhor delas tenha sido descrita em 1889, por Stephen Paget, que destacou em um artigo publicado na revista *The Lancet* a seguinte frase (em tradução livre): “O que será que decide quais são os órgãos que irão ser acometidos em um caso de câncer disseminado? Quando uma planta decide semear, as sementes são carregadas em todas as direções, porém elas apenas conseguem sobreviver e crescer se as mesmas forem depositadas em solo adequado” (PAGET 1889).

A tentativa de responder definitivamente a questão levantada por Stephen Paget ainda é um desafio. Originalmente, Paget tentou explicar este complexo processo com uma teoria em que as metástases seriam “Sementes” e os órgãos de destino seriam considerados o “Solo” (*“The Seed and Soil Theory”*). A “germinação” e o “crescimento” das metástases dependeriam de uma interação positiva entre a “semente” e o “solo”. Ainda continua difícil responder a esta questão, apesar dos enormes avanços na ciência, sobretudo considerando o estudo de vias genômicas e moleculares integradas ao processo de metastatização.

Na última década, mais de 1.500 artigos foram publicados avaliando as CTCs, seja para avaliar métodos de captura das células, caracterização, prognóstico, papel como biomarcador e até mesmo como preditor de resposta a quimioterapia. Para desenvolver novas estratégias no tratamento do câncer, um melhor entendimento do papel das CTCs no processo de disseminação metastática hematológica é muito importante, visto a relação existente entre as CTCs, o processo de transição epitélio mesênquima, cooperação entre as células e os microêmbolos tumorais (KREBS et al. 2014).

O que sabemos é que o processo de metástase é ineficiente. Um grande número de células neoplásicas pode estar circulando na corrente sanguínea de pacientes com câncer, mas apenas poucas delas conseguem de fato inserir e propagar-se em sítios distantes (CHAMBERS et al. 2002). Muito é conhecido sobre as características que proporcionam à célula neoplásica a habilidade de invadir e metastatizar. Este processo e seu

entendimento estão cada vez mais ligados a mecanismos de sinalização celular, citocinas, fatores de crescimento e uma complexa interação entre a célula tumoral e o microambiente tecidual. Fatores como o fator transformador de crescimento beta (TGF- β), interleucina-6 (IL-6), metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) das células tumorais que migram, conhecidas como células tumorais circulantes (CTCs) parecem ser importantes, e podem estar ligadas à capacidade destas células de disseminar, invadir e proliferar, em um processo denominado transição epitélio-mesênquima (TEM) (MICALIZZI et al. 2010).

Por outro lado, fatores mecânicos também são importantes na disseminação das células neoplásicas. O tamanho relativo destas células e os capilares teciduais podem, também, determinar a maior ou menor possibilidade de uma determinada célula se alojar em um determinado órgão (CHAMBERS et al. 2002). A maioria das CTCs é pequena e consegue se alojar no tecido apenas se há interação entre as proteínas de superfície da célula e receptores e o microambiente de um tecido específico. Isso, ao menos parcialmente, explica porque pacientes com CTCs detectáveis podem ter apenas doença localizada.

O sistema imune também participa de forma fundamental no processo de metástases (FINN 2008). A imunidade contra o câncer inclui principalmente a ação de linfócitos T, macrófagos, células NK e células dendríticas, que tentam reconhecer e destruir as células tumorais. Parece que a metástase ocorre quando a célula neoplásica consegue adquirir a capacidade de evadir os mecanismos responsáveis por sua destruição,

muitas vezes sendo capaz de empregar o sistema imune em seu próprio benefício e prevenir a ativação do processo inflamatório relacionado ao câncer (ZETTER 1998; FIDLER 2003; RABINOVICH et al. 2007; GRIVENNIKOV 2010; MCALLISTER e WEINBERG 2014). Considerando cada etapa que uma célula tumoral deve enfrentar no intuito de produzir uma lesão metastática, torna-se claro que o processo de sobrevivência das CTCs é complexo. A célula deve sobreviver a barreiras mecânicas, evadir o sistema imune e ter um perfil molecular favorável para iniciar o processo de metástase. Muito tem sido feito no intuito de entender a biologia das CTCs e transformar tais células em um novo meio de monitorar o crescimento e disseminação do câncer (BARDIA e HABER 2014). CRISTOFANILLI et al. (2005) publicaram um estudo com 177 pacientes com câncer de mama metastático, submetidas a contagem de CTCs antes e depois do início do tratamento quimioterápico. Pacientes que apresentavam contagem de CTCs ≥ 5 / 7,5 ml de sangue, quando comparados com aqueles com contagem < 5 / 7,5 ml, tiveram menor sobrevida livre de progressão (2,7 versus 7 meses, $p < 0,001$) e redução da sobrevida global (10,1 versus 18 meses, $p < 0,001$). O conhecimento vigente aponta o estudo das CTCs como uma importante ferramenta na prática oncológica, uma vez que as mesmas podem apresentar significância clínica, prognóstica e preditiva em muitos tipos de tumores, como cânceres de mama, ovário, pulmão, cólon, próstata e muitos outros (YU et al. 2011; PANTEL e ALIX-PANABIÈRES 2013; ALIX-PANABIÈRES e PANTEL 2014; HABER e VELCULESCU 2014).

