

**IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS
CIRCULANTES E OUTROS COMPONENTES
SANGUÍNEOS EM PACIENTES COM CÂNCER DE
CÓLON LOCALIZADO**

EMNE ALI ABDALLAH

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

Área de Concentração: Oncologia

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

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Abdallah, Emne Ali

Identificação de células tumorais circulantes e outros componentes sanguíneos em pacientes com câncer de cólon localizado / Emne Ali Abdallah – São Paulo;

2019.

148p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores: Células Neoplásicas Circulantes/Neoplastic Cells, Circulating
2. Neoplasias Colorretais/cirurgia/terapia/sangue/Colorectal Neoplasms/
surgery/therapy/blood. 3. Resistencia a Medicamentos Antineoplásicos/Drug
Resistance, Neoplasm. 4. Biomarcadores/Biomarkers. 5. Biópsia Líquida/
Liquid Biopsy.

**“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas
ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”
(Carl Jung)**

APOIO FINANCEIRO: Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de auxílio à Pesquisa - processo 2015/16952-6.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus queridos pais Ali e Ramize, pilares da minha formação como ser humano, por todo o cuidado, dedicação, amor e incentivo, sempre. Ao Lucas, pelo seu carinho, companheirismo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Ludmilla Chinen, pela confiança depositada, paciência, amizade e por tudo que pôde me ensinar.

Aos pacientes participantes desta pesquisa.

Aos colegas da pesquisa, Alexcia, José Gabriel, Bianca, Virgílio, Vanessa, Marcilei, Pedro Henrique, Anna Paula, Daniela, Jacque, Milena Tariki, Marcello Fanelli, Mônica, Camila, Fe Lupinacci e Thiago Bueno, pela colaboração e amizade.

Ao A.C.Camargo Cancer Center e ao Centro Internacional de Pesquisa e Ensino, pela disponibilização de equipamentos laboratoriais, infraestrutura e acesso aos dados necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em oncologia, à biblioteca e escritório de projetos, pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às equipes dos Departamentos de Oncologia Clínica e Cirurgia Pélvica do A.C.Camargo Cancer Center, principalmente à Bruna Catin e Dra. Renata Mayumi, pelo recrutamento dos pacientes e colaboração.

À minha família e a todos meus verdadeiros amigos, que de uma forma ou de outra sempre estiveram presentes, e tenho certeza que estão tão felizes quanto eu, por ter finalizado mais esta etapa.

À todas as amigas que pude fazer no CIPE nestes 7 anos, pela companhia e carinho.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, muito obrigada!

RESUMO

Abdallah EA. **Identificação de células tumorais circulantes e outros componentes sanguíneos em pacientes com câncer de cólon localizado.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: A detecção precoce do câncer de cólon proporciona altas taxas de cura, no entanto, há pacientes que apresentam recidiva local e metástase à distância. As células tumorais circulantes (CTCs) e os microêmbolos circulantes (MEs) desempenham um papel importante nestes processos.

Objetivo: avaliar o papel de CTCs e MEs em pacientes com câncer de cólon localizado. **Material e métodos:** foram coletados 10 mL de sangue de pacientes com câncer de cólon pré-cirúrgico, pré-adjuvância e 6 meses após o final do tratamento. As amostras foram processadas no dispositivo ISET® e as CTCs foram fixadas com formaldeído e identificadas por imunocitoquímica. Para detecção de expressão de RNAm, foi realizada a técnica de hibridização *in situ* cromogênica. O DNA foi extraído das membranas sem formaldeído e analisado por PCR digital em gotas.

Resultados: no módulo I, foram incluídos 69 pacientes (18 com estágio I, 15 com estágio II e 36 com estágio III). A taxa de detecção de CTCs na primeira coleta foi de 94,2%, de 94,6% no primeiro seguimento e de 100% no segundo seguimento. Foi observada uma queda global na mediana de CTCs ao longo do tempo. No segundo seguimento, a expressão de ERCC1 e de β -galactosidase nas CTCs foi mais encontrada em pacientes com estágio III ($p= 0,03$ e $p= 0,04$, respectivamente). A expressão de ERCC1 com alto índice de positividade (IP) nas CTCs, no segundo seguimento foi determinante de sobrevida livre de recidiva (SLR) inferior ($p= 0,014$). Foi encontrada uma correlação positiva entre o nível de CTCs e a porcentagem de células TReg ($p= 0,01$) e negativa entre o nível de CTCs e a porcentagem de linfócitos CD3+ ($p= 0,01$). Pacientes com alta *Platelet-to-Lymphocyte*

Ratio (PLR) encontravam-se em sua maioria com estadiamentos patológicos II de alto risco e III ($p= 0,014$). Alta PLR foi determinante de SLR inferior ($p= 0,01$). No módulo II (pacientes com tumores de alto risco, submetidos à quimioterapia adjuvante) foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de CTC e CEA nos casos que tiveram recidiva da doença ($p= 0,001$). Alto IP de ERCC1 no segundo seguimento foi determinante de SLR significativamente inferior ($p= 0,013$). **Conclusões:** CTCs foram encontradas em altas taxas nos pacientes com câncer de cólon localmente avançado. A avaliação do sistema imunológico dos pacientes juntamente com as CTCs demonstrou ser uma ferramenta promissora para acompanhamento destes pacientes.

Descritores: Células Neoplásicas Circulantes. Neoplasias Colorretais/cirurgia/terapia/sangue. Resistencia a Medicamentos Antineoplásicos. Biomarcadores. Biópsia Líquida.

SUMMARY

Abdallah EA. **[Identification of circulating tumor cells and other blood componentes in localized colon cancer]**. São Paulo, 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: The early detection of colon cancer provides high cure rates, however, there are patients that present local relapse and distant metastasis. Circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor microemboli (CTM) play a crucial role in these processes. **Objectives:** to evaluate the role of CTCs and CTM in non-metastatic colon cancer patients. **Material and methods:** 10 mL of blood were collected from colon cancer patients prior to the surgery, prior to the adjuvant treatment, and 6 months after the treatment end. Samples were processed in the ISET® device and CTCs were formaldehyde-fixed and identified by immunocytochemistry. For mRNA expression *in situ* hybridization was applied. The DNA was extracted from the non-fixed CTCs and analyzed by droplet digital PCR. **Results:** there were 69 patients included (18 at stage I, 15 at stage II, and 36 at stage III) at module I. The CTC detection rate at baseline was 94.2%, at first follow-up was 94.6%, and at second follow-up was 100%. It was observed an overall drop in CTC median over time. At second follow-up, ERCC1 and β -galactosidase expression in CTCs was most commonly found in stage III patients ($p= 0.03$ and $p= 0.04$, respectively). High positivity index (PI) of ERCC1 in CTC at second follow-up was determinant of inferior relapse-free survival (RFS) ($p= 0.014$). It was found a positive correlation between CTC levels and the percentage of TReg cells ($p= 0.01$) and a negative correlation between CTC levels and the percentage of CD3+ lymphocytes. Patients with high Platelet-to-Lymphocyte Ratio (PLR) were mostly found in high-risk stage II and III patients ($p= 0.014$). High PLR was determinant of inferior RFS ($p= 0.01$). At module II (patients with high-risk tumors, treated with adjuvant chemotherapy), it was found a positive correlation between CTC and CEA

levels in the cases that shown disease progression (DP) ($p= 0.001$). High PI of ERCC1 at second follow-up had shown significantly worse RFS ($p= 0.013$). **Conclusions:** CTCs were found in high rates in localized colon cancer patients. Additionally, the evaluation of the patient's immune combined with the CTCs showed to be a promising tool to monitoring these patients.

Key-words: Neoplastic Cells, Circulating. Colorectal Neoplasms/surgery/therapy/blood. Drug Resistance, Neoplasm. Biomarkers. Liquid Biopsy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenvolvimento do câncer colorretal (CCR) e métodos de rastreamento.....	4
Figura 2	Comparação entre a biópsia convencional e a biópsia líquida .	9
Figura 3	Nível de evidência clínica da importância de CTCs em cada estágio do CCR.....	26
Figura 4	Esquema do processo de filtração pela tecnologia ISET (<i>Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells</i>)	32
Figura 5	Fluxograma demonstrando o número total de coletas	44
Figura 6	Esquemas demonstrando o número total de coletas em cada grupo de estadiamento	45
Figura 7	Fotomicrografias de Células Tumorais Circulantes (CTCs) isoladas do sangue de pacientes com câncer de cólon	49
Figura 8	Fotomicrografias de Microêmbolos (MEs) isolados do sangue de pacientes com câncer de cólon	54
Figura 9	Representação gráfica da mediana de CTCs encontrada em cada grupo de estadiamento nos três momentos estudados	54
Figura 10	Diagramas de caixa demonstrando a distribuição de CTCs de acordo com os grupos estabelecidos	55
Figura 11	Gráfico de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos 69 casos incluídos no estudo	55

Figura 12	Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos pacientes de acordo com a quantificação de CTCs (A-C) e presença ou ausência de MEs (D-F)	56
Figura 13	Gráficos representando o coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA de todos os pacientes nos três momentos analisados	58
Figura 14	Representação gráfica da oscilação dos níveis de Células Tumorais Circulantes (CTCs) e dos marcadores tumorais Antígeno Carcinoembrionário (CEA) e CA 19-9 ao longo do tempo nos 8 casos que apresentaram recidiva	59
Figura 15	Fotomicrografias de linhagens celulares pipetadas e homogeneizadas em sangue sadio para os testes de controle positivo das reações de imunocitoquímica	61
Figura 16	Fotomicrografias de linhagens celulares pipetadas e homogeneizadas em sangue sadio para os testes de controle negativo das reações de imunocitoquímica.....	62
Figura 17	Número de amostras de CTCs analisadas, positivas e negativas para cada marcador em todos os casos na primeira coleta	63
Figura 18	Número de amostras de CTCs analisadas, positivas e negativas para cada marcador em todos os casos no primeiro seguimento	64
Figura 19	Número de amostras de CTCs analisadas, positivas e negativas para cada marcador em todos os casos no segundo seguimento.....	65

Figura 20	Curvas ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs na primeira coleta (análise em todos os pacientes).....	69
Figura 21	Curvas ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs na segunda coleta (análise em todos os pacientes).....	70
Figura 22	Curvas ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs no segundo seguimento (análise em todos os pacientes).....	71
Figura 23	Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) de todos os casos incluídos no estudo de acordo com o índice de positividade (IP) da expressão dos marcadores escolhidos	72
Figura 24	Fotomicrografias de Células Tumorais Circulantes isoladas de paciente com câncer de cólon, positivas para expressão de RNAm de TYMS, visualizados pelos pontos marrons na célula.....	73
Figura 25	Resultados concordantes e discordantes em relação ao estado de mutação em <i>KRAS</i> nos códons 12 e 13 observados entre CTCs e tumor primário.....	75

Figura 26	Gráficos representando o coeficiente de correlação referente aos dados obtidos nas análises de citometria de fluxo nos últimos 6 pacientes	77
Figura 27	Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos pacientes de acordo com a proporção entre neutrófilos e linfócitos (NLR) e a proporção entre plaquetas e linfócitos (PLR).....	80
Figura 28	Níveis de platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) entre os pacientes com presença ou ausência de microêmbolos (MEs), dentro dos estadiamentos patológicos.....	81
Figura 29	Diagramas de caixa demonstrando a distribuição de CTCs dos pacientes submetidos ao tratamento adjuvante, de acordo com os grupos estabelecidos	88
Figura 30	Gráfico de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos 40 casos de alto risco tratados com quimioterapia adjuvante	89
Figura 31	Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos casos de alto risco tratados com quimioterapia adjuvante de acordo com a quantificação de CTCs (A-C) e presença ou ausência de MEs (D-F)	90
Figura 32	Gráficos representando o coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA dos pacientes com tumores de alto risco e tratados com quimioterapia adjuvante	92
Figura 33	Número de amostras de CTCs analisadas na primeira coleta, positivas e negativas para cada marcador nos casos de alto risco submetidos ao tratamento adjuvante	94

Figura 34	Número de amostras de CTCs analisadas no primeiro seguimento, positivas e negativas para cada marcador nos casos de alto risco submetidos ao tratamento adjuvante.....	95
Figura 35	Número de amostras de CTCs analisadas no segundo seguimento, positivas e negativas para cada marcador nos casos de alto risco submetidos ao tratamento adjuvante.....	96
Figura 36	Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos casos de alto risco tratados com quimioterapia adjuvante de acordo com a expressão dos marcadores escolhidos.....	99
Figura 37	Curvas ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs na primeira coleta (análise em pacientes com tumores de alto risco, submetidos a tratamento adjuvante).....	101
Figura 38	Curvas ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs no primeiro seguimento (análise em pacientes com tumores de alto risco, submetidos a tratamento adjuvante).....	102
Figura 39	Curvas ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs no segundo seguimento (análise em pacientes com tumores de alto risco, submetidos a tratamento adjuvante).....	103

Figura 40 Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos casos de alto risco tratados com quimioterapia adjuvante de acordo com o índice de positividade (IP) da expressão dos marcadores escolhidos 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Levantamento de estudos com CTCs em câncer colorretal/câncer de cólon	12
Tabela 2	Descrição detalhada dos anticorpos testados nas CTCs	34
Tabela 3	Painel 1, utilizado para identificar e quantificar as populações de células T	39
Tabela 4	Painel 2, utilizado para identificar e quantificar as populações de CTCs, monócitos e macrófagos	39
Tabela 5	Painel 3, utilizado para identificar e quantificar a população de linfócitos B e linfócitos T	39
Tabela 6	Características clinico-patológicas dos pacientes envolvidos neste estudo (n= 69)	47
Tabela 7	Dados referentes à taxa de detecção de CTCs, mediana, média em cada grupo de estadiamento em todos os momentos do estudo (n= 69)	53
Tabela 8	Dados sobre microêmbolos em cada grupo de estadiamento em todos os momentos do estudo (n= 69).....	53
Tabela 9	Descrição do tempo médio de sobrevida livre de recidiva (SLR) baseado no índice de positividade (IP; número de CTCs positivas/número total de CTCs no spot analisado) de cada marcador analisado em todos os pacientes em todos os momentos	68

Tabela 10	Descrição dos casos testados para mutação em <i>KRAS</i> (12/13 e Q61) e <i>NRAS</i> (Q61) no tumor primário por Next Generation Sequencing (NGS), resultado da análise em CTCs pelo droplet digital PCR.....	74
Tabela 11	Descrição dos casos em relação às porcentagens de cada subtipo celular	78
Tabela 12	Características clinico-patológicas dos pacientes considerados como portadores de tumores de alto risco envolvidos neste estudo (n= 40)	83
Tabela 13	Dados referentes à taxa de detecção de CTCs, mediana, média nos pacientes com tumores de alto risco e submetidos ao tratamento adjuvante, em cada grupo de estadiamento em todos os momentos do estudo	87
Tabela 14	Dados sobre microêmbolos nos pacientes com tumores de alto risco e submetidos ao tratamento adjuvante, em cada grupo de estadiamento em todos os momentos do estudo (n= 40)	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAC	Área abaixo da curva
AJCC	Comitê Conjunto Americano para Estadiamento do Câncer
BSA	Albumina sérica bovina
β-gal	β-galactosidase
CIN	Instabilidade cromossomal
ctDNA	DNA tumoral circulante
ctRNA	RNA tumoral circulante
CTCs	Células tumorais circulantes
CEA	Antígeno carcinoembriogênico
DAB	3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dTMP	Deoxi-timidina monofosfato
dUMP	Deoxi-uridina monofosfato
Ep	Estadiamento patológico
ERCC1	<i>Excision Repair Cross-Complementing Group 1</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HNPCC	Câncer colorretal hereditário não poliposo
HR	<i>Hazard ratio</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IP	Índice de positividade
ISET	<i>Isolation by size of epithelial tumor cells</i>
mAb	<i>monoclonal antibody</i> (anticorpo monoclonal)
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase-9</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSI	Instabilidade de microssatélites
MTCs	Microêmbolos tumorais circulantes
mTORC1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NLR	<i>Neutrophil-to-lymphocyte ratio</i>

PAF	Polipose adenomatosa familiar
PCRq	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
PD	Progressão de doença
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PLR	<i>Platelet-to-lymphocyte ratio</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SLD	Sobrevida livre de doença
SLP	Sobrevida livre de progressão
SLR	Sobrevida livre de recidiva
SG	Sobrevida global
TIMP1	Tissue inhibitor matrix metalloproteinase 1
TGFβ	<i>Transforming growth factor-β</i>
TGFβRI	<i>Transforming growth factor β receptor type I</i>
TYMS	<i>Thymidylate synthase</i>
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WGA	<i>Whole genome amplification</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer Colorretal	1
1.2	Câncer de Cólon Não Metastático.....	6
1.3	Biópsia Líquida	8
1.4	Células Tumorais Circulantes e Microêmbolos Tumorais Circulantes ...	10
1.5	Células Tumorais Circulantes e Resistência ao Tratamento	19
1.6	Células Tumorais Circulantes e Invasão Tumoral	21
1.7	Sistema Imunológico e Câncer.....	23
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Primário	27
2.2	Objetivos Secundários.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	Desenho do Estudo	29
3.2	Crterios de Inclusão.....	30
3.3	Crterios de Exclusão.....	30
3.4	Contagem e Caracterização de CTCs.....	31
3.5	Hibridização <i>in situ</i> Cromogênica	34
3.6	Extração de DNA e RNA das CTCs	36
3.7	<i>Droplet Digital</i> PCR	36
3.8	Citometria de Fluxo	37
3.9	Contagem de Neutrófilos e Linfócitos.....	40
3.10	Análise Estatística	40
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Módulo I, todos os pacientes.....	42
4.1.1	Coleta de Amostras	42
4.1.2	Características Demográficas, Clínicas e Patológicas.....	45

4.1.3	Contagem de CTCs e Microêmbolos.....	49
4.1.4	Correlação entre os níveis de CTCs e de CEA	57
4.1.5	Expressão Proteica nas CTCs.....	60
4.1.6	Hibridização <i>in situ</i> Cromogênica (CISH)	72
4.1.7	<i>Droplet Digital</i> PCR (ddPCR).....	74
4.1.8	Análise de populações celulares por citometria de fluxo	76
4.1.9	Contagem de elementos do sangue	79
4.2	Módulo II, pacientes com tumores de alto risco.....	81
4.2.1	Características Demográficas, Clínicas e Patológicas.....	82
4.2.2	Contagem de CTCs e Microêmbolos.....	84
4.2.3	Correlação entre os níveis de CTCs e de CEA	91
4.2.4	Expressão Proteica nas CTCs.....	93
5	DISCUSSÃO	105
5.1	Módulo I, todos os pacientes	106
5.2	Módulo II, pacientes com tumores de alto risco.....	119
6	CONCLUSÕES	125
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

ANEXO

Anexo 1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de neoplasia mais incidente no mundo, representando 10,2% de todas as neoplasias diagnosticadas em ambos os sexos em 2018. Em termos de mortalidade, esta neoplasia ocupa o segundo lugar, sendo reportadas mais de 880 mil mortes, representando 9,2% de todas as mortes por câncer registradas no mundo, em ambos os sexos (BRAY et al. 2018). A distribuição mundial de sua incidência e mortalidade varia amplamente, com mais de dois terços dos novos casos e aproximadamente 60% de todas as mortes reportadas em países com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) alto ou muito alto (FERLAY et al. 2013).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), foram estimados 36.360 novos casos de CCR em 2018, ocupando a terceira posição de neoplasias mais frequentes em homens (8,1%) e a segunda posição em mulheres (9,4%). Dados de 2017, também do INCA, mostram um registro de 18.867 mortes em ambos os sexos (Ministério da Saúde 2018).

A porcentagem de sobrevida em 5 anos estimada para pacientes diagnosticados em estágio inicial de CCR é de 90%, mas reduz para aproximadamente 65% quando diagnosticados em estágio mais avançado

da doença, quando o tumor é localmente disseminado. Ainda, a sobrevida em 5 anos é estimada para menos de 10% dos casos, quando a doença se encontra em estágio metastático (ZLOBEC e LUGLI 2008).

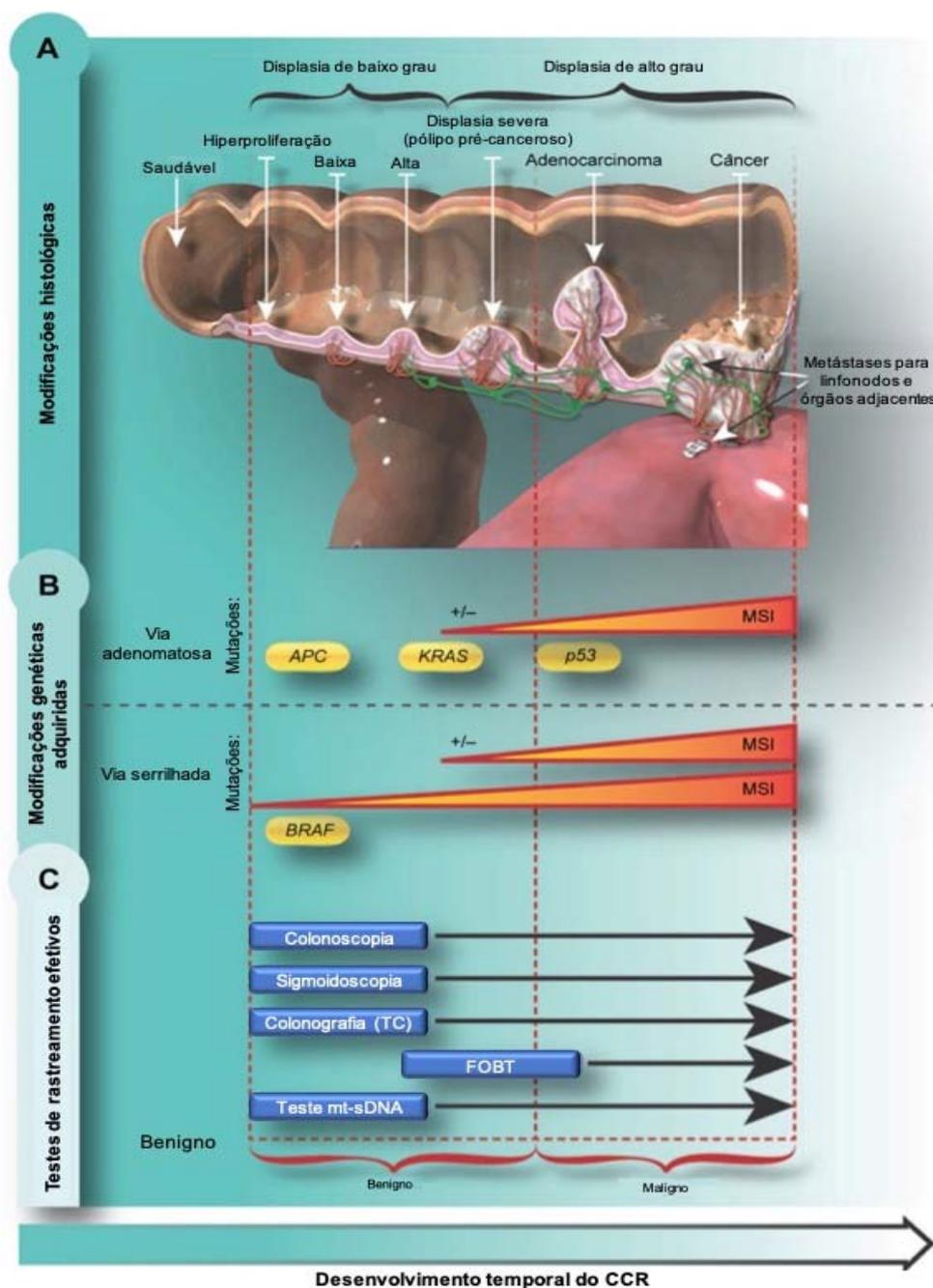
Mais de 90% dos CCR são derivados de células glandulares epiteliais secretoras, portanto classificados histologicamente como adenocarcinomas. Os outros tipos histológicos são mais raros; se incluem neste grupo os carcinomas neuroendócrinos, de células escamosas, adenoescamosos, *spindle cell* e carcinomas indiferenciados (FLEMING et al. 2012). A graduação histológica é baseada na diferenciação do tumor e é considerada um importante fator prognóstico do CCR (BARRESI et al. 2015). Em adenocarcinomas bem diferenciados, >95% dos tumores são formadores de glândulas. Adenocarcinomas moderadamente diferenciados são os mais comuns (~70%) e apresentam cerca de 50-95% de glândulas formadas. Quando o tumor apresenta <50% de formação glandular, é considerado como pouco diferenciado (FLEMING et al. 2012).

O CCR é uma doença molecularmente heterogênea, causada pela interação de fatores genéticos e ambientais. As modificações da mucosa colônica são graduais e lentas, duram aproximadamente de 10 a 15 anos, tempo em que a detecção se faz necessária, antes da progressão de adenoma para carcinoma invasivo (revisado por BINEFA et al. 2014). Os sintomas mais frequentes do estágio avançado do CCR são: sangramento, desconforto abdominal, mudança do hábito intestinal, perda de peso e anemia. Quanto mais tarde for diagnosticada a doença, pior é o prognóstico (SAHA et al. 2002; HABR-GAMA 2005).

A prevenção e o rastreamento da doença em estágios iniciais são de extrema importância para garantir a redução da mortalidade neste grupo. A prevenção primária se consiste em manter hábitos de vida o mais saudável possível, como por exemplo, realizar exercícios físicos periodicamente, evitar o consumo excessivo de carnes e embutidos, evitar tabagismo e etilismo (CHAN e GIOVANNUCCI 2010). A prevenção secundária se dá nos exames de rastreamento em indivíduos incluídos nos grupos de fatores de risco alto: idade acima de 50 anos, histórico familiar de doença intestinal inflamatória, (como doença de Crohn e colite ulcerativa). As síndromes de Lynch (ou câncer colorretal hereditário não poliposo - HNPCC) e a polipose adenomatosa familiar (PAF) também são fatores de risco, apesar de representarem apenas 5% de todos os casos de adenocarcinoma colorretal. Por meio de exames como pesquisa de sangue oculto nas fezes, sigmoidoscopia flexível, colonoscopia, entre outros, torna-se possível o diagnóstico precoce e a realização da remoção cirúrgica de pólipos benignos, adenomas e adenocarcinomas em estágio inicial, garantindo que a doença seja controlada antes mesmo de se tornar maligna ou atingir maiores proporções (SIMON 2016).

Pode-se dizer que a maioria (75%) dos CCR são desenvolvidos de maneira esporádica, ou seja, não relacionada à histórico familiar ou síndromes. Desta forma, o desenvolvimento da condição maligna se dá por múltiplos processos envolvendo diversas modificações histológicas, morfológicas, genéticas e epigenéticas que acumulam ao longo do tempo (MIGLIORE et al. 2011). O detalhamento das etapas de desenvolvimento e

métodos de rastreamento do CCR em cada etapa pode ser visualizado na **Figura 1**.



Fonte: Adaptado de SIMON (2016).

Figura 1 - Desenvolvimento do câncer colorretal (CCR) e métodos de rastreamento. **(A)** Modificações histológicas no desenvolvimento do CCR. **(B)** Modificações genéticas adquiridas. **(C)** Testes de rastreamento efetivos em cada momento.

O estadiamento do CCR segue as normas fornecidas e atualizadas pelo Comitê Conjunto Americano para Estadiamento do Câncer-AJCC, com o sistema TNM. Esta classificação leva em consideração a profundidade de invasão tumoral (T), presença ou não de acometimento linfonodal (N) e metástase(s) à distância (M). De acordo com estes três parâmetros, é possível estabelecer o estadiamento, conseqüentemente, o prognóstico de cada paciente. O estadiamento então, será classificado como de menor ao maior risco, respectivamente, de I ao IV (AMIN et al. 2017).

Em relação ao tratamento, este pode variar amplamente dentre os possíveis estadiamentos do CCR ao diagnóstico. Brevemente, se a doença é localizada e limitada ao cólon e/ou linfonodos regionais, a primeira estratégia de tratamento é a ressecção cirúrgica seguida ou não de tratamento adjuvante. Por outro lado, se a doença se encontra na região retal em estágios mais avançados, a estratégia inicial é o tratamento neoadjuvante, seguido de ressecção cirúrgica. O tratamento adjuvante em ambos os tumores (cólon e reto) será dependente dos fatores de risco apresentados no laudo patológico. Para estadiamentos metastáticos, onde a doença se propagou para órgãos distantes, a estratégia é o tratamento sistêmico, com quimioterapia e/ou terapia-alvo com anticorpos monoclonais (mAb) (KUIPERS et al. 2015). Neste trabalho, a estratégia de tratamento nos diferentes grupos de câncer de cólon não metastático será focada com mais detalhes.

1.2 CÂNCER DE CÓLON NÃO METASTÁTICO

O câncer de cólon é o tipo tumoral mais frequentemente diagnosticado na região intestinal, representando cerca de dois terços, enquanto um terço dos casos origina-se no reto (WEI et al. 2004).

Anatomicamente, o cólon divide-se em quatro partes: ascendente (situada no lado direito do abdômen), transversa (na parte superior), descendente e sigmoide (situadas no lado esquerdo do abdômen) (BECK 2002). Estas topografias podem auxiliar na determinação do prognóstico dos pacientes, bem como fornecer dados importantes sobre o processo de carcinogênese. Como exemplo, tumores situados no cólon ascendente são associados comumente com a via de instabilidade de nucleotídeos, como a instabilidade de microssatélites (MSI). Já os tumores descendentes são comumente relacionados com instabilidade cromossomal (CIN) (revisado por LI e LAI 2009).

Sabe-se que a primeira estratégia para o tratamento desta doença é a ressecção completa da lesão, o que algumas vezes inclui ressecção dos órgãos circunvizinhos e ampla dissecação linfonodal, procedimentos que afetam a qualidade de vida dos pacientes (KATSUMATA et al. 2006). Após avaliação patológica da peça cirúrgica, é determinado o estadiamento patológico (Ep). Para pacientes com estadiamento I e II de baixo risco, o seguimento é o recomendado.

Para pacientes com neoplasia de cólon com Ep II de alto risco ou III, a quimioterapia adjuvante baseada em oxaliplatina é indicada, com ganho de

tempo livre doença e sobrevida global (SG) em relação a Fluorouracil isolado (ANDRÉ et al. 2004), sendo possíveis esquemas como FOLFOX (ANDRÉ et al. 2009), FLOX (YOTHERS et al. 2011), XELOX (HALLER et al. 2011), tendo-se como opção o uso de fluoropirimidina isolada em caso de contraindicação à Oxaliplatina (TWELVES et al. 2005; KÖHNE et al. 2013). Foi demonstrada uma ausência de benefício de associações envolvendo Irinotecano (VAN CUTSEM et al. 2009), Bevacizumabe (ALLEGRA et al. 2013) e Cetuximabe (mesmo em RAS selvagem) (ALBERTS et al. 2012). O tempo seguro para se iniciar a quimioterapia adjuvante após ressecção cirúrgica é de até 8 semanas, sendo que tal atraso está associado a maior risco de morte, conforme demonstrado em duas metanálises. Verificou-se que, a cada 4 semanas de atraso no início da quimioterapia, há queda de 14% em SG (DES GUETZ et al. 2010; BIAGI et al. 2011).

O maior obstáculo atualmente está no desenvolvimento de novos biomarcadores a fim de melhorar a atividade dos agentes disponíveis, assim como na determinação da melhor sequência de tratamento (revisado por YAFFEE et al. 2015).

Os biomarcadores podem ser utilizados para diversos fins, como por exemplo, diagnóstico, fator prognóstico, fator preditivo e de sobrevida. Com relação aos biomarcadores avaliados após o diagnóstico de CCR, para determinar prognóstico e predizer o tratamento, estão incluídos na rotina: avaliação de marcadores moleculares, como instabilidade de microssatélite (MSI), por meio de análise de mutação em genes envolvidos no sistema de *mismatch repair* (MMR). São: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, resultando em

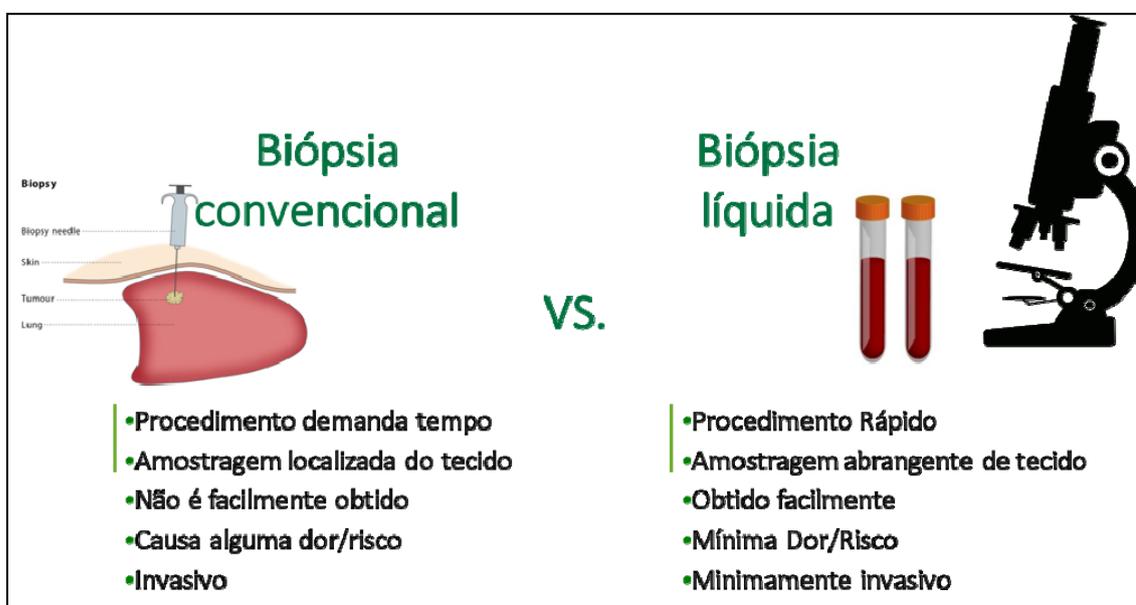
alterações em sequências de DNA repetida (microsatélites). Genes da família RAS são codificados em proteínas essenciais na ativação de vias na cascata de sinalização por receptor de EGF (*Epithelial Growth Factor*). Proteínas RAS desempenham papel fundamental em desenvolvimento tumoral, proliferação celular, angiogênese e metástase. Mutações nos genes da família RAS podem fazer com que as proteínas funcionem de maneira autônoma, independente de sinalização proveniente do receptor de EGF, tornando-as constitutivamente ativas. As análises de mutação nos genes *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* também são realizadas na prática clínica, uma vez que presentes refletem em resistência ao tratamento anti-EGFR (GONZALEZ-PONS e CRUZ-CORREA 2015).

Utilizado também na prática clínica oncológica para avaliar a atividade da doença, o antígeno carcinoembrionário (CEA) quando presente em altas concentrações no soro indica atividade tumoral aumentada (câncer colorretal), principalmente em casos metastáticos (PERKINS et al. 2003). Ainda, se faz necessário o estudo de biomarcadores para monitorar os pacientes continuamente e entender o processo de metastatização.

1.3 BIÓPSIA LÍQUIDA

A biópsia líquida é uma ferramenta minimamente invasiva de se obter informações sobre a neoplasia de interesse, por meio de biomarcadores moleculares tumorais. Por ser obtida de maneira minimamente invasiva, permite que sejam realizadas análises repetidas por coletas seriadas, permitindo o acompanhamento da evolução tumoral de maneira mais dinâmica, como por alterações moleculares ou descoberta de biomarcadores

específicos de cada doença. Os biomarcadores de interesse podem ser encontrados em fluídos corpóreos, como, por exemplo: sangue, urina, saliva, líquidos cavitários, entre outros (HEITZER et al. 2019). Dentre os biomarcadores que podem ser encontrados, podemos citar as células tumorais circulantes (CTCs). Além das CTCs, existem outros componentes que se encaixam no conceito de biópsia líquida, como por exemplo, DNA tumoral livre circulante (ctDNA), RNA tumoral livre circulante (ctRNA), vesículas extracelulares e microRNAs. A biópsia líquida fornece algumas vantagens em relação à biópsia convencional. É possível observar algumas destas vantagens na **Figura 2**.



Fonte: Adaptado de LOVLY et al. (2019)

Figura 2 - Comparação entre a biópsia convencional e a biópsia líquida.

Análises por biópsia líquida são uma alternativa para as biópsias convencionais e podem trazer informações valiosas sobre tumor de origem (primário ou metastático) destes biomarcadores (ALIX-PANABIÈRES e PANTEL 2013). Também podem ser utilizados para auxiliar no planejamento terapêutico ou para verificar se o tratamento está funcionando (BUDER et al.

2016). No entanto, até o presente momento, pode-se apontar algumas desvantagens, visto que a quantidade de CTCs e de ctDNA varia amplamente entre pacientes portadores da mesma neoplasia e estágio. Outro viés é a falta de metodologias validadas para análises de comparação dos estudos disponíveis. Para ctDNA, não está claro se estes fragmentos representam uma boa ferramenta para avaliar resistência à terapia, visto que podem representar detritos de células apoptóticas. Portanto, estudos são necessários para entender estes biomarcadores, clínica e biologicamente, assim permitindo o uso destas ferramentas no futuro para diagnóstico e tratamento do câncer.

1.4 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES E MICROÊMBOLOS TUMORAIS CIRCULANTES

As células tumorais circulantes (CTCs) e seus *clusters* - microêmbolos tumorais circulantes (MTCs) – são encontrados no sangue periférico e desempenham um papel fundamental na recidiva e progressão do câncer (PANTEL e ALIX-PANABIÈRES 2013). CTCs e MTCs são elementos presentes no sangue, portanto se enquadram no conceito de biópsia líquida. Apesar de estas células carregarem informações robustas sobre o tumor e serem muito estudadas nos últimos anos, a biologia das CTCs ainda é precariamente entendida (JOOSSE e PANTEL 2013; JOOSSE et al. 2015). CTCs são extremamente raras, quando comparadas às demais células do sistema hematopoiético (1-100 CTCs para milhões de leucócitos e bilhões de eritrócitos) (HONG e ZU 2013).

Estudos já realizados vêm demonstrando a capacidade destas células em retroalimentação do tumor primário e também desempenhando papel essencial na formação de micrometástases resistentes (KIM et al. 2009; DASGUPTA et al. 2017). As características internas das CTCs, tais como alterações genéticas e epigenéticas, expressão gênica anormal, transição epitélio-mesênquima (TEM) e propriedades de células-tronco, aumentam a chance de sua sobrevivência na corrente sanguínea (WANG et al. 2018).

As CTCs são uma ferramenta potencial que fornece dados de prognóstico e de predição ao tratamento neoplasias de diversas topografias, como mama, colorretal, próstata, pulmão de células não pequenas, neuroendócrinas e melanoma (CRISTOFANILLI et al. 2004; COHEN et al. 2008; DE BONO et al. 2008; KREBS et al. 2011; KHAN et al. 2013; KHOJA et al. 2013; ROMITI et al. 2014). Um levantamento dos estudos clínicos com CTCs em CCR e câncer de cólon foi realizado e pode ser observado na **Tabela 1.**

Tabela 1 - Levantamento de estudos com CTCs em câncer colorretal/câncer de cólon.

Estudo, ano	Topografia	Estadiamento (AJCC)	Método	Número de pacientes	Taxa de detecção	Desfecho
COHEN et al. 2008	CCR	IV	CellSearch	430	108/430 (25,1%)	A presença de ≥ 3 CTCs em <i>baseline</i> foi fator preditor de pior SLP ($p= 0,0002$) e SG ($p< 0,0001$).
HIRAIWA et al. 2008	Tumores gastrointestinais	I-IV	CellSearch	114 (40 CCR)	2/11 (18,2% para CCR não metastático) e 12/29 (41,4% para CCR metastático)	A presença de ≥ 2 CTCs/7,5mL em <i>baseline</i> foi significativamente correlacionado com disseminação peritoneal em CCR ($p= 0,007$). No total de pacientes analisados, a presença de ≥ 2 CTCs foi significativamente associada a SG inferior.
COHEN et al. 2009	CCR	IV	CellSearch	430	108/430 (25,1%)	A presença de ≥ 3 CTCs em <i>baseline</i> foi fator preditor de pior SLP ($p= 0,004$) e SG ($p< 0,0001$).
TOL et al. 2010	CCR	CCR avançado	CellSearch	467	129/467 (27,6%)	A presença de ≥ 3 CTCs em <i>baseline</i> foi fator preditor de pior SLP (HR:1,5) e SG (HR: 2,2).
AGGARWAL et al. 2013	CCR	IV	CellSearch	430	NR	A presença de ≥ 3 CTCs/7,5 mL em <i>baseline</i> foi fator preditor independente de pior SG ($p= 0,05$). Também funcionaram como fator de estratificação para melhor prognóstico (<3 CTCs) quando CEA estava alto.
GALIZIA et al. 2013	CCR	I-IV	Citometria de fluxo	76	47/76 (61,8%)	Altos níveis de CTCs após a cirurgia foram relacionados independentemente com recidiva.
GAZZANIGA et al. 2013	CCR	IV	CellSearch	119	42/119 (35,3%)	A presença de ≥ 1 CTC/7,5 mL em <i>baseline</i> foi associada a pior prognóstico, bem como em casos com conversão de CTC negativa para ≥ 1 na segunda avaliação ($p= 0,01$).