A despeito das CTCs, muito pouco é conhecido sobre uma entidade descrita recentemente denominada microêmbolos tumorais, células tumorais circulantes dispostas em agrupamentos (*clusters*), ou “Microêmbolos Tumorais Circulantes” (MTC) (HOU et al. 2012). MTCs são, por definição, grupamentos de no mínimo três células tumorais, englobadas ou permeadas pela matriz extracelular derivada do tumor; os MTCs também podem conter células normais, como linfócitos, fibroblastos e plaquetas (HOU et al. 2012). Em comparação com as CTCs, microêmbolos têm um tamanho maior, e teoricamente, tem maior resistência à atividade citotóxica do sistema imune. Esta idéia fortalece o estudo de MTCs, que, por sua característica, podem ser melhores preditores de risco de metástases do que as CTCs.

A despeito das poucas evidências, MTCs parecem ser mais capazes de evadir com sucesso mecanismos imunes do que as CTCs, por serem estruturas mais complexas. Teoricamente, MTCs podem manipular o sistema imune de forma mais efetiva, direcionando os esforços contra antígenos da matriz extracelular que permeia os *clusters*, deixando espaço para as CTCs contidas no *cluster* iniciarem o processo de invasão após a reposta imunológica inicial a um determinado grupo de antígenos. Outra teoria levaria em consideração a presença de linfócitos T reguladores. Estas células produzem TGF- β , interleucina-10 (IL-10), dentre outras citocinas imunossupressoras que podem regular negativamente os efeitos anti-tumorais de linfócitos T efetores que poderiam atuar contra CTCs (ZOU 2006; RABINOVICH et al. 2007; MCALLISTER e WEINBERG 2014).

Poucos estudos foram publicados avaliando MTCs. Em 2012, HOU et al. tentaram verificar o papel de CTCs e MTCs em pacientes com câncer de pulmão de pequenas células (CPPC). Os resultados não foram suficientes para fornecer dados positivos sobre o entendimento de MTCs no processo de metástase, mas demonstraram que portadores de MTCs tiveram pior prognóstico quando comparados a pacientes que possuíam apenas CTCs, principalmente em relação à sobrevida livre de progressão (SLP). No estudo, a mediana de SLP foi de 4,6 meses para pacientes com MTCs e 8,2 meses para os pacientes apenas com CTCs ($p < 0,001$); para sobrevida global (SG), a mediana foi de 4,6 meses para pacientes com MTCs e de 10,2 meses para pacientes sem MTCs, apenas com CTCs ($p < 0,001$). O *status* de proliferação dos MTCs também foi avaliado, e todos os pacientes que apresentavam MTC apresentavam marcação negativa para Ki67, mesmo em pacientes que apresentavam CTCs positivas para Ki67. Por fim, foi avaliado o *status* de apoptose e um resultado semelhante foi encontrado: nenhum MTC foi positivo na marcação de proteínas pró ou anti-apoptóticas.

Recentemente, ZHENG et al. (2017) avaliaram 81 pacientes com diagnóstico de câncer gástrico, quanto a prevalência e valor prognóstico de CTCs e MTCs, em sobrevida livre de progressão e sobrevida global. MTCs foram detectados em 13 de 53 pacientes com doença em estágio IIIc e IV. Pacientes com MTC detectados apresentaram SLP menor em relação aos pacientes que não apresentavam MTCs. Além disso, em pacientes com doença em estágio IV a positividade para MTCs foi fator prognóstico independente em análise multivariada para ILP e SG.