Cont/Tabela 1

Estudo, ano	Topografia	Estadiamento (AJCC)	Método	Número de pacientes	Taxa de detecção	Desfecho
KUBOKI et al. 2013	CCR	IV	CellSearch	63	19/63 (30%)	A presença de ≥ 3 CTCs/7,5 mL em <i>baseline</i> foi fator preditor de pior SG.
LU et al. 2013	CCR	III	Detecção de mRNA (membrane-array)	90	21/90 (23,3%)	A presença de CTCs após a quimioterapia adjuvante foi fator preditor independente de recidiva (HR: 6.273; 95% CI: 2.442–16.117).
BARBAZÁN et al. 2014	CCR	IV	RT-PCR	50	NR	A alta detecção dos marcadores VIL1, CLU e TIMP1 foi significativamente associada a pior SLP e SG no <i>baseline</i> ($p = 0.004$ e $p = 0.007$).
ROMITI et al. 2014	CCR	I-IV	Imunofluorescência quantitativa	75	21/75 (28%)	A presença de ≥ 2 CTCs em <i>baseline</i> foi fator preditor de pior SG ($p = 0,002$). A prevalência de CTC após a quimioterapia foi fator prognóstico independente de pior SG ($p = 0.03$).
BORK et al. 2015	CCR	I-IV	CellSearch	287	30/287 (10,4%)	A presença de ≥ 1 CTC/7,5 mL foi associada a pior SG na coorte de estágios I-III ($n = 239$; $p < 0.001$) e também na coorte inteira ($n = 287$; $p < 0.001$). Além disto, foi fator prognóstico independente na análise multivariada, nas duas coortes analisadas (HR: 5,5 e 5,6, respectivamente).
NING et al. 2015	CCR	IV	qRT-PCR	88	67/88 para CK (76,1%), 63/88 para survivina (71,6%)	A alta detecção dos marcadores CK e survivina foi significativamente associada a SG inferior ($p < 0,001$ e $p = 0,032$, respectivamente).
SEEBERG et al. 2015	CCR	IV	CellSearch	194	37/194 (19%)	A presença de ≥ 2 CTCs em <i>baseline</i> foi fator preditor de pior SLP ($p = 0,002$)
SOTELO et al. 2015	CCR	III	CellSearch	519	167/519 (32,2%)	A detecção de CTCs não foi associada a SLD ou SG.

Cont/Tabela 1

Estudo, ano	Topografia	Estadiamento (AJCC)	Método	Número de pacientes	Taxa de detecção	Desfecho
SOUZA E SILVA et al. 2016	CCR	IV	ISET	54	NR	Pacientes com CTC+ em <i>baseline</i> que se tornaram CTC- na segunda avaliação tiveram SLP superior do que pacientes com CTC- que se tornaram CTC+ (p= 0,06).
TSAI et al. 2016	CCR	I-IV	Plataforma CMx	110	59/95 (62% para CCR não metastático) e 12/15 (80% para CCR metastático)	O desenvolvimento de metástase à distância em pacientes não metastáticos foi maior no grupo em que foi observada a presença de ≥ 5 CTCs/2 mL, quando comparado ao grupo com >5 CTCs/2 mL.
ELIASOVA et al. 2017	CCR	I-IV	MetaCell	98	81/98 (83%)	A detecção de CTCs não foi associada a SLP ou SG.
GERMANO et al. 2018	CCR	IV	CellSearch	19	7/19 (36,8%)	A detecção de CTCs não foi associada a SLP ou SG.
HINZ et al. 2017	Câncer de cólon	I-IV	RT-PCR	299	112/299 (37,4%)	A detecção de CK20 no sangue dos pacientes foi um fator preditor independente de SG e SLD inferior (HR: 1,94; p= 0,044 para ambos).
WU et al. 2017	CCR	I-IV	CanPatrol	126	97/126 (76,9% para E-CTCs), 71/126 (56.35% para E/M-CTCs) e 53/126 (42.06% para M-CTCs)	Presença de CTCs (todos os tipos) e de MEs foram significativamente associados à contagem de linfócitos e estágio TNM (p< 0,001).
BROWN et al. 2018	Câncer de cólon	I-III	Dispositivo microfluídico	23	18/23 (78%)	Exercícios físicos podem diminuir os níveis de CTCs em pacientes com câncer de cólon entre os estágios I-III.

Cont/Tabela 1

Estudo, ano	Topografia	Estadiamento (AJCC)	Método	Número de pacientes	Taxa de detecção	Desfecho
SUN et al. 2018	CCR	CCR avançado	Separação negativa e ddPCR	140	NR	Mutações em <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> ou <i>BRAF</i> nas CTCs (p= 0,0028) foram significativamente determinantes de SG inferior, mas não em cfDNA (p= 0,088).
YANG et al. 2018	CCR	I-III	Separação negativa	109	77/109 (70,6%)	Pacientes com tumores moderadamente ou pouco diferenciados tiveram mais CTCs do que pacientes com tumores bem diferenciados (p< 0,001).
ROTHÉ et al. 2019	CCR	II/III	CellSearch	32	2/32 (6,9%)	A detecção de CTCs não foi associada a SLP ou SG.

Abreviações: AJCC: Comitê Conjunto Americano para Estadiamento do Câncer; CCR: câncer colorretal; CTC: células tumorais circulantes; NR: não reportado; RT-PCR: reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase; ddPCR: *droplet digital* PCR; SLP: sobrevida livre de progressão; SLD: sobrevida livre de doença; SG: sobrevida global; E-CTC: CTC epitelial; E/M CTC: CTC epitelial/mesenquimal; M-CTC: CTC mesenquimal CK: citoqueratina; cfDNA: DNA livre de célula; HR: *hazard ratio*.

Recentemente, diversos grupos pelo mundo têm tentado desenvolver plataformas e metodologias capazes de recuperar o máximo de células viáveis, minimizando as taxas de falsos negativos e falsos positivos. Dentre estas metodologias, incluem-se: exclusão por filtração baseada em tamanho, isolamento por centrifugação baseado em densidade, seleção imunomagnética (seleção positiva e negativa), plataformas microfluídicas, chips de enriquecimento celulares, seleção celular acústica, eletroforese baseada em carga elétrica, entre outros (VONA et al. 2000; GERTLER et al. 2003; NAGRATH et al. 2007; YANG et al. 2009; STOTT et al. 2010; FARACE et al. 2011; OZKUMUR et al. 2013; SARIOGLU et al. 2015).

Estudos também têm procurado caracterizar funcional e molecularmente estas células, a fim de melhor entender mecanismos envolvidos na biologia e no comportamento destas no desenvolvimento e progressão tumoral (HODGKINSON et al. 2014; CARTER et al. 2017; LALLO et al. 2017, 2019).

A mudança de contagem de CTCs (cinética) tem sido um biomarcador bem estudado e mostrou ser importante para avaliação de eficácia do tratamento em pacientes com câncer de cólon Ep III; a detecção de RNA mensageiro (RNAm) de CTCs foi avaliada em 90 pacientes com CCR e sua persistência após o tratamento adjuvante mostrou ser um marcador de pior sobrevida livre de doença (SLD): HR: 6,27 (IC 95% 2,4 – 16,1) (LU et al. 2013).

Em células que possuem o fenótipo de célula-tronco, é observada a perda do fenótipo epitelial (GORGES et al. 2012) e ocorre a transformação

para o fenótipo mesenquimal (POLYAK e WEINBERG 2009; BEDNARZ-KNOLL et al. 2012). Além disto, foi demonstrada a capacidade de comunicação entre células tumorais e plaquetas, resultando em indução de TEM *in vitro* e na corrente sanguínea *in vivo* (LABELLE et al. 2011).

A mudança de fenótipo observada nas células que passam pela TEM reflete a dificuldade de detecção de CTCs por marcadores epiteliais. Por exemplo, um estudo utilizando o sistema baseado em antígenos epiteliais, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) – CellSearch®, avaliou CTCs em 66 pacientes com CCR não metastático e as encontrou (≥ 2 CTCs/7.5 mL) apenas em 17 (26%) dos casos. Não foi observada qualquer relação entre CTCs e localização do tumor primário, níveis aumentados de CEA, de lactato desidrogenase ou grau de diferenciação (SASTRE et al. 2008). Um estudo realizado na Alemanha (BORK et al. 2015), também utilizando o sistema CellSearch®, observou ≥ 1 CTC por 7.5 mL de sangue em apenas 19/239 (7,9%) dos casos de CCR não metastático pré-cirurgia. No entanto, observaram CTCs associadas significativamente à pior SG (38.4 *versus* 49.8 meses; $P < 0.001$) e também como o mais forte fator prognóstico independente na análise multivariada (HR: 5.5; IC 95%: 2.3-13.6). Ainda, sobre a TEM, estes estudos demonstraram uma baixa taxa de detecção e contagem, por estarem provavelmente perdendo células tumorais não epiteliais, mostrando uma necessidade de um método de enriquecimento mais sensível – e independente de marcadores - para a análise biológica das CTCs.

Os MTCs são agregados celulares que apresentam em sua composição três CTCs ou mais (KREBS et al. 2012). Este tipo de migração coletiva fornece vantagens na sobrevivência na corrente sanguínea quando comparados às CTCs sozinhas, assim, apresentando maiores chances de atingir sítios distantes. Apesar de serem encontrados com mais raridade na circulação sanguínea, os MTCs possuem um potencial aumentado de formar metástases (de 23-50 vezes) quando comparado às CTCs que circulam sozinhas (ACETO et al. 2014). MTCs circulam como aglomerados de CTCs puras ou também conjuntamente a outros tipos celulares, como, neutrófilos, linfócitos, células endoteliais, plaquetas e células estromais, como fibroblastos (KÜSTERS et al. 2007; TAO et al. 2016; JIANG et al. 2017; SZCZERBA et al. 2019). Este comportamento de migração conjunta a outras células fornece um microambiente especializado e adequado às células tumorais, tanto para a sobrevivência na corrente sanguínea, quanto para colonização de outros nichos, além de protegê-las contra o estresse oxidativo células e ataque do sistema imunitário (SHARMA et al. 2014; TABASSUM e POLYAK 2015; AU et al. 2016)

Os mecanismos de formação destes MTCs ainda permanecem incertos; hipóteses sugerem que estes agregados tanto podem partir do tumor primário desta forma (ACETO et al. 2014) ou serem resultantes de uma proliferação intravascular a partir células tumorais solitárias que se aderem ao endotélio (AL-MEHDI et al. 2000). Visto que um alto número de pacientes pode carregar micrometástases que estão além da detecção por

métodos convencionais, a presença destes aglomerados no sangue pode trazer informações importantes a respeito da evolução tumoral.

O processo de metastatização é considerado como um procedimento complexo, que depende de uma infinidade de mecanismos e é falho, pois atinge baixas taxas de sucesso (revisado por LEONE et al. 2018). O número de CTCs liberadas na circulação é alto, na ordem de milhares por dia; porém, trabalhos clássicos com modelos experimentais mostram que apenas 1% das células injetadas intravenosamente em murinos sobrevivem após 24 horas (FIDLER 1970) e que esta mesma porcentagem (1%) de micrometastases hepáticas evoluem para macrometástases (LUZZI et al. 1998).

1.5 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES E RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO

Resistência a drogas, recidiva tumoral e a falta de tratamentos curativos na doença metastática, levantam a questão sobre terapias convencionais atingirem as células certas em estágios iniciais. Evidências sugerem que a quimioterapia pode não atingir CTCs e particularmente, uma subpopulação de células mais agressivas. Estas células podem se tornar quimio- e/ou radorresistentes e levar ao desenvolvimento de uma doença mais agressiva e menos responsiva ao tratamento (GAZZANIGA et al. 2010a, b). A sensibilidade reduzida à quimioterapia ainda é o maior

obstáculo no sucesso do tratamento do CCR. Existem alguns marcadores descritos na literatura por guiarem a resposta ao tratamento quimioterápico.

Variabilidade nos genes que codificam diidropirimidina desidrogenase, envolvida no metabolismo de 5-FU, timidilato sintase (TYMS), que é alvo do 5-FU e metilenotetraidrofolato redutase, que converte 5,10-metilenotetraidrofolato em 5-metiltetraidrofolato, também podem modular a resposta e toxicidade a 5-FU (BOIGE et al. 2010).

Um mecanismo comum de resistência clínica ao bolus e à infusão está relacionado ao aumento dos níveis de TYMS. TYMS é uma enzima constitutiva e desempenha um papel importante na síntese “de novo” de dTMP (deoxi-timidina monofosfato), um precursor essencial de DNA, que catalisa a metilação de dUMP (deoxi-uridina monofosfato) a dTMP (SANTI et al. 1974). TYMS é o alvo das fluoropirimidinas e sua quantidade intrínseca parece ser um preditor de resposta dos pacientes ao 5-FU. Altos níveis de expressão de TYMS em pacientes com CCR em estágio inicial parecem predizer SG ruim tanto em pacientes tratados quanto em não tratados com quimioterapia após cirurgia. Ainda, pacientes com CCRm com altos níveis de TYMS não respondem ao tratamento infusional com 5-FU, enquanto aqueles com baixos níveis apresentam melhores taxas de resposta, quando avaliados em tumores (KIM et al. 2009; revisado por CALASCIBETTA et al. 2010) e em CTCs (ABDALLAH et al. 2015).

Considerando o mecanismo de ação dos derivados da platina, estudos têm avaliado o papel de enzimas envolvidas no reparo de DNA como possíveis preditores de sensibilidade ou resistência a estas drogas,

como *Excision Repair Cross-Complementation Group 1-ERCC1*. Alguns estudos têm mostrado uma melhor resposta para pacientes com baixos níveis de ERCC1 medidos por reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), sugerindo que quantidades reduzidas desta enzima afetam a capacidade das células de reparar os danos causados pela droga ao DNA (LORD et al. 2002; CEPPI et al. 2006).

1.6 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES E INVASÃO TUMORAL

A cascata metastática é dividida em três processos principais: invasão no estroma adjacente, entrada na corrente sanguínea e extravasação. A dissociação das células a partir da massa tumoral se dá principalmente pela perda de adesão célula-célula e mudanças entre as interações célula-matriz extracelular, permitindo então invasão no estroma, que, por sua vez, pode ser modulado por moléculas secretadas pelas células tumorais. Além disto, o tumor pode induzir angiogênese, que é essencial para que este tumor sobreviva e se desenvolva, para transporte de nutrientes e remoção de detritos provenientes da alta capacidade de proliferação (MARTIN et al. 2013). Portanto, variadas moléculas presentes nas CTCs podem fornecer informações importantes sobre o estado de invasão de cada célula, de maneira individual.

TIMP-1 pertence a um grupo de 4 inibidores endógenos (TIMP 1-4) e controla a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) (BREW e NAGASE 2010). TIMP-1 também desempenha múltiplas atividades em

processos biológicos, independentes de sua função inibitória de MMPs, como crescimento celular, apoptose e diferenciação (STETLER-STEVENSON 2008). Este marcador já foi relatado na literatura por fornecer dados preditivos de resposta ao tratamento em câncer quando avaliado no plasma (SØRENSEN et al. 2007). Por outro lado, a avaliação da expressão de transcritos de TIMP-1 e outros marcadores de TEM já foram avaliados em CTCs, e os altos níveis de TIMP-1 foram correlacionados com piores sobrevida livre de progressão (SLP) e SG (BARBAZÁN et al. 2014) e com metástase hepática (BARBAZÁN et al. 2012). TIMP-1 inibe especificamente a MMP-9 e seus padrões de expressão estão fortemente correlacionados com processos fisiológicos e patológicos, pela regulação da degradação da matriz extracelular (RODERFELD et al. 2007). Os níveis plasmáticos deste complexo já se mostraram como fator prognóstico em câncer de mama (THORSEN et al. 2013). A MMP-9 está envolvida no processo de degradação do colágeno tipo IV presente na membrana basal, bem como no processo de invasão e metástase (TANAKA et al. 1995).

Outras moléculas também podem servir como guia para traçar o perfil de agressividade tumoral e metastatização, como a expressão do receptor I de *transforming growth factor* β (TGF β RI) nas células tumorais. O TGF β está envolvido no processo de TEM, pela ativação de vias supressoras de E-caderina, como *SNAIL* e *SLUG* (MASSAGUÉ 2008). A expressão de TGF β e mutações nos genes codificadores do seu receptor podem ter correlação com a atividade oncogênica desta citocina, assim como com aumento de

progressão tumoral e alto potencial de migração celular (ZARZYNSKA 2014).

Células tumorais podem sofrer dano contínuo proveniente da exposição às drogas, podendo ocorrer nestas células, desde resposta ao dano e recuperação completa até morte celular. Algumas células podem adotar um estado de parada de ciclo celular, chamado senescência. Uns dos marcadores mais utilizados para verificar senescência é a β -galactosidase (CAMPISI e D'ADDA DI FAGAGNA 2007). Assim, a análise deste marcador pode se fazer útil na avaliação do estado de quiescência das CTCs.

1.7 SISTEMA IMUNOLÓGICO E CÂNCER

O processo de metastatização por CTCs é considerado um mecanismo falho, visto que nem todas as CTCs vão colonizar o sítio metastático com sucesso. Para atingi-lo, dependem de diversos fatores, tanto do microambiente tumoral, quanto da circulação sanguínea. Para sobreviver na corrente sanguínea, as CTCs precisam passar por mudanças fenotípicas significativas, devido às forças físicas as quais são submetidas (WIRTZ et al. 2011). Estudos utilizando plataformas microfluídicas demonstraram que ao passar por mudanças fenotípicas, as CTCs ainda passam por deformabilidades menores, quando comparadas à células do sangue e células de linhagem tumoral, indicando que CTCs são passíveis de apoptose quando em contato com as forças e pressões do sistema circulatório (SHAW BAGNALL et al. 2015; REGMI et al. 2017). Além disto,

subgrupos de CTCs necessitam da interação com outras células do sangue, como linfócitos, neutrófilos, plaquetas e/ou macrófagos, para manter a sobrevivência na corrente sanguínea (GUO e OLIVER 2019).

As plaquetas constituem o segundo tipo de célula mais abundante no sangue periférico, que contém entre 150.000 a 350.000 plaquetas por mililitro (NILSSON et al. 2011). Circulam como fragmentos de células nucleadas que se originam a partir de megacariócitos na medula óssea (GEORGE 2000). A principal função das plaquetas é deter a hemorragia após trauma no tecido e lesão vascular. Depois de ativadas, essas células aderem e liberam uma multiplicidade de fatores ativos.

Os mecanismos envolvidos nestes processos são utilizados pelas células tumorais para promoção de metástases (LABELLE et al. 2011). Neste caso, as plaquetas formam complexos de fibrina para proteger o tumor da eliminação por células do sistema imune, promovendo sobrevivência e crescimento dessas células. Ao entrar em contato com as células tumorais, as plaquetas liberam quimiocinas (CXCL5 e CXCL7) para formar um nicho metastático precoce. Podem liberar também TGF β 1 que induz alterações fenotípicas da célula tumoral epitelial para *mesenquimal-like*, facilitando assim o seu extravasamento e disseminação para locais distantes durante o processo de metástase (revisado por TESHAMARIAM 2016).

TGF β 1 derivado de plaquetas é um elemento essencial para o evento metastático, especificamente na TEM, que permite a disseminação para locais distantes. A mudança fenotípica é induzida pelas vias de sinalização

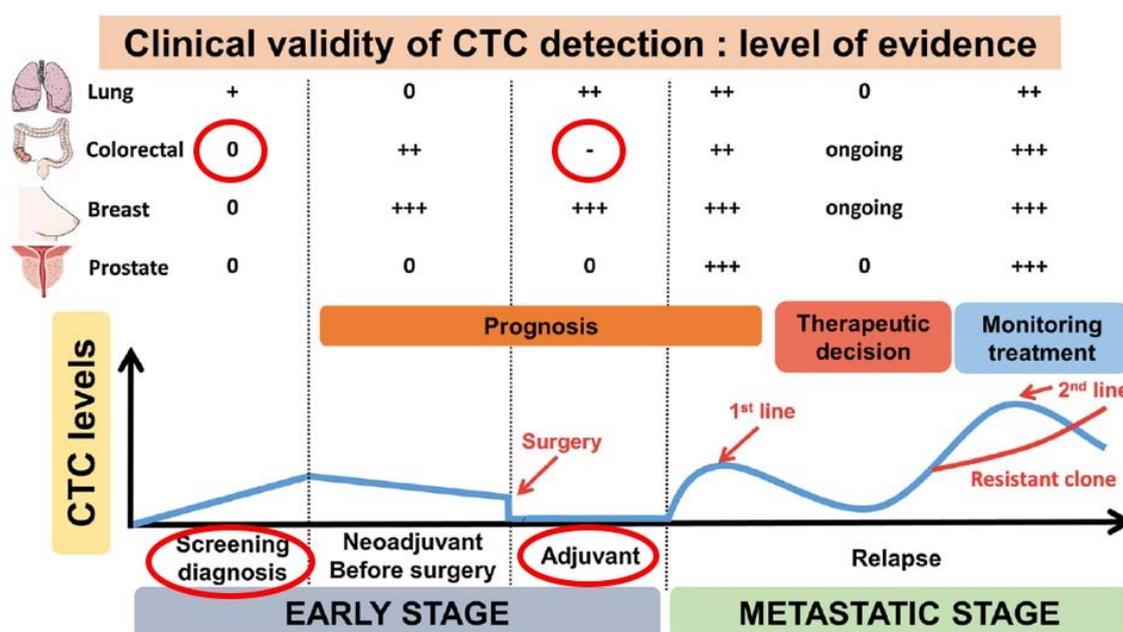
TGF- β /SMAD e fator nuclear κ B (*NFkB*). Em camundongos com deficiência de plaquetas e de TGF β 1, o extravasamento de células de tumor e metástases foi diminuído, indicando que a atividade de TGF β 1 no microambiente tumoral é capaz de aumentar o fenótipo invasivo e a promoção de metástase (LABELLE et al. 2011).

Ainda falando da influência e importância de elementos do sistema imunológico no câncer, um dos mecanismos que inibem a resposta tumoral é a via PD-1 (*programmed cell death protein 1*) e PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*). A PD-1, que é expressa na superfície de linfócitos T, B e NK, monócitos e células dendríticas, é um inibidor do ponto de verificação imunitário destas células. A ativação da PD-1 por PD-L1 induz redução da atividade das células T, causando uma redução na produção de citocinas e indução da tolerância a antígenos (revisado por SCHÜTZ et al. 2017).

Outros elementos do sangue, facilmente obtidos, como números absolutos de neutrófilos, linfócitos e plaquetas podem ser úteis na avaliação prognóstica dos pacientes. Mais especificamente a taxa entre neutrófilos e linfócitos (*neutrophil-to-lymphocyte ratio* – NLR) e entre plaquetas e linfócitos (*platelet-to-lymphocyte ratio* – PLR) são parâmetros simples que podem indicar o prognóstico dos pacientes com câncer (FORGET et al. 2017; YANG et al. 2017).

Quando este projeto foi iniciado, havia carência de evidências no que se diz respeito à validade clínica na detecção de CTCs em pacientes com câncer de cólon não metastático em duas condições: no

rastreamento/diagnóstico e no tratamento adjuvante (revisado por CABEL et al. 2017; **Figura 3**).



Fonte: Adaptado de CABEL et al. (2017).

Figura 3 - Nível de evidência clínica da importância de CTCs em cada estágio do CCR.

Pacientes com câncer de cólon estágios II-III apresentam altas taxas de cura. Entretanto, 30 a 40% apresentam recidiva localizada ou distante (American Cancer Society-ACS 2019). Nossa hipótese é de que a análise das CTCs, juntamente com outros componentes sanguíneos possam determinar quais pacientes com tumores não-metastáticos apresentarão, no futuro, recidiva da doença. Além disto, acreditamos que a análise de CTCs em pacientes com estágios II possa servir como um biomarcador a este grupo que apresenta alta heterogeneidade em termos de prognóstico. Neste trabalho, o desfecho primário avaliado foi sobrevida livre de recidiva (SLR).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

- Quantificar CTCs provenientes de pacientes com câncer de cólon localmente avançado e correlacionar seus níveis com exames de imagem e recidiva.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Analisar nas CTCs novos marcadores de resistência ou resposta ao tratamento (TYMS, ERCC1 e TIMP1), de resposta imune (PD-L1), de invasão e migração celular (MMP9 e TGF β R1) e de senescência (β -galactosidase);
- Verificar a expressão de RNAm do gene *TYMS* observados por RNAish nas CTCs;
- Analisar nas CTCs os padrões de mutação somática, bem como comparar com as mutações disponíveis provenientes do tumor primário;
- Avaliar o perfil imunológico e composição celular no sangue dos pacientes livres de tratamento;

- Verificar se NLR e PLR podem de fato funcionar como fator prognóstico para os pacientes em tratamento, sendo mais um indicador de fácil obtenção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo prospectivo longitudinal foi realizado por meio de coleta de sangue periférico de pacientes com tumores de cólon não metastático antes da ressecção cirúrgica. Para estágio I, a coleta de seguimento foi realizada de um a dois anos. Para estágio II (sem indicação de quimioterapia adjuvante), a coleta de seguimento foi realizada em aproximadamente 7 meses. Para estágio II (com indicação de quimioterapia adjuvante) e estágio III, foram realizadas duas coletas de seguimento: uma antes do início da quimioterapia e uma coleta após aproximadamente 6 meses do fim do tratamento. Foi utilizado como controle negativo, sangue de 20 indivíduos saudáveis, com distribuição similar quando classificados por idade e sexo. Como controle positivo, sangue de indivíduos saudáveis, acrescido da linhagem celular HCT8. O tamanho da amostra aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP (código de aprovação: 2141/15B) (Anexo 1) foi de 100 pacientes com câncer de cólon. Todo o procedimento de identificação foi feito por códigos, preservando a confidencialidade do paciente. A coleta de sangue ocorrerá imediatamente antes do início da cirurgia para avaliação de CTCs, após a cirurgia/antes do tratamento quimioterápico adjuvante, após 6 meses do tratamento quimioterápico adjuvante.

Os pacientes tiveram aproximadamente 10 mL de sangue em cada visita e participaram da pesquisa apenas os indivíduos que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- idade igual ou superior a 18 anos;
- pacientes com câncer de cólon que serão submetidos à cirurgia, confirmado por análise patológica;
- ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) *Performance Status* entre 0 e 2;
- função medular avaliada por amostra de sangue periférico considerada normal; provas de função renal e hepática até 1,5 vezes o limite da normalidade;
- pacientes que assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- pacientes que tiverem realizado cirurgia ou procedimento cirúrgico na última semana;
- pacientes que tiverem realizado terapia prévia nas últimas três semanas;

- pacientes com história prévia de outro carcinoma nos últimos dois anos.

3.4 CONTAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE CTCs

Para contagem e caracterização das CTCs, em todos os momentos da coleta de sangue, utilizamos o sistema ISET® (*Isolation by size of tumor cells*), que é um método direto de obtenção das células epiteliais por filtração (**Figura 4**). Baseia-se na observação de que a maioria dos leucócitos do sangue periférico (linfócitos e neutrófilos) são as menores células do corpo, com um tamanho que varia de 8 a 11 μm . Desta forma, estas células podem ser eliminadas por filtração do sangue através de uma membrana de policarbonato com poros calibrados de 8 μm .

As amostras de sangue periférico do paciente foram coletadas em tubos com EDTA e diluídas a 1:10 com *ISET Buffer™* (RareCells Diagnostics, Paris, França), com ou sem formaldeído a 0,02%. Após 10 minutos de incubação, as amostras foram depositadas nos poços do *ISET Block™* (RareCells Diagnostics, Paris, França), que contém em sua base uma membrana de policarbonato que possui poros cilíndricos de 8 μm de diâmetro. As amostras de sangue foram filtradas por aspiração sob vácuo e em seguida, as membranas foram lavadas com *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 1X (pH:7,3), retiradas do *ISET Block™* e, quando secas, armazenadas a -20°C . Dos 10 mL de sangue analisados, 6 mL foram

destinados à análise citopatológica e 4 mL à análise molecular (submersão da membrana em RNA later e posterior extração de DNA e RNA).



Fonte: Adaptado de: <http://www.rarecells.com/ctc-isolation.html>.

Figura 4 - Esquema do processo de filtração pela tecnologia ISET (*Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells*).

Para confirmar a existência de células nos spots, foi realizada a reação de imunocitoquímica com os marcadores desejados, em todos os spots das duas primeiras coletas. As amostras das últimas coletas foram analisadas pela técnica de coloração por hematoxilina e eosina (hematoxilina incubada por 2 minutos; lavagem com água destilada; eosina incubada por 4 minutos e lavagem com água destilada).

Para a realização da imunocitoquímica os spots das membranas foram cortados e colocados em placas de 24 poços. Para a recuperação antigênica, cada spot foi incubado com 1 mL de *Target retrieval solution* (1x) (Dako™) e aquecido em banho-maria em micro-ondas por três vezes de aproximadamente 2 minutos cada, até a água do banho-maria atingir fervura. Após o terceiro aquecimento, a placa se manteve em temperatura ambiente (T.A.) por 20 minutos. Cada spot foi hidratado com 160 µL de *Tris buffered saline* (TBS 1X, pH: 7,6) por 20 minutos em T.A. As células foram então permeabilizadas com 160µl de TBS 0,2% Triton X-100 por 5 min à

T.A. Após uma nova lavagem com TBS 1X, as membranas foram incubadas por 15 minutos, no escuro e à T.A. com uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio, e lavadas novamente com TBS 1X. Em seguida o anticorpo previamente diluído em TBS+Soro fetal bovino a 10% foi aplicado aos spots e incubado *overnight* em T.A. (vide anticorpos na **Tabela 2**). Para o controle negativo, o anticorpo primário foi omitido. A membrana foi lavada novamente com TBS 1X, incubada por 30 minutos em Dual Long System HRP (Dako™) e revelada pelo cromógeno 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma-Aldrich) (por 10 min em T.A.).

Para a realização da dupla marcação imunocitoquímica, após a utilização do DAB, foi realizada uma incubação de 2 horas com o segundo anticorpo primário, seguida por outra incubação de 20 minutos com o Rabbit/Mouse (LINK) (Kit Envision™ G/2 System/AP). Após lavar com TBS 1X, o spot foi incubado por 30 minutos com AP Enzyme (Enhancer). O segundo anticorpo foi revelado pelo cromógeno *Permanent Red*. Para finalizar, os spots foram corados com hematoxilina por 2 minutos e aderidos às lâminas com meio de montagem aquoso e lamínula.

As lâminas foram examinadas no microscópio de luz branca, BX61 – Olympus, (Tóquio, Japão) acoplado a câmera digital de alta resolução SC100 - Olympus, (Tóquio, Japão). CTCs foram caracterizadas de acordo com os seguintes critérios: tamanho nuclear igual ou maior que 16µm, irregularidade do contorno nuclear, presença de citoplasma visível, alta proporção núcleo-citoplasma (>0,8). Quando faltar qualquer dos critérios descritos, as células foram classificadas como atípicas. Os resultados foram

representados em número de CTCs por mL de sangue, conforme análise estatística realizada por KREBS et al. (2012), contando CTCs em 4 spots da membrana ou mais.

Após a análise morfológica, os valores das CTCs foram somados e a média foi calculada. Desta forma, tivemos os cálculos de CTCs em 1 mL de sangue. Ainda, foi incluída na análise a presença e ausência de microêmbolos tumorais circulantes (MEs).

Tabela 2 - Descrição detalhada dos anticorpos testados nas CTCs.

Anticorpo	Diluição	Clone	Código	Fabricante	Linhagem para Controle positivo
TGFβRI	1/100	Policlonal	CSB-PA061850	Cusabio	A549
CD45	1/100	Policlonal	CSB-PA010546	Cusabio	Leucócitos
ERCC1	1/100	Policlonal	CSB-PA007769GA01HU	Cusabio	A549
βGAL	1/40	Policlonal	CSB-PA002495GA01HU	Cusabio	A549
TIMP1	1/30	Policlonal	CSB-PA827458	Cusabio	MCF7
MMP9	1/100	Policlonal	CSB-PA014679GA01HU	Cusabio	U87
TYMS	1/230	3A1, monoclonal	WH0007298M1	Sigma-Aldrich	Leucócitos
PD-L1	1/300	[28-8], monoclonal	Ab205921	Abcam	HEK293

3.5 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* CROMOGÊNICA

Para realização do CISH e análise de expressão de RNAm de TYMS utilizamos o Kit ACD (ACD RNAscope® in situ Hybridization (ISH) 2.5 HD Detection Kit (Brown). As membranas foram hidratadas com TBS 1X por 5 minutos em T.A. e depois com formaldeído 1% por 5 minutos em T.A. As

lavagens posteriores entre os passos foram realizadas com água destilada (2 lavagens). As membranas com CTCs foram incubadas em *RNA Scope Hydrogen Peroxide* (ACD) por 10 minutos em T.A. e no escuro. Lavagem. Após lavagem, as membranas foram incubadas com pepsina citológica (ZytoVision) por 10 minutos em T.A. As membranas foram lavadas em etanol 70%, 90% e 100%, por um minuto cada. Depois de secas, as membranas foram incubadas com a sonda de RNAm de Timidilato Sintase (TYMS; ACD) no hibridizador a 40°C (úmido) por 2 horas. A partir deste passo as lavagens foram com o Wash Buffer 1X (ACD) (2 lavagens cada passo). As membranas foram incubadas com Amplificadores (Amp) de 1 a 6 (ACD), de acordo com o tempo e temperatura recomendados pelo fabricante. As membranas foram incubadas com a mistura de volumes iguais de BROWN-A e BROWN-B (ACD) por 10 min em T.A. Após duas lavagens com água destilada, as membranas foram incubadas em hematoxilina 50% por 2 min em T.A. Após lavadas, as lâminas foram aderidas com meio de montagem aquoso e lamínula. A leitura das membranas foi realizada em microscópio de campo claro.

3.6 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA DAS CTCS

A extração de DNA e de RNA foi realizada utilizando o AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Sucintamente, 4 spots da membrana sem formol foram cortados em pequenos fragmentos (aproximadamente 2mm²) em microtubos de 1,5 mL e as células foram lisadas utilizando o tampão RLT Plus (Qiagen) e vortexadas por 1 minuto. Posteriormente, os passos foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante.

3.7 DROPLET DIGITAL PCR

Este sistema detecta e realiza contagens de cópias raras de DNA por meio do sistema QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR™) da empresa Bio-Rad, por meio de particionamento por gotas (emulsão) a reação de PCR.

Para realização da PCR digital, seguimos as instruções do fabricante. O mix da reação se consistiu em: 10 µL de ddPCR Supermix for Probes (No dUTP), 1 µL de *primer*+sonda e 11 µL de DNA + água ultrapura (DNA a 30 ng/ µL).

Na etapa de fazer as gotas nos DG8 *Cartridges*, primeiro as amostras (20 µL) foram pipetadas e depois o *Droplet Generation Oil* (70 µL) foi pipetado. O DG8 Gasket foi encaixado para formação de gotas no QX200™ Droplet Generator. O material de pré PCR foi transferido com as gotas (emulsão) já formadas, delicadamente na placa e esta foi selada com PCR

Plate Heat Seal, foil, pierceable no PX1™ PCR Plate Sealer. A placa foi inserida no termociclador da BioRad, com a seguinte ciclagem: 1) 95°C por 10 min/Rampa de 2°C/s; 2) 94°C por 30 s/ Rampa de 2°C/s; 3) 61°C por 1 min; 4) GOTO step 2, 40x; 5) 98°C por 10 min/Rampa de 2°C/s; 6) 4°C ∞/Rampa de 2°C/s. As placas foram lidas no equipamento QX200 *Droplet Digital PCR* (ddPCR™) da empresa Bio-Rad. Os resultados foram analisados no *software* QuantaSoft™.

Para análise de mutação em CTCs isoladas, foram utilizados os seguintes kits: ddPCR™ *KRAS G12/G13 Screening Kit* (ref: 1863506), ddPCR™ *KRAS Q61 Screening Kit* (ref: 12001626) e ddPCR™ *NRAS Q61 Screening Kit* (ref: 12001006).

3.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Recentemente nosso grupo adquiriu o citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Fisher Scientific), que é capaz de detectar eventos raros, pois adquire eventos suficientes, mesmo com amostras muito diluídas, por meio de focalização acústica e hidrodinâmica. Este equipamento foi adquirido para caracterizarmos melhor as amostras dos pacientes. Participei ativamente de todas as etapas de treinamento e padronização dos protocolos.

Testamos diversas condições para preparo das amostras (camada leucocitária a partir de sangue fresco, sangue total congelado a -80°C *overnight*, sangue total lisado e marcado, sangue total marcado e lisado,

entre outros). A melhor condição foi a de marcar o sangue total com os anticorpos de interesse, lisar as hemácias e fixar a amostra. Foi determinado que a amostra poderia ser lida no mesmo dia ou no máximo no dia seguinte (sangue total homogeneizando entre 2 – 8°C), com o seguinte protocolo e os seguintes marcadores:

Distribuir 200 µL de sangue total em 4 microtubos de 2 mL (50 µL em cada um); Incubar cada tubo com 1 µL de cada anticorpo, conforme painéis abaixo, durante 15 minutos em T.A. e no escuro; Quando necessário (sem fluoróforo conjugado), incubar o anticorpo primário separadamente durante 15 minutos, depois anticorpo secundário durante 15 minutos em T.A. e no escuro; Incubar com 450 µL de tampão de lise BD (BD FACSTTM *Lysing Solution*) previamente preparado em 1X de concentração (durante 15 minutos em T.A. e no escuro); Centrifugar por 5 minutos a 250 xg. Remover o sobrenadante; Ressuspender em 1 mL de PBS 1X. Repetir a centrifugação e remover o sobrenadante; Ressuspender em 500 µL de PBS+albumina sérica bovina (BSA) a 0,2%. Ler no citômetro.

Os painéis que utilizamos e seus respectivos canais podem ser vistos nos **Quadros 1A, 1B e 1C**:

Tabela 3 - Painel 1, utilizado para identificar e quantificar as populações de células T.

Anticorpo	Alvo	Fluoróforo	Canal
CD25	Células T Reg (high + T CD4)	eFluor 450	VL1
CD4	Linfócitos T CD4	eFluor 506	VL2
CK18/CK19	CTCs	FITC/Alexa Fluor 488	BL1
CD20	Linfócitos B	PE	BL2
CD3	Linfócitos T	PE-Cy5.5	BL3
CD8	Linfócitos T CD8 e <i>natural killer</i> (baixo)	PE-Cy7	BL4

Tabela 4 - Painel 2, utilizado para identificar e quantificar as populações de CTCs, monócitos e macrófagos.

Anticorpo	Alvo	Fluoróforo	Canal
EGFR	CTCs	Secundário – Alexa Fluor 405	VL1
CK18/CK19	CTCs	FITC/Alexa Fluor 488	BL1
CD163	Monócitos/ Macrófagos	PE	BL2
CD11b	Monócitos, neutrófilos, <i>natural killer</i> , granulócitos e macrófagos	PE-Cy5.5	BL3
CD14	Macrófagos, neutrófilos, células dendríticas	PE-Cy7	BL4

Tabela 5 - Painel 3, utilizado para identificar e quantificar a população de linfócitos B e linfócitos T.

Anticorpo	Alvo	Fluoróforo	Canal
CD25	Células T REG (high + T CD4)	eFluor 450	VL1
CD4	Linfócitos T CD4	eFluor 506	VL2
CK18/CK19	CTCs	FITC/Alexa Fluor 488	BL1
CD20	Linfócitos B	PE	BL2
CD3	Linfócitos T	PE-Cy5.5	BL3
CD45R	Células B em todas as etapas de desenvolvimento, alguns subtipos de linfócitos T e <i>natural killer</i>	PE-Cy7	BL4

3.9 CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS E LINFÓCITOS

Dados laboratoriais, incluindo número total de neutrófilos, de linfócitos, contagem de plaquetas, marcadores tumorais, níveis de albumina e de proteína C reativa (PCR) foram obtidos nos mesmos momentos das coletas de CTCs. Estes parâmetros foram avaliados pelo laboratório Fleury que presta atendimento no A.C.Camargo Cancer Center. Avaliamos o valor prognóstico de NLR. De acordo com FORGET et al. (2017), níveis normais de NLR estão entre 0,78 – 3,53. Avaliamos também o valor prognóstico da PLR, com o ponto de corte de 124, de acordo com HUDZIK et al. (2015).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características dos pacientes foram demonstradas pelas frequências absolutas e relativas para variáveis qualitativas, e por valores de mediana, mínimo e máximo para variáveis quantitativas. As associações entre as variáveis qualitativas foram avaliadas pelos testes do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, como fosse adequado. A distribuição quantitativa das variáveis foi calculada pelo Teste U de Mann-Whitney (para 2 variáveis) ou Teste de Kruskal Wallis (para 3 ou mais variáveis). As curvas de sobrevida foram estimadas pelo estimador de Kaplan-Meier e a diferença entre as curvas foi avaliada pelo teste de *log-rank*. A sobrevida livre de recidiva foi avaliada a partir da data da coleta de CTC (*baseline*) até a primeira recidiva da doença, determinada por exames de imagem. Pacientes

que não apresentarem recidiva da doença foram censurados na data da última visita ao hospital. O nível de significância foi fixado para 5% em todos os testes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *IBM SPSS Statistics* versão 24.0 (IBM Corporation, Armonk, NY).

4 RESULTADOS

4.1 MÓDULO I, TODOS OS PACIENTES

4.1.1 Coleta de Amostras

Foram realizadas coletas em 90 pacientes com câncer de cólon antes do procedimento cirúrgico. No entanto, 21 foram excluídos (8 por portarem tumores metastáticos ao diagnóstico patológico, 9 por apresentarem ausência de neoplasia residual na cirurgia, dois pacientes por apresentarem adenoma e dois pacientes por portarem duas neoplasias primárias). Dos 69 pacientes, 51 apresentaram tumores do cólon estágios II-III. Em relação ao primeiro seguimento (2º momento), os momentos das coletas variaram de acordo com o estágio (para estágio I, de um a dois anos após a primeira coleta; para estágio II, sem quimioterapia adjuvante, coleta em 6 meses após a cirurgia; para estágios II e III coletamos pré-quimioterapia adjuvante), totalizaram-se 56 pacientes. Houve três perdas de seguimento e 6 recusas no primeiro seguimento. Quatro pacientes encontram-se no tempo de seguimento, aguardando a coleta. Em relação ao segundo seguimento (aproximadamente dentro de 6 meses após o fim do tratamento quimioterápico), realizamos coleta em 29 pacientes dos 40 que receberam quimioterapia adjuvante. Tivemos 4 perdas de seguimento e duas recusas no segundo seguimento. Cinco pacientes encontram-se no tempo de seguimento, aguardando a coleta. O detalhamento das coletas (primeiro

momento e dois seguimentos) pode ser melhor visualizado nas **Figuras 5 e 6**.