Os demais estudos que citam MTCs não fazem relação fundamental com fatores preditivos e prognósticos, e incluem pacientes com tumores de cólon, próstata, rim e pulmão (FIDLER 1970; LIOTTA et al. 1976; BRANDT et al. 1996; MOLNAR et al. 2001; KATS-UGURLU et al. 2009; KREBS et al. 2012). Inclusive, a maioria destes estudos expõe os MTCs como modelos teóricos e/ou são estudos realizados em animais, ou ainda *in vitro*. Dois estudos da década de 1970 foram capazes de demonstrar que os antes chamados “agregados celulares” teriam potencial invasivo. Os agregados, preparados *in vitro*, tinham maior potencial de invadir tecidos saudáveis do que a injeção de células tumorais isoladas (FIDLER 1970; LIOTTA et al. 1976). Estes estudos, no entanto, foram feitos em camundongos, e mais de três décadas se passaram até que houvesse maior interesse nos chamados agregados celulares descritos na década de 1970.

O estudo de HOU et al. (2012), apesar de incluir poucos pacientes (n= 97 pacientes; 25 positivos para CTM) lançou uma importante hipótese para o entendimento do papel dos MTCs. A caracterização molecular dos MTCs revelou que as células tumorais contidas em cada grupamento não estão se dividindo. A ausência de positividade para a marcação de Ki67 suscita uma discussão: já que as células nos MTCs não estão em mitose, elas seriam menos responsivas à terapia citotóxica, e, portanto, aumentariam o risco de metástases mesmo durante o tratamento sistêmico? (FRISCH e FRANCIS 1994; FRIEDL e GILMOUR 2009).

Outra hipótese levantada contempla a possível diferença mecânica e imunológica que poderia conferir maior potencial invasivo aos MTCs quando

comparados à CTCs isoladas. Primeiramente, MTCs são maiores que CTCs. Considerando a mecânica simples da perfusão vascular de cada órgão, uma forma simplória de pensar seria acreditar que MTCs têm maior risco de ficarem atrelados à rede vascular da microcirculação dado seu maior tamanho. Utilizando a teoria de Paget, sobre sementes e solo, não seria absurdo postular que MTCs seriam “Sementes” mais eficazes que as CTCs.

Sobre a questão imunológica, também se postula que o *cluster* de células do MTC provê menos alvos específicos para a ação destrutiva do sistema imune. As células agrupadas no MTC podem ser de várias origens: células quiescentes, células tronco tumorais, células derivadas do microambiente tumoral (como macrófagos e fibroblastos). Esta heterogeneidade de células constrói uma estrutura bastante complexa, o que pode fazer com que o sistema imune não reconheça o MTC como uma célula estranha (ZHAO et al. 2010).

Por fim, é importante a consideração do fenômeno de EMT quando da avaliação de MTCs. O papel da EMT já está bem definido como fisiológico e também no processo de metástase como um passo fundamental para invasão e crescimento neoplásico (TAYLOR et al. 2010), formando grupamentos de células de fenótipo misto. Este fenótipo, chamado de híbrido ou misto, já foi demonstrado em pacientes com cânceres de mama e cânceres de pulmão não pequenas células (CPNPC) (TAYLOR et al. 2010). A avaliação de EMT em CTCs e mesmo em fragmentos de tumores sólidos vem sendo baseada na análise de marcadores do

mecanismo de transformação fenotípica, como vimentina, N-caderina, TGF- β , MMP, por exemplo (FRIEDL and GILMOUR 2009).

Desta forma, este estudo propôs o aprofundamento do estudo de MTCs como entidade importante no cenário oncológico, podendo tanto sua quantificação quanto sua caracterização molecular serem marcadores preditivos e prognósticos no acompanhamento dos pacientes (STEINESTEL et al. 2014). Neste projeto, propomos avaliar não apenas a presença de MTCs, como também caracterizá-los. Para esta caracterização, elegemos dois marcadores: TGF- β e MMP-2 (TAYLOR et al. 2010; KSIAZKIEWICZ 2012; OMBRATO e MALANCHI 2014; LIU et al. 2015).

A escolha destes dois marcadores baseia-se no processo de EMT. Cada vez mais vem sendo demonstrado que parte das CTCs passa por este processo como forma de garantir a capacidade invasiva e proliferativa destas células (KSIAZKIEWICZ 2012; LIBERKO 2013; OMBRATO e MALANCHI 2014; LIU et al. 2015). Em consonância com o objetivo do projeto em demonstrar maior potencial metastático e pior prognóstico de MTCs, também foi avaliada a caracterização molecular destas entidades pela marcação de TGF- β RI (*TGF- β receptor I*) e MMP-2.

1.3 CTCs E MTCs EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Mesmo com as mais modernas técnicas para o tratamento dos CCP, os dados sobre cura e controle da doença não são satisfatórios:

- sobrevida combinada para todos os estádio não ultrapassa 50%,

- a maior parte (60%) dos pacientes portadores de CEC de CP são diagnosticados com doença em estágio III e IV,
- 20 – 30% dos pacientes com doença em estágio III e IV, tratados com cirurgia, RT e ou QT, desenvolverão recaídas locais, locorregionais ou a distância.
- 10% dos pacientes diagnosticados se apresentam com metástases ao diagnóstico
- 20% dos pacientes submetidos a ressecção R0 vão apresentar recorrência local (VERMORKEN e SPECENIER 2010).

A detecção precoce de uma eventual recaída poderia ser um fator prognóstico impactante na evolução destes pacientes. Entretanto, como as estratégias terapêuticas empregadas são, muitas vezes, agressivas, alterando a estrutura anatômica e funcional de maneira impactante, métodos de imagem convencionais como tomografia, ressonância magnética e até mesmo o PET CT, têm acuidade restrita.

Diante do conhecimento progressivo dos mecanismos de progressão tumoral e metastatização, é cada vez mais claro que o surgimento de CTCs guarda uma estreita relação com esse processo.

Alguns estudos publicados recentemente caminham nesse sentido. Entretanto, por questões metodológicas, alguns pontos importantes aguardam por uma definição mais clara, principalmente quanto ao método utilizado para a pesquisa das CTCs.

Tabela 4 - CTCs em câncer de cabeça e pescoço

Autor	Método para detecção de CTC	Características	Sítios envolvidos	Nº de pacientes com CTCs	CTCs/ml de sangue
Yang et al. 2009	Depleção negativa, IH, RT-PCR	CCP operado	CCP	20/32 (63%)	0 – 214/ ml
Yang et al. 2009	Depleção negativa, separação imunomagnética, depleção de células CD45+, citometria de fluxo	CCP operado	CCP	20/26 (77%)	0,5 – 282/ ml
Janata et al. 2010	Depleção negativa, separação imunomagnética	CCP operado	CCP	34/48 (71%)	0 - > 25/ ml
Hristozova et al. 2011	Citometria de fluxo	CCP localmente avançado	CCP	18/42 (43%)	1- 4 / 3,75ml
Nichols et al. 2012	CellSearch	CCP (EC III e IV)	Amígdala, hipofaringe, laringe, base de língua	9/31 (40%)	>1 / 3,75 ml
Buglione et al. 2012	CellSearch	CCP localmente avançado	Orofaringe, hipofaringe, laringe, seio paranasal	11/73 (15%)	1-43 / 7,5ml
Bozec et al. 2013	CellSearch	CCP (EC III e IV)	Cavidade oral, orofaringe	8/49 (16%)	0-5/7,5 ml
He et al. 2013	CellSearch	CCP (EC III e IV)	Orofaringe, laringe, hipofaringe	3/9 (33%)	0 – 1/7,5ml
Gröbe et al. 2014	CellSearch	CCP cavidade oral	Cavidade oral	10/80 (12,5%)	1 -145 / 7,5ml

Fonte: Adaptado de KULASINGHE et al. (2014)

HRISTOZOVA et al. em 2011, publicaram estudo onde avaliaram 42 pacientes portadores de CCP localmente avançado quanto a presença de CTCs, usando citometria de fluxo (CD45 positivo), e sua relação com estágio clínico (tamanho, volume e envolvimento linfonodal) e associação com HPV. CTCs foram detectadas em 18 dos 42 pacientes (43%), com uma mediana de 1,7 CTC por 3,75 ml de sangue. Não foi observada correlação significativa entre a presença de CTCs e do estágio T ou volume tumoral. No entanto, um estágio linfonodal de N2b ou superior foi associado a maior frequência de CTCs. Neste estudo a detecção de CTCs demonstrou relação com a metástase regional em tumores inoperáveis. Nesse estudo, 67% dos pacientes com tumores de cavidade oral e 47% dos pacientes com neoplasia de orofaringe possuem CTCs no sangue (HRISTOZOVA et al. 2011).

Em 2012, BUGLIONE et al. utilizando *Cell Search*, avaliaram 73 pacientes portadores de câncer localmente avançado de cabeça e pescoço (orofaringe, n = 39; nasofaringe, n = 10; laringe, n = 10, seio paranasal n = 6, hipofaringe, n = 5, cavidade oral, n = 3). CTC foi frequentemente identificado no câncer de orofaringe e hipofaringe e no carcinoma indiferenciado sinonasal. CTCs estavam presentes em 40% dos pacientes com tumores de hipofaringe e em 13% dos pacientes com tumores de orofaringe. A presença de CTCs foi mais frequente no estágio IV do que nos estágios da doença I-III (18% contra 6%, p = NS (não significativo)). A resposta parcial ou completa (CR) foi relacionada com a ausência ou desaparecimento de CTC durante o tratamento (p = 0,017). Uma diminuição do número de CTC ou a ausência durante todo o tratamento também está relacionada com melhor controle da

doença, após remissão completa ou incompleta e com a proporção de pacientes vivos e sem evidência de doença ($p = 0,009$) (BUGLIONE et al. 2012).