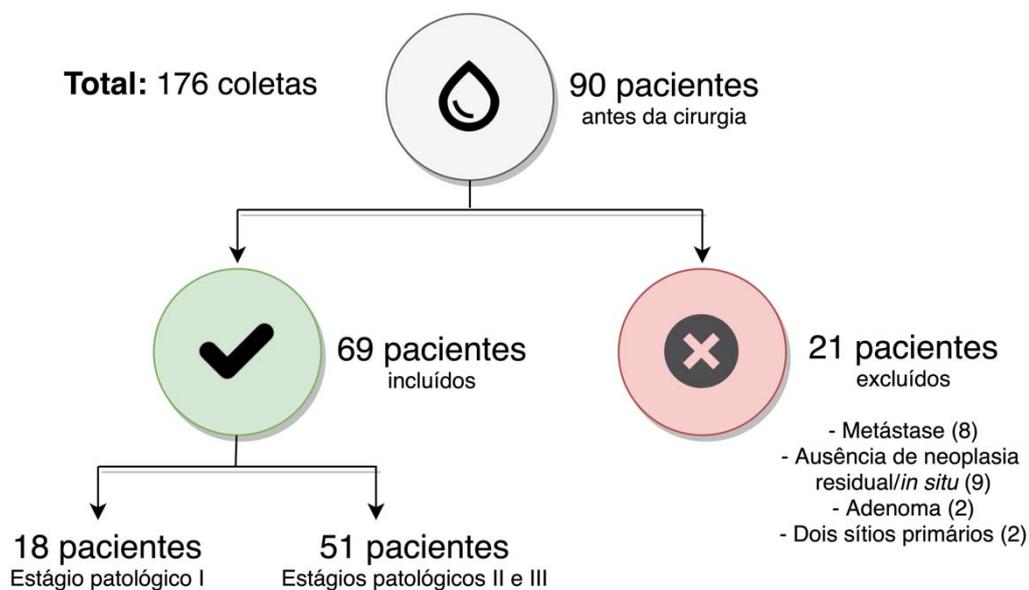


Figura 5 - Fluxograma demonstrando o número total de coletas. Foram 176 coletas de pacientes com câncer de cólon, sendo 90 coletas pré-cirúrgicas (primeira coleta; 21 exclusões), 56 coletas de primeiro seguimento e 30 coletas, em 6 meses após o fim do tratamento adjuvante [segundo seguimento; pacientes com estadiamentos patológicos II (alto risco) e III].

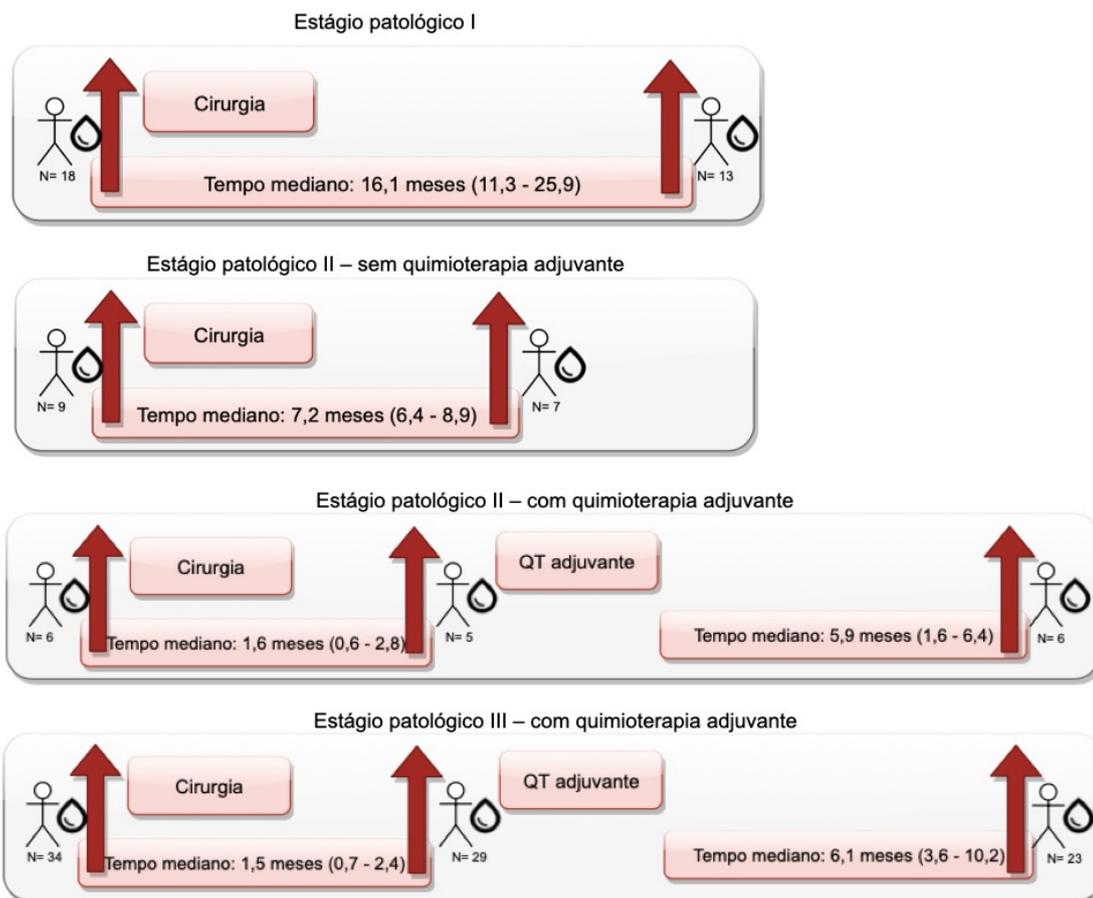


Figura 6 - Esquemas demonstrando o número total de coletas em cada grupo de estadiamento. Os resultados a seguir estão divididos em dois módulos: módulo 1, com a descrição de todos os pacientes incluídos no estudo (n= 69) e módulo 2, com a descrição dos pacientes com tumores de alto risco incluídos no estudo (II e III com tratamento adjuvante, n= 40).

Nota: No grupo de pacientes com estadiamento III, ocorreram dois casos de não indicação à adjuvância, devido à idade avançada dos pacientes. No entanto, coletamos com um tempo de seguimento um pouco maior, e por isto os casos não foram incluídos na mediana. Os mesmos foram avaliados separadamente.

4.1.2 Características Demográficas, Clínicas e Patológicas

Amostras de sangue foram coletadas de 69 pacientes com diagnóstico de câncer de cólon não metastático antes do tratamento cirúrgico no período de 07/2016 a 09/2019. Um banco de dados com as características clínico-patológicas dos indivíduos participantes da pesquisa para análise foi construído.

As características clínico-patológicas dos pacientes estão dispostas na **Tabela 6**. Dos 69 pacientes incluídos, 36 (52,2%) eram homens e 33 (47,8%) mulheres, com a idade mediana de 61 anos (19 – 87). As contagens de CTCs de todos os pacientes na primeira coleta foram realizadas.

No primeiro seguimento, foram coletadas amostras de sangue de 54 pacientes e as contagens de CTCs de todos os pacientes foram analisadas. No terceiro momento, foram coletadas amostras de sangue 30 pacientes e foram realizadas as contagens de CTCs de todos os pacientes (um dos casos do segundo seguimento não obteve a indicação de quimioterapia adjuvante, devido à idade avançada). O número mediano dos níveis séricos do CEA (antígeno carcinoembriônico) na primeira coleta foi de 2,5 ng/mL (0,1 – 158 ng/mL). Os níveis de CEA estavam disponíveis nos prontuários de 65 dos 69 pacientes e aumentaram proporcionalmente de acordo com o estadiamento patológico. No estágio I, a mediana foi de 1,3 ng/mL (0,5 – 4,4 ng/mL); no estágio II, a mediana foi de 1,7 ng/mL (0,1 – 62,7 ng/mL); no estágio III, a mediana foi de 3,4 ng/mL (0,2 – 158 ng/mL) ($p= 0,007$). Após a análise por comparação múltipla, foi detectada a diferença entre os grupos I e III ($p= 0,007$).

O acometimento primário tumoral foi predominantemente no cólon descendente (66,7%), seguido de cólon ascendente (33,3%). Todos os tumores foram classificados histologicamente como adenocarcinoma.

Em relação ao estadiamento patológico, os pacientes incluídos em sua maioria apresentaram tumores classificados como estágio II ou III (73,9%). Em relação ao pT e pN, a maioria dos tumores apresentaram-se como pT3 (53,6%) e linfonodos positivos (52,2%). Pacientes com estágio pT3+pT4 apresentaram SLR inferior ($p= 0,03$), quando comparados aos pacientes com estágio pT1+pT2 (SLR não calculada). Pacientes com acometimento linfonodal também tiveram uma SLR inferior quando comparados àqueles com ausência de linfonodos positivos (tempo médio de SLR: 28,7 *versus* 36,3 meses; $p= 0,01$).

O *status* de mutação dos genes *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* no tumor estava disponível nos prontuários eletrônicos de 53 dos 69 pacientes. Destes, 24 (45,3%) tinham algum dos genes mutantes. Os laudos de identificação de MSI no tumor primário estavam disponíveis em 61 dos 69 pacientes. Destes, a maioria dos tumores ($n= 55$; 90,2%) apresentou um perfil de microssatélite estável. Coletamos dados sobre o tabagismo dos pacientes e a maioria (56,5%) negou o uso de tabaco.

Não foram encontradas células com características morfológicas de malignidade nas amostras de indivíduos saudáveis.

Tabela 6 - Características clínico-patológicas dos pacientes envolvidos neste estudo (n= 69). Estadiamento TNM de acordo com AJCC UICC 2017.

Variáveis (n)	Nº	%
Número total de pacientes	69	100
Idade ao entrar no estudo, em anos (69)		
Mediana	61	
Variação (mín – máx)	19 - 87	
Gênero (69)		
Masculino	36	52,2
Feminino	33	47,8
Grau histológico (67)		
Adenocarcinoma mucinoso	5	7,5
Adenocarcinoma bem diferenciado	4	6
Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	57	85
Adenocarcinoma pouco diferenciado	1	1,5
Sítio primário (69)		
Cólon ascendente	23	33,3
Cólon descendente	46	66,7
Status RAS (53)		
Selvagem	29	54,7
Mutante	24	45,3
Tamanho do tumor (pT) (69)		
1	4	5,8
2	20	29
3	37	53,6
4a/4b	8	11,6
Acometimento Linfonodal (pN) (69)		
N0	33	47,8
N+	36	52,2
Estadiamento patológico (69)		
I	18	26,1
IIA/IIB	15	21,7
IIIA/IIIB/IIIC	36	52,2
MMR (<i>mismatch repair</i>) (61)		
Microssatélite estável	55	90,2
MLH-1 e PMS-2	5	8,2
MSH-2 e MSH-6	1	1,6

Cont/Tabela 6

Variáveis (n)	Nº	%
Estratégia Terapêutica (69)		
Adjuvância	40	58
Seguimento sem tratamento	29	42
Níveis medianos de CEA (ng/mL)		
1ª coleta (avaliados em 65/69)	2,5 (0,1 – 158)	
1ª seguimento (avaliados em 37/56)	1,6 (0,6 – 33)	
2ª seguimento (avaliados em 27/30)	2,4 (0 – 19,5)	
Nº mediano de CTCs/mL		
1ª coleta (avaliados em 69/69)	2,5 (0 – 11,7)	
1ª seguimento (avaliados em 56/56)	1,7 (0 – 8,6)	
2ª seguimento (avaliados em 30/30)	1,4 (0,1 – 10)	
Microêmbolos Tumorais Circulantes		
1ª coleta (avaliados em 69/69)		
Sim	13	18,8
Não	56	81,2
1ª seguimento (avaliados em 56/56)		
Sim	8	14,3
Não	48	85,7
2ª seguimento (avaliados em 30/30)		
Sim	3	10
Não	27	90

4.1.3 Contagem de CTCs e Microêmbolos

As células foram classificadas como CTCs quando apresentassem todos os critérios morfológicos (KREBS et al. 2012; vide MATERIAIS E MÉTODOS) e de coloração (**Figura 7**). Foram consideradas para contagem CTCs isoladas e em forma de microêmbolos (MEs: três ou mais CTCs juntas). Faltando qualquer critério, a célula foi classificada como atípica. Para contagem, analisamos quatro *spots* ou mais de cada paciente, com dupla-marcação por imunocitoquímica.

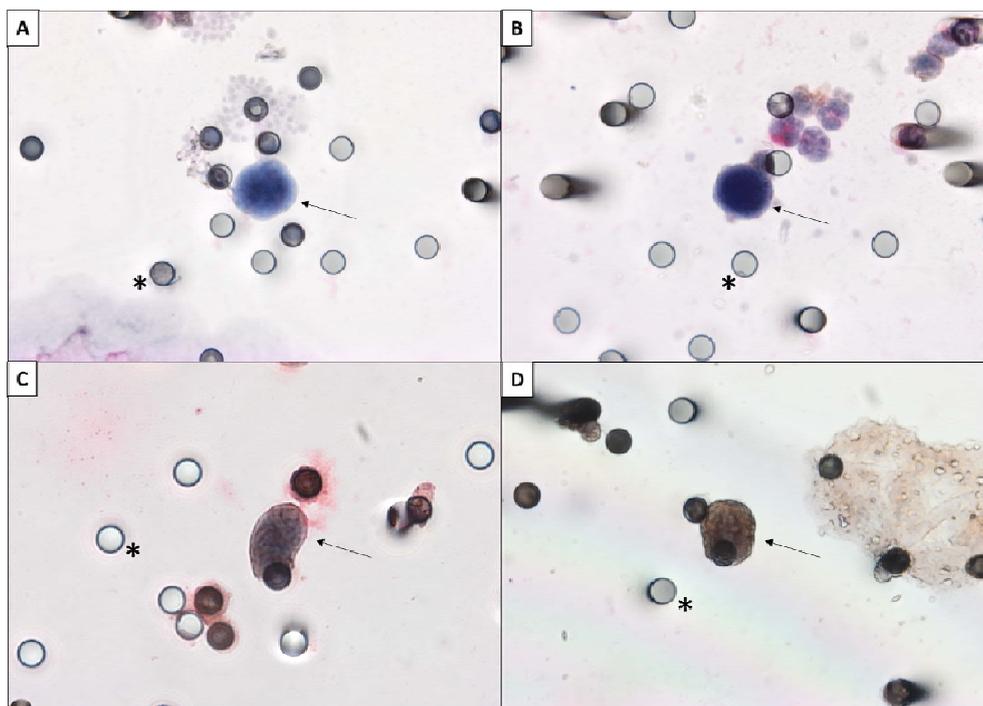


Figura 7 - Fotomicrografias de Células Tumorais Circulantes (CTCs) isoladas do sangue de pacientes com câncer de cólon. A seta fina representa uma CTC isolada e os asteriscos representam poros da membrana de policarbonato de 8 μm de diâmetro. **A)** CTC negativa. **B)** CTC com marcação fraca, na membrana celular, para TGF β 1 (DAB+) e leucócitos positivos para CD45 (Permanente Red+). **C)** CTC positiva, marcação citoplasmática para MMP9. **D)** CTC positiva, marcação nuclear para ERCC1. Todas as fotomicrografias foram tiradas em aumento de 40x.

No grupo de pacientes estudados, incluindo os três estadiamentos patológicos, foi encontrada uma mediana de 2,5 CTCs/mL (0 – 11,7) na primeira coleta, 1,7 CTCs/mL (0 – 8,7) no primeiro seguimento e 1,4 CTCs/mL (0 – 10) no segundo seguimento. A taxa de detecção de CTCs em todos os casos foi de 94,2% na primeira coleta, de 94,6% no primeiro seguimento e de 100% no segundo seguimento. Foi observada uma taxa de detecção de CTCs similar entre os grupos de estadiamento (I = 88,9%; II = 100%; III = 94,4%; $p= 0,39$), bem como na mediana de CTCs/mL (2,3; 3,0; 2,4, respectivamente) na primeira coleta. Em relação à média, houve um aumento crescente proporcional ao estadiamento, (2,8; 3,1; 3,4, respectivamente), porém sem significância estatística ($p= 0,76$; Teste de Kruskal-Wallis).

No primeiro e no segundo seguimentos, também não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação às contagens de CTCs entre os grupos de estadiamento. Dados detalhados de CTCs e microêmbolos (**Figura 8**) em cada grupo de estadiamento em todas as coletas estão disponíveis nas **Tabelas 7 e 8**. Na **Figura 9** é possível visualizar graficamente a mediana de CTCs encontrada em cada grupo de estadiamento nos três momentos estudados.

Quando a mediana de CTCs (primeira coleta) foi analisada, agrupando os casos de estadiamento pT1+pT2 e pT3+pT4, foi possível observar que a mediana foi maior no segundo grupo (pT3+pT4: 2,5/mL) comparado ao primeiro grupo (pT1+pT2: 2,2/mL), $p= 0,15$ (**Figura 10A**; Teste U de Mann-Whitney).

Foi encontrado um maior nível de CTCs na primeira coleta nos pacientes tabagistas/ex-tabagistas (mediana: 3,6 CTCs/mL) em relação aos não tabagistas (mediana: 2,2 CTCs/mL), $p= 0,05$ (**Figura 10B**; Teste U de Mann-Whitney). Resultado estatisticamente significativo também foi observado no primeiro seguimento em relação à condição de tabagismo (mediana: 3 CTCs/mL) quando comparado aos não tabagistas (mediana: 1,3 CTCs/mL), $p= 0,04$ (**Figura 1C**; Teste U de Mann-Whitney).

Em relação ao seguimento dos pacientes, 8 dos 69 (11,6%) apresentaram recidiva da doença ou recidiva em uma média de 33,7 meses (Intervalo de Confiança (IC) de 95%: 31,3 – 36 meses) (**Figura 11**). A mediana do tempo de SLR não foi atingida. Não foi observado nenhum óbito até o momento desta análise (outubro/2019). O tempo mediano de seguimento foi de 22,1 meses (IC 95%: 19 – 25,2 meses).

Foi realizada uma análise de sensibilidade e especificidade utilizando a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para determinação do melhor ponto de corte para as CTCs nos três momentos analisados. Após esta análise, foi escolhido para a primeira coleta o ponto de corte de 0,6 CTC/mL, para o primeiro seguimento o ponto de corte de 0,8 CTC/mL e para o segundo seguimento o ponto de corte de 2 CTCs/mL. Pacientes com $\leq 0,6$ CTC/mL na primeira coleta tiveram uma tendência a SLR superior aos que tinham $>0,6$ CTC/mL (tempo de SLR não calculado; $p= 0,3$; **Figura 12A**). Resultado similar foi observado no primeiro seguimento, pacientes com $\leq 0,8$ CTC/mL tiveram uma tendência a SLR superior aos que tinham $>0,8$ CTC/mL (tempo de SLR não calculado; $p= 0,17$; **Figura 12B**). Já no

segundo seguimento, pacientes com $\leq 0,4$ CTCs tiveram uma tendência a SLR inferior aos que tinham $>0,4$ CTCs/mL (tempo médio de SLR: 23,8 meses versus 20,7 meses; $p= 0,31$; **Figura 12C**).

A presença de MEs foi observada em 13/69 (18,8%) das amostras analisadas na primeira coleta, em 8/56 (14,3%) das amostras analisadas no primeiro seguimento e em 3/30 (10%) das amostras analisadas no segundo seguimento. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à distribuição (%) de MEs e estadiamento patológico na primeira coleta. Os 13 casos com MEs na primeira coleta ficaram distribuídos da seguinte maneira: 46,2% enquadravam-se no estágio I, 23,1% o estágio II e 30,8% no estágio III ($p= 0,14$). Dos 8 casos com MEs após a cirurgia, 12,5% enquadravam-se no estágio I, 25% enquadravam-se no estágio II e 62,5% enquadravam-se no estágio III ($p= 0,74$). Dos dois casos com ME na última coleta, um paciente (33,3%) enquadrava-se no estágio II e dois pacientes (66,7%) se enquadravam no estágio III. Analisamos a SLR dos pacientes de acordo com a presença e ausência de MEs nos três momentos avaliados. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos momentos: primeira coleta ($p= 0,68$), primeiro seguimento ($p= 0,89$) e segundo seguimento ($p= 0,53$) (**Figuras 12D, 12E e 12F**).

Tabela 7 - Dados referentes à taxa de detecção de CTCs, mediana, média em cada grupo de estadiamento em todos os momentos do estudo (n= 69).

Coleta	Estágio (n)	Taxa de detecção de CTCs (%)	Valor de p ^a	Mediana de CTCs/mL (mín-máx)	Média de CTCs/mL (±dp)	Valor de p ^b
Primeira coleta	I (18)	88,9	0,39	2,3 (0-8,7)	2,8 (±2,29)	0,76
	IIA/IIB (15)	100		3,0 (0,2-7,2)	3,1 (±1,85)	
	IIIA/IIIB/IIIC (36)	94,4		2,4 (0-11,7)	3,4 (±2,79)	
	Total (69)	94,2		2,5 (0-11,7)	3,2 (±2,47)	
Primeiro seguimento	I (13)	92,3	0,64	1,33 (0-8,6)	2,6 (±2,56)	0,73
	IIA/IIB (12)	100		2,33 (1-7,3)	3 (±2,21)	
	IIIA/IIIB/IIIC (31)	93,5		2 (0-6,6)	2,5 (±1,98)	
	Total (56)	94,6		1,6 (0-8,6)	2,6 (±2,1)	
Segundo seguimento	IIA/IIB (6)	100	>0,99	1,1 (0,5-3,8)	1,8 (±1,42)	0,87
	IIIA/IIIB/IIIC (24)	100		1,6 (0,1-10)	2,3 (±2,4)	
	Total (30)	100		1,4 (0,1-10)	2,2 (±2,3)	

^a Teste de qui-quadrado; ^b Teste de Kruskal Wallis.