Em estudo mais recente publicado por GRÖBE et al. (2014) 110 pacientes portadores de CCP, submetidos a ressecção completa, sem tratamento neoadjuvante, foram analisados quanto a presença de CTCs e células tumorais disseminadas (CTDs) na medula óssea. Dez (12.5%) em oitenta pacientes apresentavam CTCs no sangue periférico, e dezoito (20%) em noventa pacientes apresentavam CTDs. Com significância estatística ($p = 0,04$) a contagem de CTCs apresentou relação com tamanho de tumor, comprometimento linfonodal relacionado células disseminadas na medula óssea ($p = 0,002$) e metástases a distância com CTCs ($p = 0,004$) e CTDs ($p = 0,005$) (GRÖBE et al. 2014).

O fato é que todos esses estudos são baseados em series pequenas, populações variadas e com doenças diferentes em relação sítio anatômico, etiologia e história natural. Além disso, diferentes metodologias para identificar e caracterizar CTCs, pouco contribuem para uma padronização do método de análise e contagem das células e seu significado prognóstico. E por último, como pode-se observar na Tabela 5, todos os estudos com CCP e CTCs utilizaram métodos baseados em seleção com anticorpos (EpCAM e citoqueratina) para isolamento das CTCs. Contudo, CTCs de pacientes com CCP podem perder a expressão de EpCAM ou citoqueratinas durante o processo de transição epitélio mesênquima, subestimando a população de CTCs (KULASINGHE et al. 2015).

2 OBJETIVOS

- 1 Determinar a incidência de MTCs em uma população de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, bem como sua relevância clínica;
- 2 Caracterizar sobrevida livre de progressão (SLP) dos pacientes portadores de MTCs;
- 3** Caracterizar molecularmente as CTCs contidas nos MTCs para avaliar presença de marcadores de invasividade nas mesmas, como TGF- β RI e MMP-2.

3 ARTIGO PUBLICADO – HEAD AND NECK

Received: 3 March 2017 | Revised: 25 May 2017 | Accepted: 20 June 2017
DOI: 10.1002/hed.24899

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Evaluation of incidence, significance, and prognostic role of circulating tumor microemboli and transforming growth factor- β receptor I in head and neck cancer

Marcello Ferretti Fanelli, MS¹ | Thiago Bueno Oliveira, MD¹ |
Alexcia Camila Braun, BS² | Marcelo Corassa, MD^{1,2} | Emne Ali Abdallah, MS² |
Ulisses Ribaldo Nicolau, MS¹ | Vanessa da Silva Alves, RN² | Daniel Garcia, MD¹ |
Vinicius F. Calsavara, PhD² | Luiz Paulo Kowalski, PhD³ |
Ludmilla Thomé Domingos Chinen, PhD² 

¹ Department of Medical Oncology – A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

² International Research Center – A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

³ Head and Neck Surgery and Otolaryngology Department – A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence

Ludmilla Thomé Domingos Chinen, International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Taguá, 440, São Paulo, 01508 010, SP, Brazil. Email: ludmilla.chinen@cipec.camargo.org.br

Funding information

This work was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP: Grant number 2013/08125-7).

Abstract

Background: Circulating tumor microemboli (CTM) are clusters of circulating tumor cells (CTCs), involved in metastasis, as also transforming growth factor- β (TGF- β). The purpose of this study was to verify their role in progression-free survival (PFS).

Methods: Blood from patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC; $n = 53$) was analyzed in 2 moments. TGF- β receptor I (TGF- β RI) expression was evaluated by immunocytochemistry.

Results: Comparing CTM1 (baseline) with CTM2 (first follow-up), patients with CTM1-positive disease who became CTM2-negative were classified as favorable (PFS 20 months). Patients with unfavorable evolution (CTM1-negative/CTM2-positive), had PFS of 17.5 months. Patients always CTM-negative showed PFS of 22.4 months, those always positive, 4.7 months ($P < .001$). The TGF- β RI expression in the first follow-up correlated with poor PFS (12×26 months; $P = .007$), being an independent prognostic factor (hazard ratio [HR] = 6.088; $P = .033$).

Conclusion: CTM1/2, TGF- β RI expression, and unfavorable CTM kinetics may represent poor prognosis in locally advanced HNSCC.

KEYWORDS

circulating tumor microemboli, head and neck cancer, isolated circulating tumor cells, poor prognosis, transforming growth factor- β receptor I (TGF- β RI)

1 | INTRODUCTION

Metastasis mechanism can be considered, initially, as an inefficient process. A significant amount of cancer cells can circulate through the bloodstream in patients with cancer, but very few of these can develop into metastases and characterize a patient with metastatic disease.^{4,5} However, when metastasis

succeeds, the management of every single patient is in fact complex and expected survival is very limited, justifying the efforts in understanding it. It is currently known that mechanical factors are important in cancer cell spreading, as well as a positive interaction between the cancer cell surface proteins and receptors and the microenvironment of a specific organ.⁶ This process can be prevented by the immune system, in

4 CONCLUSÕES

- 1 A expressão de TGF- β RI em CTCs isoladas e/ou em MTCs, no primeiro follow up, é um fator prognóstico independente para pior SLP em pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço;
- 2 A presença de MTCs, no 2º follow up (após tratamento), é fator de mau prognóstico para SLP em pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço;
- 3 Inibição do TGF- β RI pode ser um potencial alvo terapêutico.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham J. Imaging for head and neck cancer. **Surg Oncol Clin N Am** 2015; 24:455-71.

Akhter M, Hossain S, Rahman QB, Molla MR. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. **J Oral Maxillofac Pathol** 2011;15:168-76.

Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. **Nat Rev Cancer** 2014; 14:623-31.

Anderson CR, Sisson K, Moncrieff M. A meta-analysis of margin size and local recurrence in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2015; 51:464-9.

Ang KK, Zhang Q, Rosenthal DI, et al. Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. **J Clin Oncol** 2014; 32:2940-50.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. **Lancet** 2008; 371:1695-709.

Baddour HM Jr, Magliocca KR, Chen AY. The importance of margins in head and neck cancer. **J Surg Oncol** 2016; 113:248-55.

Bardia A, Haber DA. Solidifying liquid biopsies: can circulating tumor cell monitoring guide treatment selection in breast cancer? **J Clin Oncol** 2014; 32:3470-1.

Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. **N Engl J Med** 2004; 350:1945-52.

Blanchard P, Baujat B, Holostenco V, et al. MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site. **Radiother Oncol** 2011; 100:33-40.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res** 1988; 48:3282-7.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med** 2006; 354:567-578.

Bozec A, Ilie M, Dassonville O, et al. Significance of circulating tumor cell detection using the cell search system in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2013; 270:2745-9.

Brandt B, Junker R, Griwatz C, et al. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood. **Cancer Res** 1996; 56:4556-61.

Brickman D, Gross ND. Robotic approaches to the pharynx: tonsil cancer. **Otolaryngol Clin North Am** 2014; 47:359-72.

Buglione M, Pasinetti N, Bolzoni A, et al. Circulating tumour cells in locally advanced head and neck cancer: preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival. **Eur J Cancer** 2012; 48:3019-26.

Byers RM, Wolf PF, Ballantyne AJ. Rationale for elective modified neck dissection. **Head Neck Surg** 1988; 10:160-7.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature** 2015; 517:576-82.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:563-72.

Charbonneau N, G  linas M, del Vecchio P, et al. Primary radiotherapy for tonsillar carcinoma: a good alternative to a surgical approach. **J Otolaryngol** 2006; 35:227.

Chau NG, Haddad IR. Sequential and concurrent chemoradiation state of the art. **Hematol Oncol Clin N Am** 2015; 29:1061-74.

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med** 2004; 350:1937-44.

Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:1420-30.

Denis F, Garaud P, Bardet E, et al. Final results of the 94-01 French Head and Neck Oncology and Radiotherapy Group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma. **J Clin Oncol** 2004; 22:69-76.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Head and neck; p.21-100.

Escott EJ. Role of positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) in head and neck cancer. **Radiol Clin North Am** 2013; 51:881-93.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0**, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. <<http://globocan.iarc.fr>>. [2016 Apr 29].

Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. **J Natl Cancer Inst** 1970; 45:773-82.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:453-8.

Finn OJ. Cancer immunology. **N Engl J Med** 2008; 358:2704-15.

Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2009; 10:445-57.

Frisch S, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **J Cell Biol** 1994; 124:619-26.