Tabela 8 - Dados sobre microêmbolos em cada grupo de estadiamento em todos os momentos do estudo (n= 69).

Coleta	Estágio (n)	Nº de casos com presença de microêmbolos	Nº de microêmbolos	Nº de CTCs no maior microêmbolo	Nº total de CTCs em microêmbolos
Primeira coleta	I (18)	6	9	14	46
	IIA/IIB (15)	3	3	17	27
	IIIA/IIIB/IIIC (36)	4	4	17	31
	Total (69)	13	16	48	104
Primeiro seguimento	I (13)	1	1	3	3
	IIA/IIB (12)	2	2	5	8
	IIIA/IIIB/IIIC (31)	5	8	12	39
	Total (56)	8	11	20	50
Segundo seguimento	IIA/IIB (6)	1	1	3	3
	IIIA/IIIB/IIIC (24)	2	3	8	18
	Total (30)	3	4	11	21

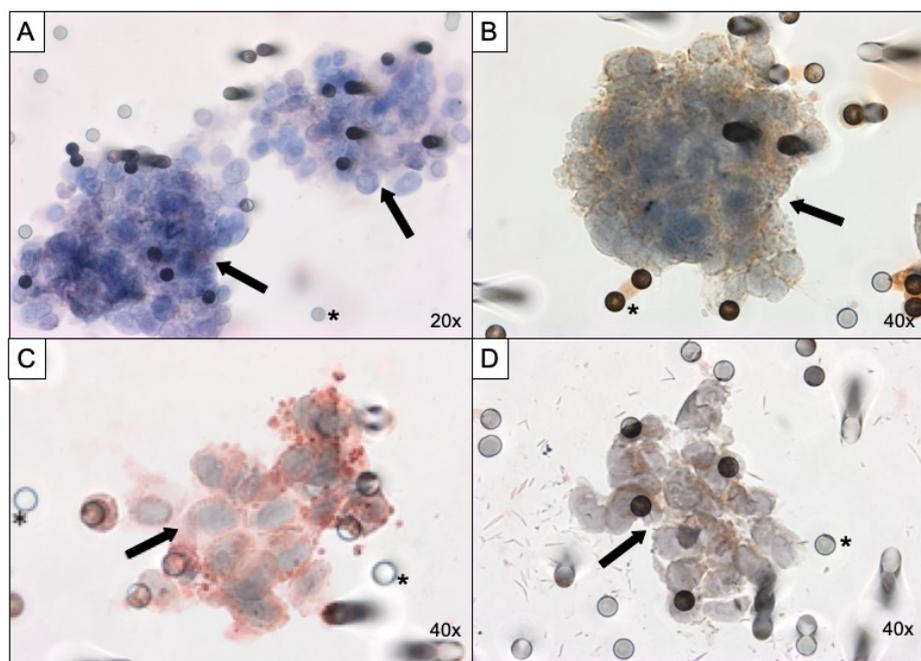


Figura 8 - Fotomicrografias de Microêmbolos (MEs) isolados do sangue de pacientes com câncer de cólon. **A)** ME negativo. **B)** ME positivo para TGF β RI (DAB+). **C)** ME positivo para β -galactosidase (Permanent Red+). **D)** ME positivo para MMP9 (DAB+). As setas espessas representam MEs e os asteriscos representam poros da membrana de policarbonato de 8 μ m de diâmetro.

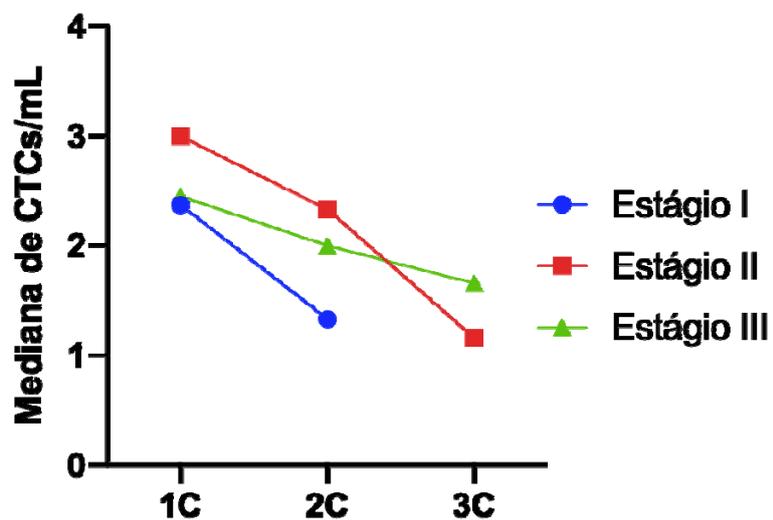


Figura 9 - Representação gráfica da mediana de CTCs encontrada em cada grupo de estadiamento nos três momentos estudados.

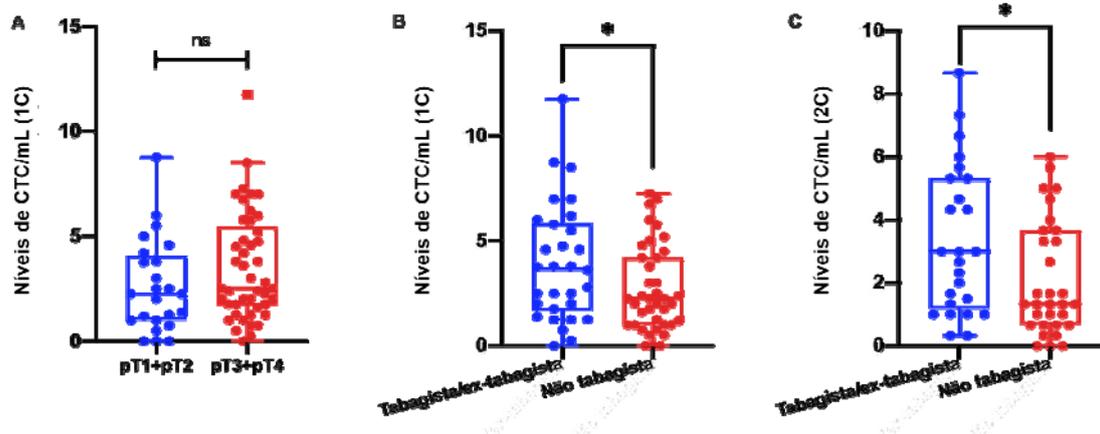


Figura 10 - Diagramas de caixa demonstrando a distribuição de CTCs de acordo com os grupos estabelecidos. **A)** Mediana de CTCs (primeira coleta) de acordo com o estadiamento T patológico agrupado (pT1+pT2 *versus* pT3+pT4; $p = 0,15$; Teste U de Mann-Whitney). **B)** Mediana de CTCs (primeira coleta) de acordo com a condição de tabagismo (tabagista/ex-tabagista *versus* não tabagista; $p = 0,05$; Teste U de Mann-Whitney). **C)** Mediana de CTCs (segunda coleta) de acordo com a condição de tabagismo (tabagista/ex-tabagista *versus* não tabagista; $p = 0,04$; Teste U de Mann-Whitney).

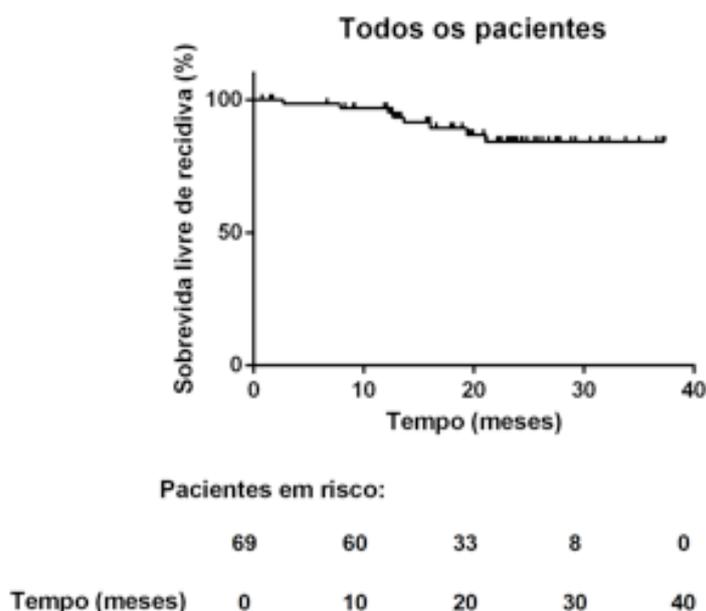
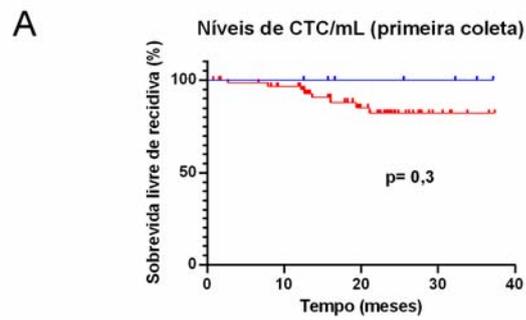
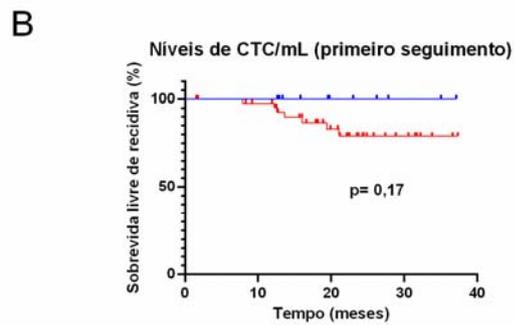


Figura 11 - Gráfico de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos 69 casos incluídos no estudo. Média de tempo: 23,7 meses (Intervalo de Confiança (IC) de 95%: 21,2 – 26,1 meses).



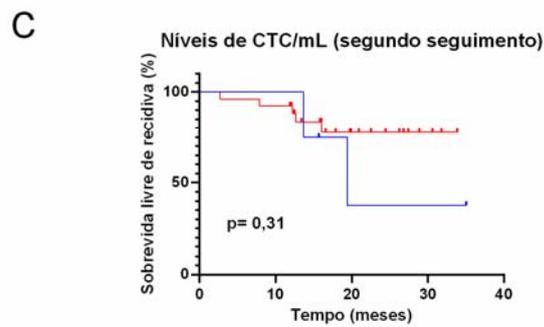
Pacientes em risco:

CTC $\leq 0,6$ /mL	11	11	6	3	0
CTC $> 0,6$ /mL	45	41	23	8	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40



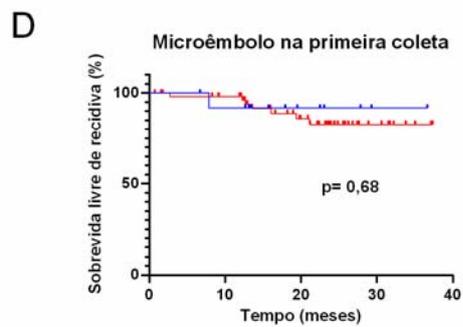
Pacientes em risco:

CTC $\leq 0,8$ /mL	11	11	6	3	0
CTC $> 0,8$ /mL	45	41	23	8	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40



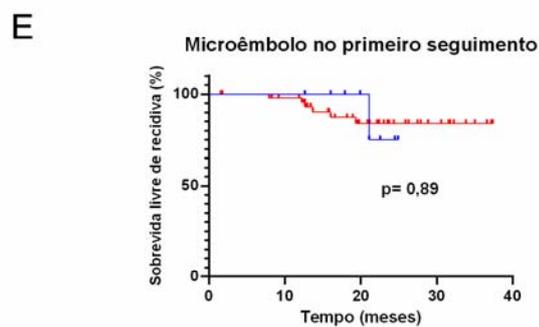
Pacientes em risco:

CTC $\leq 0,4$ /mL	3	2	1	0	0
CTC $> 0,4$ /mL	27	26	10	4	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40



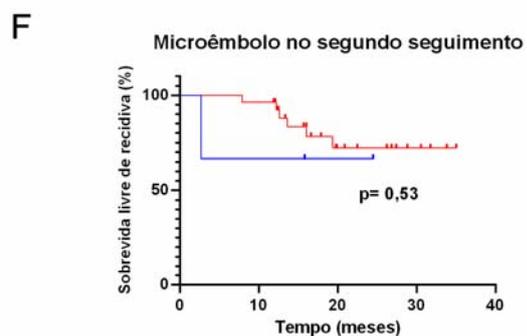
Pacientes em risco:

Presença de ME	3	2	1	0	0
Ausência de ME	27	26	10	4	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40



Pacientes em risco:

Presença de ME	3	2	1	0	0
Ausência de ME	27	26	10	4	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40



Pacientes em risco:

Presença de ME	3	2	1	0	0
Ausência de ME	27	26	10	4	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40

Figura 12 - Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos pacientes de acordo com a quantificação de CTCs. **(A-C)** e presença ou ausência de MEs **(D-F)**. **A)** SLR em relação à primeira coleta de acordo com o número de CTCs (\leq e $>0,6$; $p= 0,3$). **B)** SLR em relação ao primeiro seguimento de acordo com o número de CTCs (\leq e $>0,8$; $p= 0,17$). **C)** SLR em relação ao segundo seguimento de acordo com o número de CTCs (\leq e $>0,4$; $p= 0,31$). **D)** SLR em relação à primeira coleta de acordo com presença e ausência de MEs ($p= 0,68$). **E)** SLR em relação ao primeiro seguimento de acordo com presença e ausência de MEs ($p= 0,89$). **F)** SLR em relação ao segundo seguimento de acordo com presença e ausência de MEs ($p= 0,53$).

4.1.4 Correlação entre os níveis de CTCs e de CEA

Analisamos o coeficiente de correlação entre os níveis de CTCs e CEA, em 65 casos na primeira coleta, em 37 casos no primeiro seguimento e em 27 casos no segundo seguimento. No entanto, não observamos correlação entre os níveis destes biomarcadores quando analisados em pacientes com todos os estágios da doença (**Figura 13**). Na **Figura 14** é possível observar a oscilação de CTCs, CEA e CA19.9 nos casos que apresentaram recidiva da doença, assim como a descrição dos marcadores encontrados em cada momento.

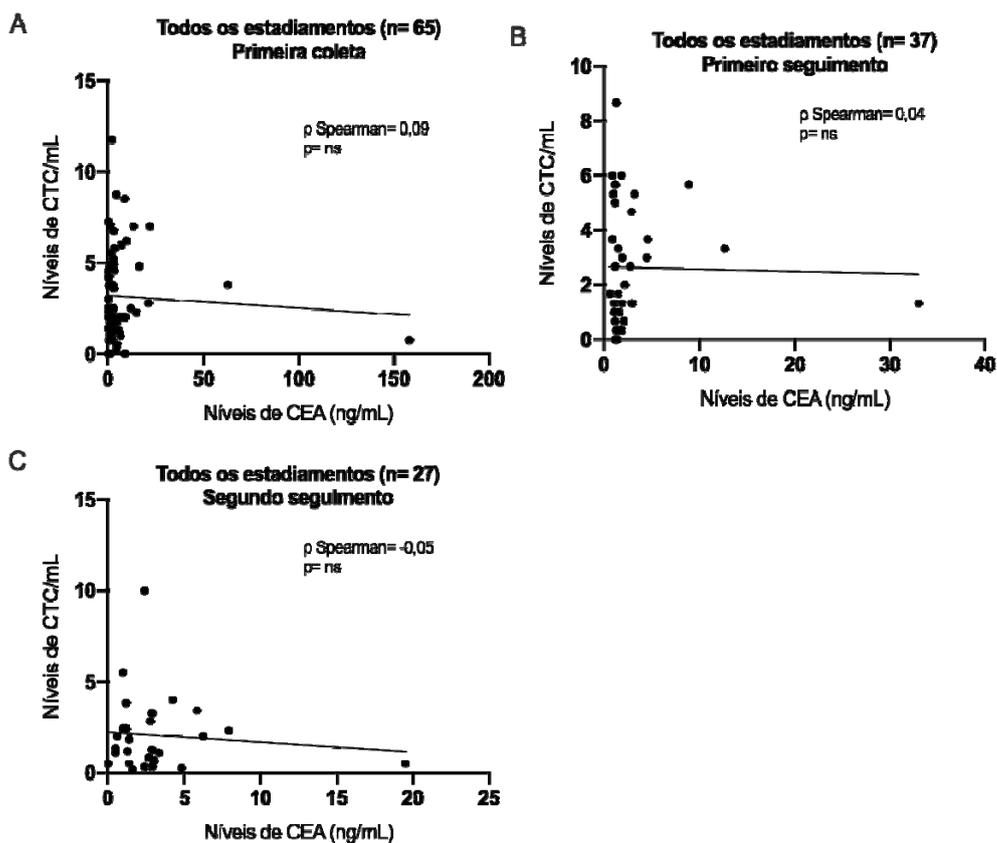


Figura 13 - Gráficos representando o coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA de todos os pacientes nos três momentos analisados. **A)** Coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA (níveis de CEA disponíveis em prontuários de 65 casos na primeira coleta; ρ de Spearman= 0,09, $p=$ 0,48). **B)** Coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA (níveis de CEA disponíveis em prontuários de 37 casos no primeiro seguimento; ρ de Spearman= 0,04, $p=$ 0,79). **C)** Coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA (níveis de CEA disponíveis em prontuários de 30 casos no segundo seguimento; ρ de Spearman= -0,05, $p=$ 0,77).

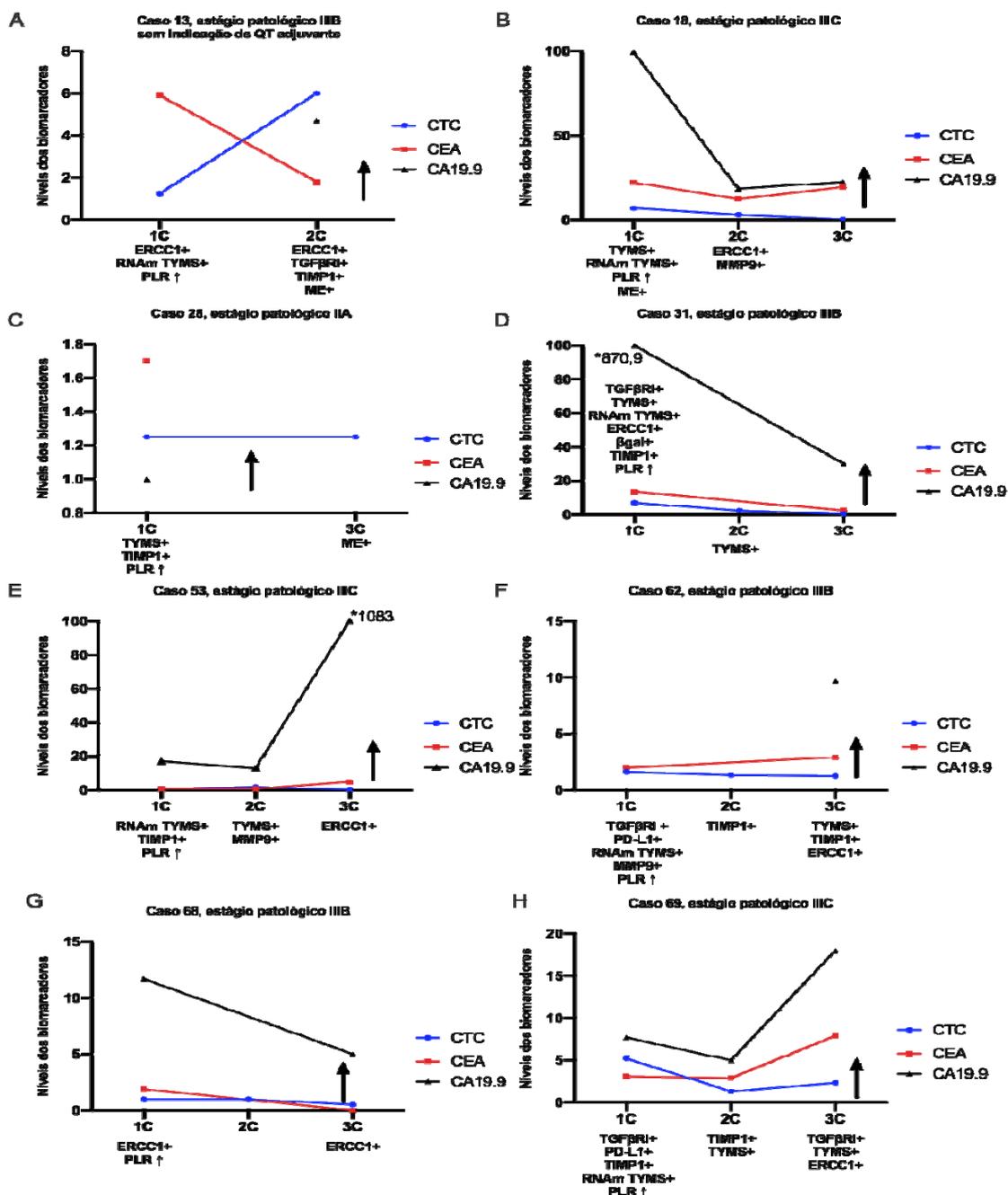


Figura 14 - Representação gráfica da oscilação dos níveis de Células Tumorais Circulantes (CTCs) e dos marcadores tumorais Antígeno Carcinoembrionário (CEA) e CA 19-9 ao longo do tempo nos 8 casos que apresentaram recidiva. As setas pretas demonstram o momento em que o paciente apresentou recidiva da doença. O eixo x refere-se ao momento analisado (fora de escala) e o eixo y refere-se aos níveis dos biomarcadores. Abaixo do eixo x encontram-se os marcadores encontrados em cada momento analisado nas CTCs e a PLR (*Platelet-to-lymphocyte ratio*).

4.1.5 Expressão Proteica nas CTCs

Avaliamos a expressão das proteínas por imunocitoquímica nas CTCs de 69 pacientes na primeira coleta, de 56 pacientes no primeiro seguimento e de 30 pacientes no segundo seguimento. O detalhamento dos anticorpos utilizados está disponível na **Tabela 2**. A **Figura 15** mostra reações de padronização (controle positivo) em linhagens celulares e a **Figura 16** mostra reações de controle negativo (linhagens celulares sabidamente negativas para cada marcador estudado de acordo com *Human Protein Atlas*).

O número de amostras testadas, positivas e negativas para cada marcador em todos os casos na primeira coleta está representado na **Figura 17**, no primeiro seguimento na **Figura 18** e no segundo seguimento na **Figura 19**.

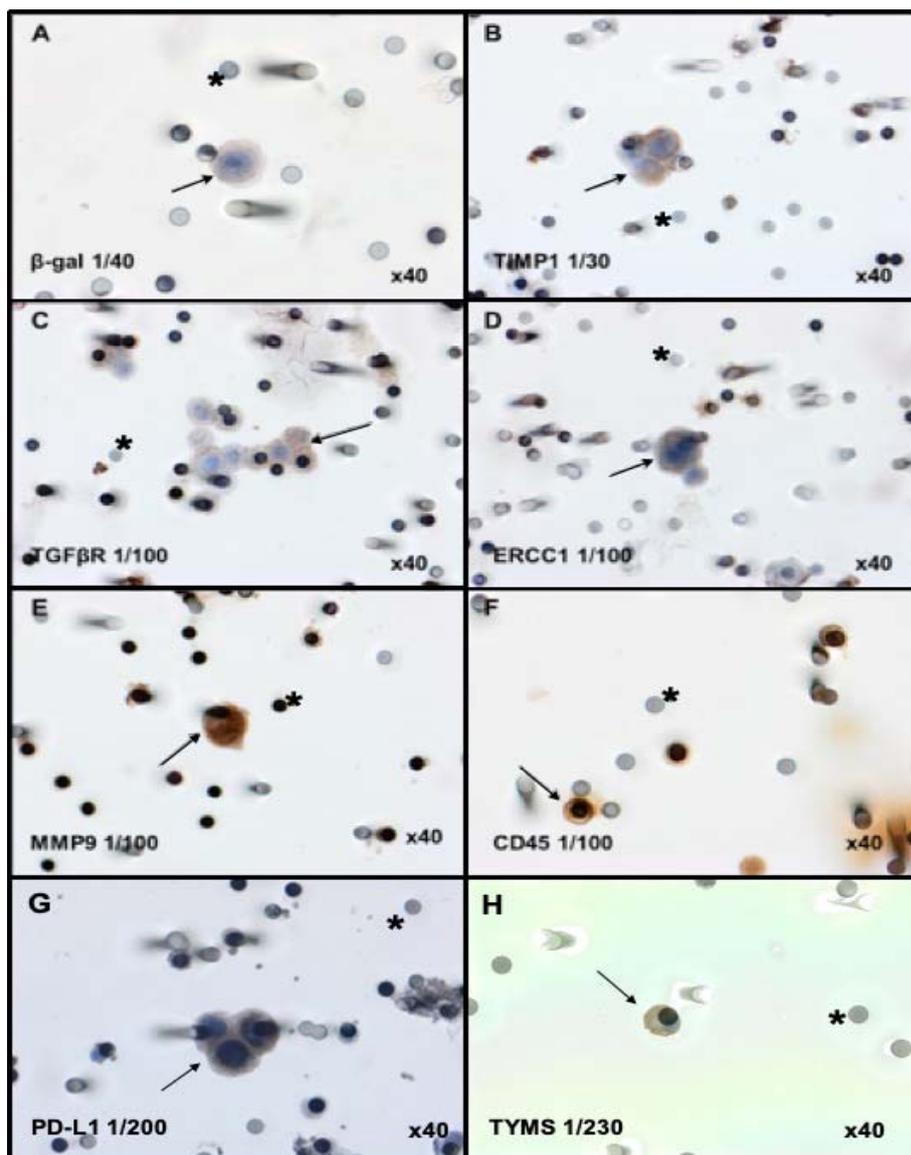


Figura 15 - Fotomicrografias de linhagens celulares pipetadas e homogeneizadas em sangue sadio para os testes de controle positivo das reações de imunocitoquímica. **A)** Expressão de β -galactosidase em células A549 (diluição 1/40). **B)** Expressão de TIMP1 em células MCF7 (diluição 1/30). **C)** Expressão de TGF β R1 em células A549 (diluição 1/100). **D)** Expressão de ERCC1 em células A549 (diluição 1/100). **E)** Expressão de MMP9 em células U87-MG (diluição 1/100). **F)** Expressão de CD45 em leucócitos de indivíduo saudável (diluição 1/100). **G)** Expressão de PD-L1 em células HEK293 (diluição 1/200). **H)** Expressão de TYMS em leucócitos de indivíduo saudável (diluição 1/230). Todas as fotomicrografias foram tiradas em aumento de 40x, com a câmera SC100, no microscópio BX61 - Olympus. A seta representa a célula de interesse marcada e os asteriscos representam poros da membrana de polycarbonato de 8 μ m de diâmetro.

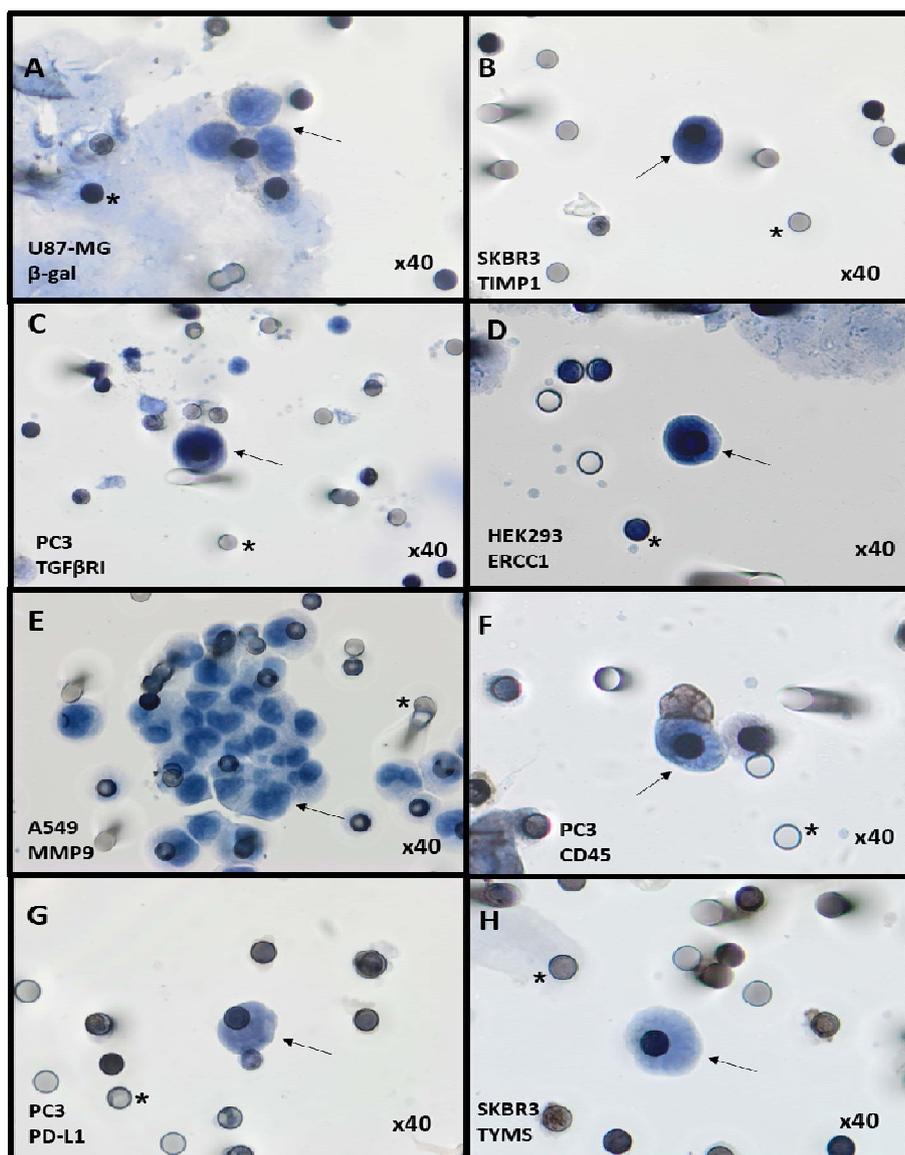


Figura 16 - Fotomicrografias de linhagens celulares pipetadas e homogeneizadas em sangue sadio para os testes de controle negativo das reações de imunocitoquímica. **A)** Expressão negativa de β -galactosidase em células U87-MG (diluição 1/40). **B)** Expressão negativa de TIMP1 em célula SKBR3 (diluição 1/30). **C)** Expressão negativa de TGF β R1 em célula PC3 (diluição 1/100). **D)** Expressão negativa de ERCC1 em célula HEK293 (diluição 1/100). **E)** Expressão negativa de MMP9 em células A549 (diluição 1/100). **F)** Expressão negativa de CD45 em célula PC3 (diluição 1/100). **G)** Expressão negativa de PD-L1 em célula PC3 (diluição 1/200). **H)** Expressão negativa de TYMS em célula SKBR3 (diluição 1/230). Todas as fotomicrografias foram tiradas em aumento de 40x, com a câmera SC100, no microscópio BX61 - Olympus. A seta representa a célula de interesse negativa para os marcadores e os asteriscos representam poros da membrana de policarbonato de 8 μ m de diâmetro.

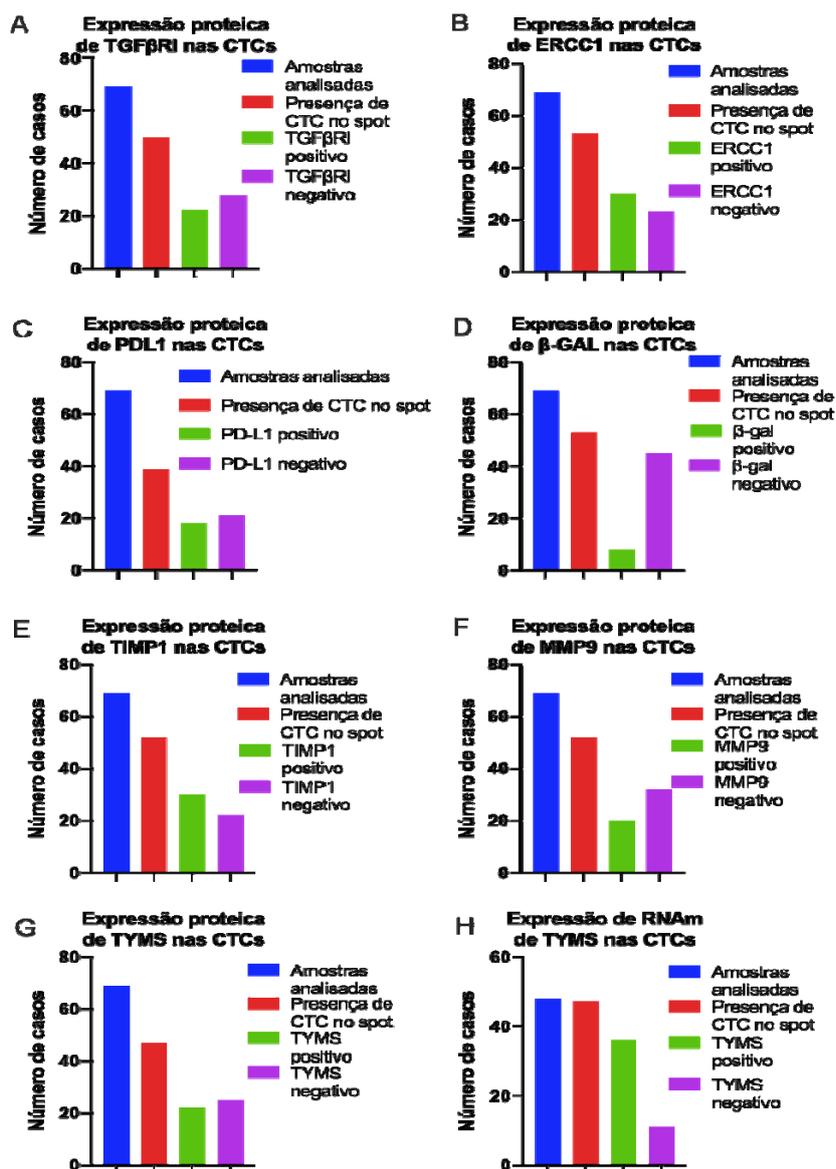


Figura 17 - Número de amostras de CTCs analisadas, positivas e negativas para cada marcador em todos os casos na primeira coleta, para: A) expressão proteica de TGFβRI (69 amostras analisadas, 50 com CTCs, 22 positivas e 28 negativas); B) expressão proteica de ERCC1 (69 amostras analisadas, 53 com CTCs, 30 positivas e 23 negativas); C) expressão proteica de PD-L1 (69 amostras analisadas, 39 com CTCs, 18 positivas e 21 negativas); D) expressão proteica de β-galactosidase (69 amostras analisadas, 53 com CTCs, 8 positivas e 45 negativas); E) expressão proteica de TIMP1 (69 amostras analisadas, 52 com CTCs, 30 positivas e 22 negativas); F) expressão proteica de MMP9 (69 amostras analisadas, 52 com CTCs, 20 positivas e 32 negativas); G) expressão proteica de TYMS (69 amostras analisadas, 47 com CTCs, 22 positivas e 25 negativas); H) expressão de RNAm de TYMS (48 amostras analisadas, 47 com CTCs, 36 positivas e 11 negativas).

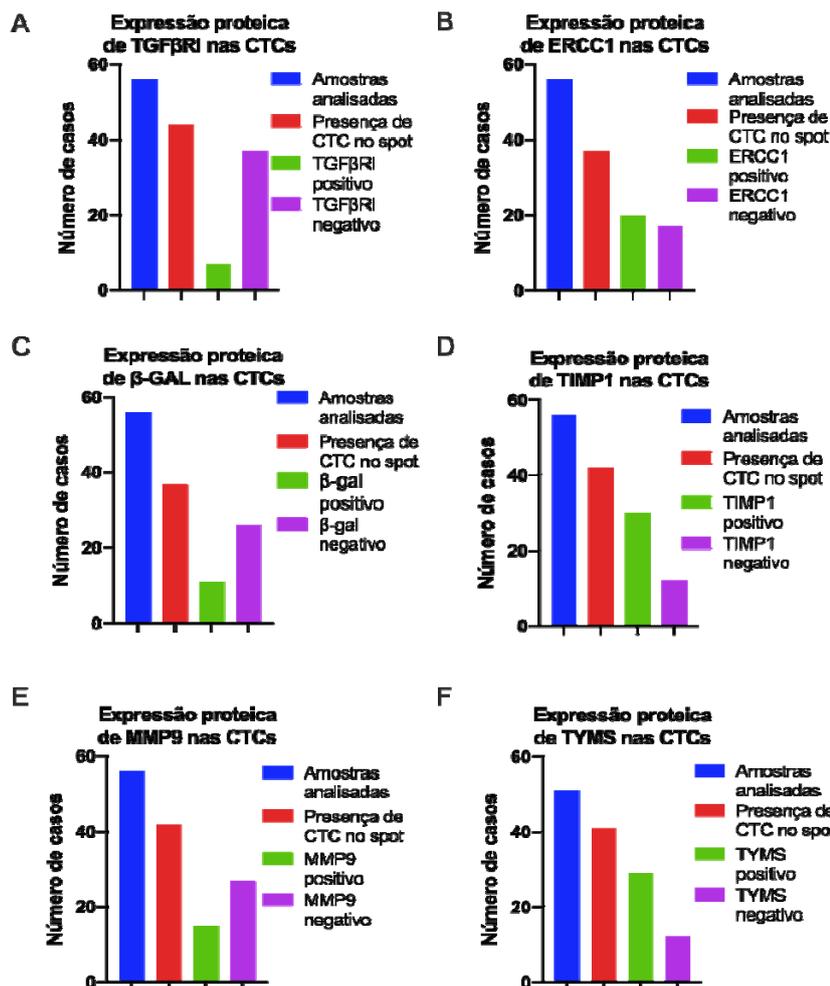


Figura 18 - Número de amostras de CTCs analisadas, positivas e negativas para cada marcador em todos os casos no primeiro seguimento, para: **A)** expressão proteica de TGFβRI (56 amostras analisadas, 44 com CTCs, 7 positivas e 37 negativas); **B)** expressão proteica de ERCC1 (56 amostras analisadas, 37 com CTCs, 20 positivas e 17 negativas); **C)** expressão proteica de β-galactosidase (56 amostras analisadas, 37 com CTCs, 11 positivas e 26 negativas); **D)** expressão proteica de TIMP1 (56 amostras analisadas, 42 com CTCs, 30 positivas e 12 negativas); **E)** expressão proteica de MMP9 (56 amostras analisadas, 42 com CTCs, 15 positivas e 27 negativas); **F)** expressão proteica de TYMS (51 amostras analisadas, 41 com CTCs, 29 positivas e 12 negativas).

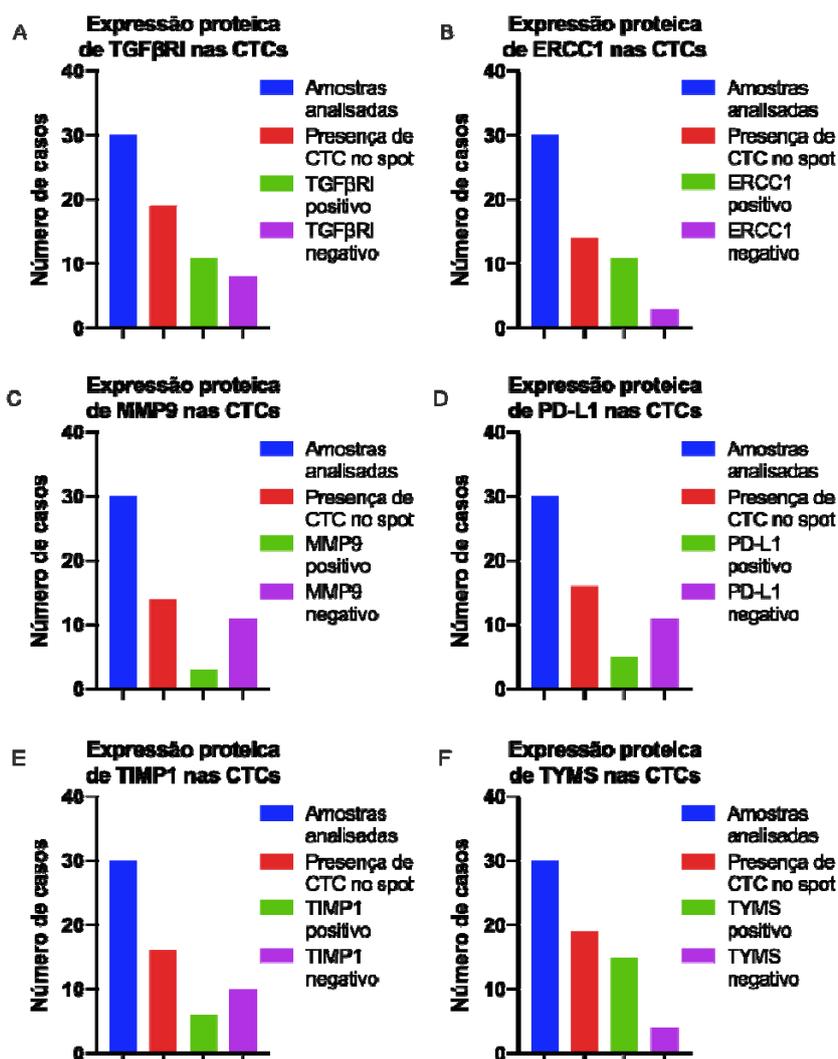


Figura 19 - Número de amostras de CTCs analisadas, positivas e negativas para cada marcador em todos os casos no segundo seguimento, para: **A)** expressão proteica de TGFβRI (30 amostras analisadas, 19 com CTCs, 11 positivas e 8 negativas); **B)** expressão proteica de ERCC1 (30 amostras analisadas, 14 com CTCs, 11 positivas e 3 negativas); **C)** expressão proteica de MMP9 (30 amostras analisadas, 14 com CTCs, 3 positivas e 11 negativas); **D)** expressão proteica de PD-L1 (30 amostras analisadas, 16 com CTCs, 5 positivas e 11 negativas); **E)** expressão proteica de TIMP1 (30 amostras analisadas, 16 com CTCs, 6 positivas e 10 negativas); **F)** expressão proteica de TYMS (30 amostras analisadas, 19 com CTCs, 15 positivas e 4 negativas).