Ganly I, Goldstein D, Carlson DL, et al. Long-term regional control and survival in patients with "low-risk," early stage oral tongue cancer managed by partial glossectomy and neck dissection without postoperative radiation: the importance of tumor thickness. **Cancer** 2013; 119:1168-76.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell** 2010; 140:883-99.

Gröbe A, Blessmann M, Hanken H, et al. Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Clin Cancer Res** 2014; 20:425-33.

Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. **Cancer Discovery** 2014; 4:650-61.

Hall SF, Groome PA, Irish J, O'Sullivan B. The natural history of patients with squamous cell carcinoma of the hypopharynx. **Laryngoscope** 2008; 118:1362-71.

Hao SP, Tsang NM, Chang KP, Chen CK, Huang SS. Treatment of squamous cell carcinoma of the retromolar trigone. **Laryngoscope** 2006; 116:916-20.

Hartl DM, Brasnu DF. Contemporary surgical management of early glottic cancer. **Otolaryngol Clin North Am** 2015; 48:611-25.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:777-89.

He S, Li P, Long T, et al. Detection of circulating tumour cells with the cell search system in patients with advanced-stage head and neck cancer: preliminary results. **J Laryngol Otol** 2013; 127:788-93.

Hicks WL Jr, North JH Jr, Loree TR, et al. Surgery as a single modality therapy for squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Am J Otolaryngol** 1998; 19:24-8.

Hinerman RW, Mendenhall WM, Morris CG, et al. Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity: 35-year experience. **Head Neck** 2004; 26:984-94.

Hou J-M, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer. **J Clin Oncol** 2012; 30:525-32.

Hristozova T, Konschak R, Stromberger C, et al. The presence of circulating tumor cells (CTCs) correlates with lymph node metastasis in non resectable squamous cell carcinoma of the head and neck region (SCCHN). **Ann Oncol** 2011; 22:1878-85.

Inoue T, Inoue T, Yoshida K, et al. Phase III trial of high- vs. low-dose-rate interstitial radiotherapy for early mobile tongue cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2001; 51:171-5.

Jatana KR, Teknos TN, Chalmers JJ, et al. Significance of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2010; 136:1274-9.

Kats-Ugurlu G, Roodink I, de Weijert M, et al. Circulating tumour tissue fragments in patients with pulmonary metastasis of clear cell renal cell carcinoma. **J Pathol** 2009; 219:287-93.

Kelner N, Vartanian JG, Pinto CA, Coutinho-Camillo CM, Kowalski LP. Does elective neck dissection in T1/T2 carcinoma of the oral tongue and floor of the mouth influence recurrence and survival rates? **Br J Oral Maxillofac Surg** 2014; 52:590-7.

Krebs MG, Hou J-M, Sloane R, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. **J Thorac Oncol** 2012; 7:306-15.

Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C. Molecular analysis of circulating tumour cells biology and biomarkers. **Nat Rev Clin Oncol** 2014; 11:129-44.

Ksiazkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition:a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. **Pathobiology** 2012; 79:195-208.

Kulasinghe A, Perry C, Jovanovic L, Nelson C, Punyadeera C. Circulating tumour cells in metastatic head and neck cancers. **Int J Cancer** 2015; 136:2515-23.

Levendag P, Nijdam W, Noever I, et al. Brachytherapy versus surgery in carcinoma of tonsillar fossa and/or soft palate: late adverse sequelae and performance status: can we be more selective and obtain better tissue sparing? **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2004; 59:713-24.

Liberko M, Kolostova K, Bobek V. Essentials of circulating tumor cells for clinical research and practice. **Crit Rev Oncol/Hematol** 2013; 88:338-56.

Liotta LA, Kleinerman J, Saldel GM. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. **Cancer Res** 1976; 36:889-94.

Liu H, Zhang X, Li J, Sun B, Qian H, Yin Z. The biological and clinical importance of epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells. **J Cancer Res Clin Oncol** 2015; 141:189-201.

McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. **Nat Cell Biol** 2014; 16:717-27.

Micalizzi D, Farabaugh S, Ford H. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2010; 15:117-34.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sréter L, Tulassay Z. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. **Clin Cancer Res** 2001; 7:4080-5.

Nichols AC, Hammond A, Palma DA, et al. Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the cell search system. **Head Neck** 2012; 34:1440-4.

Ohnishi K, Ota I, Takahashi A, et al. Transfection of mutant p53 gene depresses X-ray- or CDDP-induced apoptosis in a human squamous cell carcinoma of the head and neck. **Apoptosis** 2002; 7:367-72.

Ombrato L, Malanchi I. The EMT universe:space between cancer cell dissemination and metastasis initiation. **Crit Rev Oncog** 2014; 19:349-61.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Lancet** 1889; 133:571-3.

Pantel K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? **Cancer Res** 2013; 73:6384-8.

Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L, MACH-NC Collaborative Group. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three metaanalyses of updated individual data. **Lancet** 2000; 355:949-55.

Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. **N Engl J Med** 2007; 357:1705-1715.

Posner MR, Norris CM, Wirth LJ, et al. Sequential therapy for the locally advanced larynx and hypopharynx cancer subgroup in TAX 324:survival, surgery, and organ preservation. **Ann Oncol** 2009; 20:921-7.

Puram SV, Rocco JW. Molecular aspects of head and neck cancer therapy. **Hematol Oncol Clin N Am** 2015; 29:971-92.

Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. **Ann Rev Immunol** 2007; 25:267-96.

Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. **Surg Oncol Clin North Am** 2015; 24:379-96.

Rivera C. Essentials of oral cancer. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:11884-94.

Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. **J Clin Invest** 2012; 122:1951-57.

Sanabria A, Chaves AL, Kowalski LP, et al. Organ preservation with chemoradiation in advanced laryngeal cancer: the problem of generalizing results from randomized controlled trials. **Auris Nasus Larynx** 2017; 44:18-25.

Steinestel K, Eder S, Schrader AJ, Steinestel J. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. **Clin Transl Med** 2014; 3:17.

Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. **Science** 2011; 333:1157-60.

Taylor MA, Parvani JG, Schiemann WP. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2010; 15:169-90.

Truitt TO, Gleich LL, Huntress GP, Gluckman JL. Surgical management of hard palate malignancies. **Otolaryngol Head Neck Surg** 1999; 121:548-52.

Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. **N Engl J Med** 2007; 357:1695-704.

Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. **N Engl J Med** 2008; 359:1116-27.

Vermorken JB, Specenier P. Optimal treatment for recurrent / metastatic head and neck cancer. **Ann Oncol** 2010; 21(Suppl 7):vii252-vii261

Vineis P, Alavanja M, Buffler P, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:99-106.

Yang L, Lang J, Balasubramanian P, et al. Optimization of an Enrichment process for Circulating tumor cells from the blood of Head and Neck Cancer patients through depletion of normal cells. **Biotechnol Bioeng** 2009; 102:521-34.

Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. **J Cell Biol** 2011; 192:373-82.

Zheng X, Fan L, Zhou P, et al. Detection of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in gastric cancer. **Transl Oncol** 2017; 10:431-441.

Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. **Ann Rev Med** 1998; 49:407-24.

Zhao Q, Barclay M, Hilken J, et al. Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. **Mol Cancer** 2010; 9:154.

Zitsch RP 3rd, Park CW, Renner GJ, Rea JL. Outcome analysis for lip carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg** 1995; 113:589-96.

Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **Nat Rev Immunol** 2006; 6:295-307.

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



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 20 de abril de 2016.

À

Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

Aluno: Marcello Ferretti Fanelli

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1777/13C

“Detecção de marcadores de invasão em microêmbolos tumorais circulantes e sua correlação com evolução clínica em pacientes com tumores sólidos”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **19/04/2016**, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado: “Detecção de células tumorais circulantes e sua correlação com evolução clínica em carcinoma epidermóide da cabeça e pescoço”, registrado neste CEP sob nº 1777/13. O projeto afiliado em referência será Tese de Doutorado do aluno *Marcello Ferretti Fanelli*
- Tese de Doutorado – datado de fevereiro de 2016.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

141



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

São Paulo, 19 de julho de 2017.

À

Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Aluno: Marcello Ferretti Fanelli (Doutorado)

Ref. Projeto de Pesquisa nº. 1777/13C

“Detecção de Marcadores de Invasão em Microêmbulos Tumoriais Circulantes e sua Correlação com Evolução Clínica em Pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço.”

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **11/07/2017**, **tomaram conhecimento** dos seguintes documentos:

- Solicitação de mudança de título do projeto em referência de: “*Detecção de marcadores de invasão em microêmbolos tumorais circulantes e sua correlação com evolução clínica em pacientes com tumores sólidos.*” para “*Detecção de Marcadores de Invasão em Microêmbulos Tumoriais Circulantes e sua Correlação com Evolução Clínica em Pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço.*”, em documento datado de 19 de junho de 2017;
- Relatório de acompanhamento do projeto em referência, datado de 20 de junho de 2017.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caíres Serrano

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