A expressão de cada marcador foi analisada separadamente e é possível observar que as proteínas mais frequentemente encontradas nas CTCs na primeira coleta foram: ERCC1 (30 casos), TIMP1 (30 casos), TGF β RI (22 casos) e TYMS (22 casos), seguidos de MMP9 (20 casos), PD-L1 (18 casos) e β -galactosidase (8 casos) (**Figura 17**). No primeiro seguimento, as proteínas mais frequentemente encontradas foram: TIMP1 (30 casos), TYMS (29 casos), ERCC1 (20 casos), MMP9 (15 casos), seguidos de β -galactosidase (11 casos) e TGF β RI (7 casos) (**Figura 18**). Quando avaliamos o número de CTCs positivas para o total de células analisadas para cada marcador, constatamos que ERCC1 (11/21, 52,4%; $p=0,033$) e β -galactosidase (8/11, 72,7%; $p=0,048$) foram as proteínas mais expressas em CTCs nos pacientes com estágio III da doença no primeiro seguimento. No segundo seguimento, as proteínas mais frequentemente encontradas foram: TYMS (15 casos), TGF β RI e ERCC1 (11 casos para ambas as proteínas), seguidas de TIMP1, PD-L1 e MMP9 (6, 5 e 3 casos, respectivamente) (**Figura 19**).

Não foi encontrada uma relação entre a expressão dos marcadores e SLR dos pacientes, utilizando a variável de positivo ou negativo nas amostras de primeira coleta em todos os pacientes. Utilizando o índice de positividade (IP) de cada marcador nas CTCs ($\frac{\text{número de CTCs positivas}}{\text{número total de CTCs no spot}}$), realizamos o teste de sensibilidade e especificidade com a curva ROC para determinação do melhor ponto de corte (**Figuras 20, 21 e 22 e Tabela 9**). Após esta estratificação, foi observado que pacientes que tinham CTCs com alto IP de TGF β RI na primeira coleta ($>0,07$) apresentaram uma tendência a

SLR inferior quando comparados aos pacientes com CTCs com baixo IP de TGF β RI ($\leq 0,07$) ($p = 0,25$, **Figura 23A**). Observamos uma SLR significativamente inferior (média de SLR não calculada) para pacientes com CTCs com alto IP de ERCC1 ($>0,83$) no segundo seguimento quando comparados aos pacientes com baixo IP de ERCC1 ($\leq 0,83$), $p = 0,014$ (**Figura 23B**).

Dos pacientes com laudo de instabilidade de microssatélite disponível e CTCs presentes no *spot* avaliado para a presença de PD-L1 ($n = 35$) na primeira coleta, três de 4 amostras com microssatélite instável (75%) tinham CTCs com PD-L1 em sua superfície. Os tumores dos três pacientes apresentaram a perda de expressão dos genes de reparo MLH-1 e PMS-2. Observando o grupo de pacientes com tumores do perfil de estabilidade de microssatélite (MSS, $n = 31$), apenas 45,2% tinham CTCs com PD-L1 em sua superfície, $p = 0,33$.

Tabela 9 - Descrição do tempo médio de sobrevida livre de recidiva (SLR) baseado no índice de positividade (IP; número de CTCs positivas/número total de CTCs no spot analisado) de cada marcador analisado em todos os pacientes em todos os momentos.

Coleta	Marcador	IP* [mediana (mínimo – máximo)]	AAC	Melhor ponto de corte (IP)	Tempo médio de SLR ponto de corte)	Tempo médio de SLR (<= ponto de corte)	Tempo médio de SLR (> ponto de corte)	Valor de p
Primeira coleta	TGFβRI	0 (0 – 1)	0,654	0,07	35,4	29,0	0,25	
	ERCC1	0,22 (0 – 1)	0,507	0,55	33,5	33,7	0,79	
	PD-L1	0 (0 – 1)	0,526	0,81	29,5	33,3	0,86	
	β-gal	0 (0 – 1)	0,503	0,11	33,9	25,3	0,95	
	TIMP1	0,5 (0 – 1)	0,556	0,16	32,1	26,3	0,80	
	MMP9	0 (0 – 1)	0,629	0,08	30,5	30,4	0,10	
	TYMS	0 (0 – 1)	0,566	0,18	35,4	28,8	0,23	
Primeiro seguimento	TGFβRI	0 (0 – 1)	0,506	0,11	28,9	35,0	0,64	
	ERCC1	0,22 (0 – 1)	0,770	0,37	36,2	34,8	0,53	
	β-gal	0 (0 – 1)	0,587	0,11	NC	NC	0,7	
	TIMP1	0,66 (0 – 1)	0,603	0,57	32,2	33,4	0,57	
	MMP9	0 (0 – 1)	0,509	0,41	30,5	32,9	0,92	
	TYMS	0,53 (0 – 1)	0,583	0,58	27,9	34,3	0,55	
Segundo seguimento	TGFβRI	0,2 (0 – 1)	0,666	0,36	29,3	24,9	0,90	
	ERCC1	1 (0 – 1)	0,750	0,83	NC	NC	0,014	
	MMP9	0 (0 – 1)	0,600	0,16	NC	NC	0,29	
	PD-L1	0 (0 – 0,33)	0,692	0,03	NC	NC	0,57	
	TIMP1	0 (0 – 1)	0,525	0,86	29,6	16,0	0,23	
	TYMS	0,5 (0 – 1)	0,541	0,63	31,6	20,7	0,34	

Abreviações: IP: índice de positividade; AAC: área abaixo da curva; SLR: sobrevida livre de recidiva; TGFβRI: *transforming growth factor-β receptor type 1*; ERCC1: *excision repair cross complementing group 1*; PD-L1: *programmed death-ligand 1*; β-gal: *β-galactosidase*; TIMP1: *tissue inhibitor matrix metalloproteinase 1*; MMP9: *matrix metalloproteinase-9*; TYMS: *thymidylate synthase*.

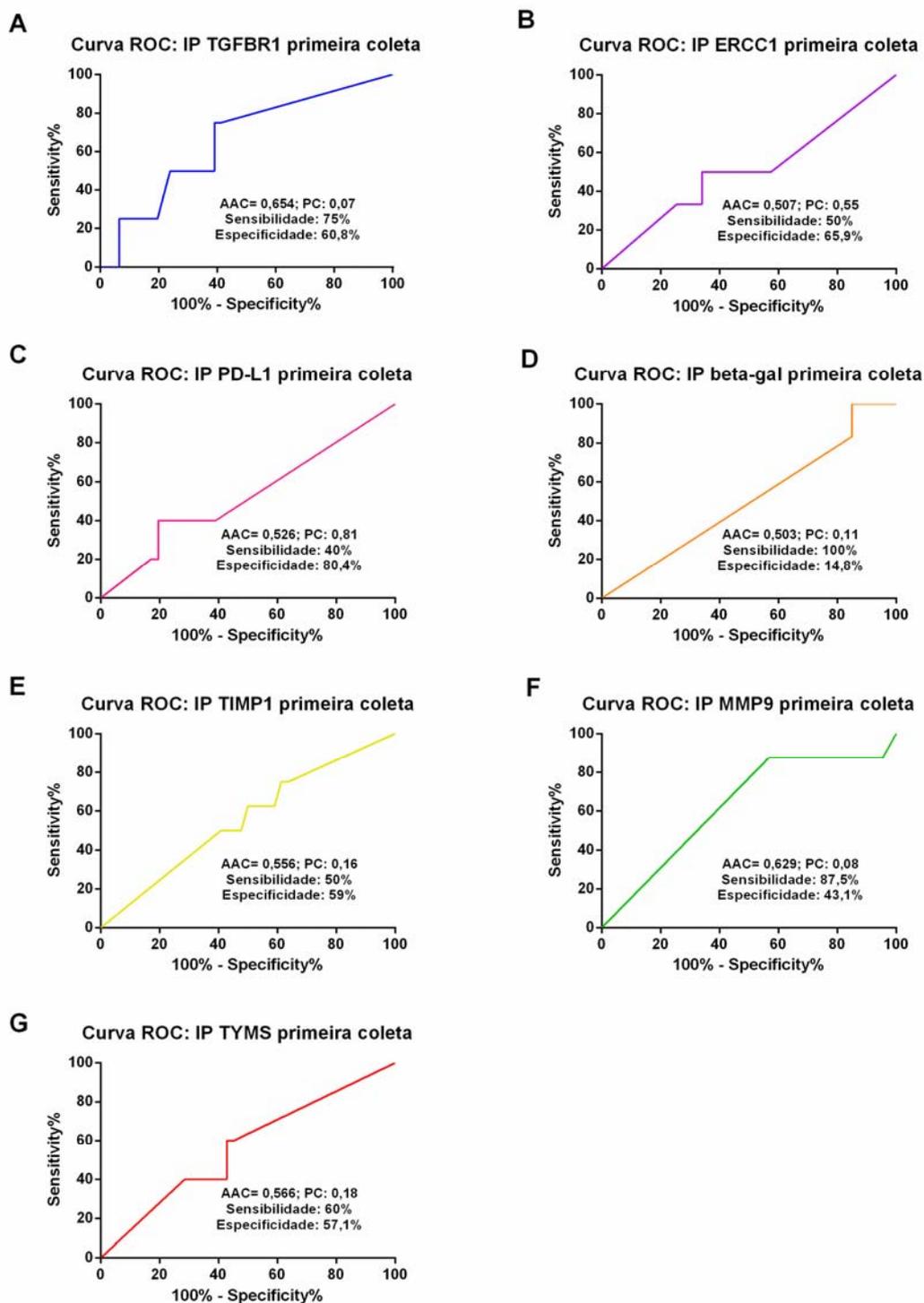


Figura 20 - Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs na primeira coleta (análise em todos os pacientes).

Abreviações: IP: índice de positividade; AAC: área abaixo da curva; PC: ponto de corte.

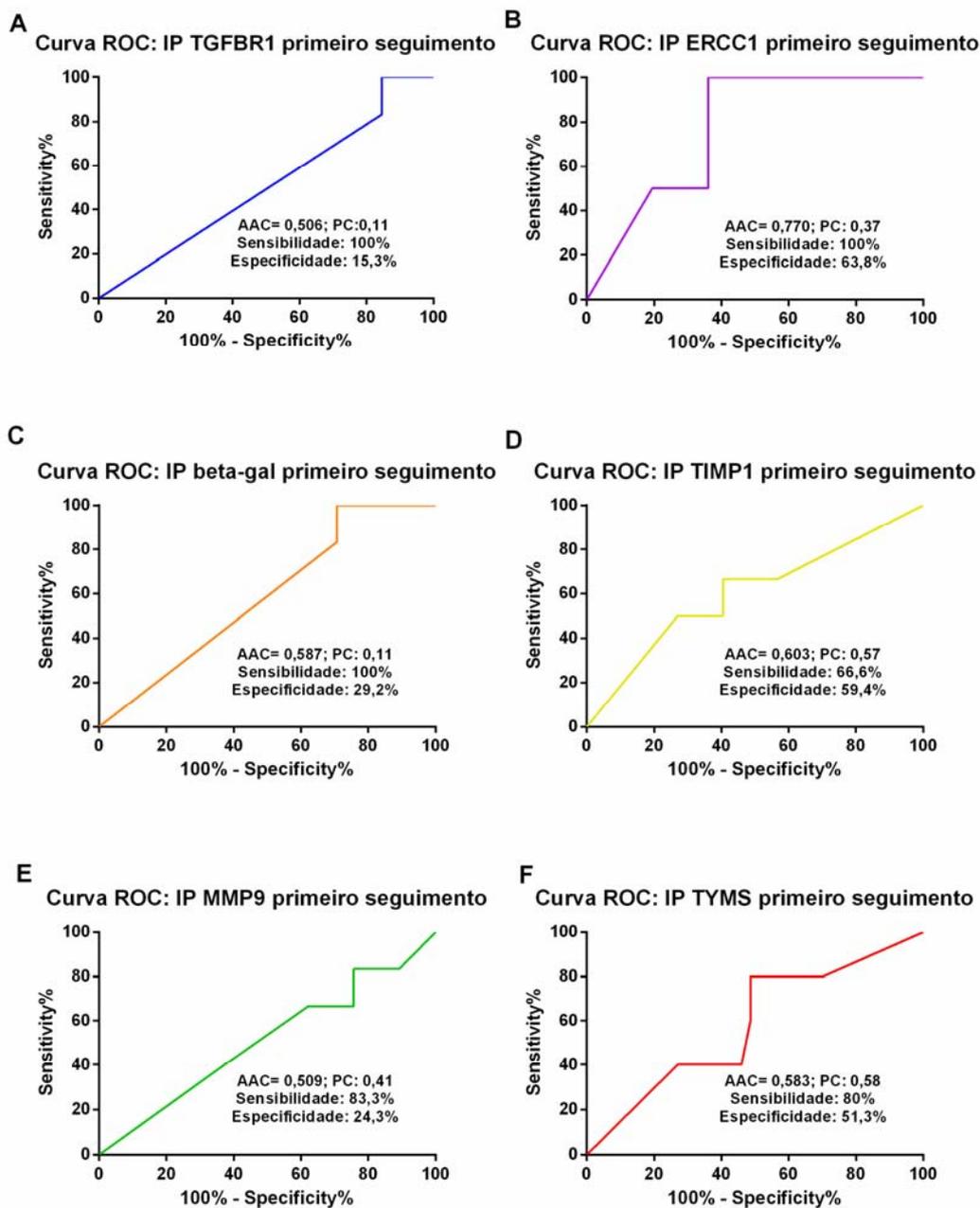


Figura 21 - Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs na segunda coleta (análise em todos os pacientes).

Abreviações: IP: índice de positividade; AAC: área abaixo da curva; PC: ponto de corte.

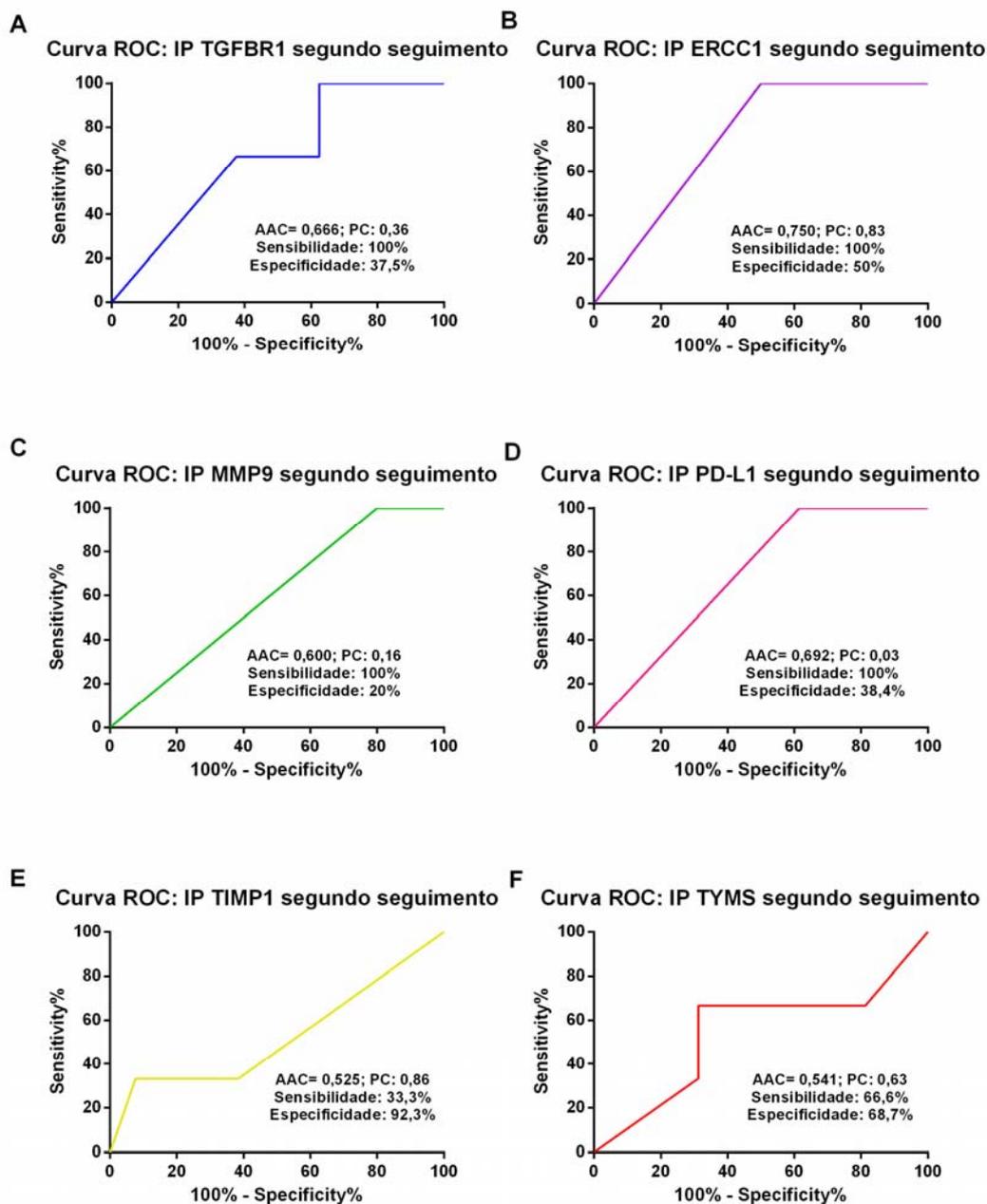


Figura 22 - Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs no segundo seguimento (análise em todos os pacientes).

Abreviações: IP: índice de positividade; AAC: área abaixo da curva; PC: ponto de corte.

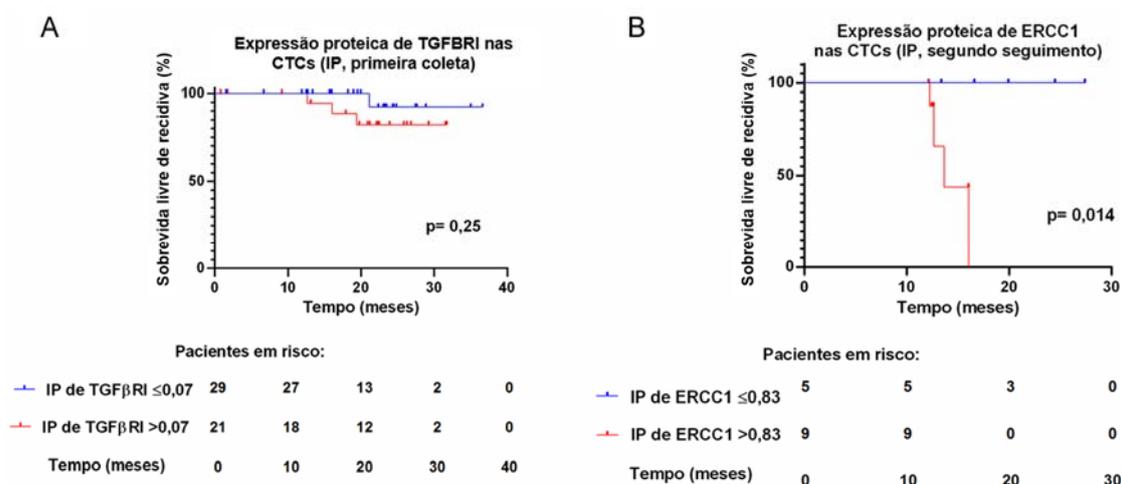


Figura 23 - Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) de todos os casos incluídos no estudo de acordo com o índice de positividade (IP) da expressão dos marcadores escolhidos. **A)** SLR em relação à primeira coleta de acordo com o IP da expressão de TGFβRI ($\leq 0,07$ e $> 0,07$; $p = 0,25$). **B)** SLR em relação ao segundo seguimento de acordo com o IP da expressão de ERCC1 ($\leq 0,83$ e $> 0,83$; $p = 0,014$).

4.1.6 Hibridização *in situ* Cromogênica (CISH)

A presença do RNAm de Timidilato Sintase (TYMS) foi testada pelo método de CISH em 48 membranas com CTCs de pacientes com câncer de cólon na primeira coleta. As amostras provenientes de pacientes estadiados como II e III foram incluídas nesta análise. Amostras que apresentaram ausência de CTC em análises prévias foram excluídas ($n = 3$). Dos 48 casos analisados, 47 apresentaram CTCs isoladas na membrana, e 36 apresentaram CTCs positivas (**Figura 24**) para a enzima testada. Dos pacientes avaliados para a expressão de RNAm de TYMS, 34 também tinham CTCs nos *spots* utilizados na avaliação da expressão proteica de TYMS. Foi observada uma baixa concordância entre estas duas análises, sendo 3/34 (8,8%) amostras negativas para ambas as análises e 14/34

(41,2%) positivas para ambas as análises, totalizando 50% das amostras concordantes. Resultados numéricos podem ser observados na **Figura 17H**.

Não foram observadas diferenças numéricas ou estatisticamente significativas em relação à SLR, estadiamento ou condições clínicas e patológicas dos pacientes.

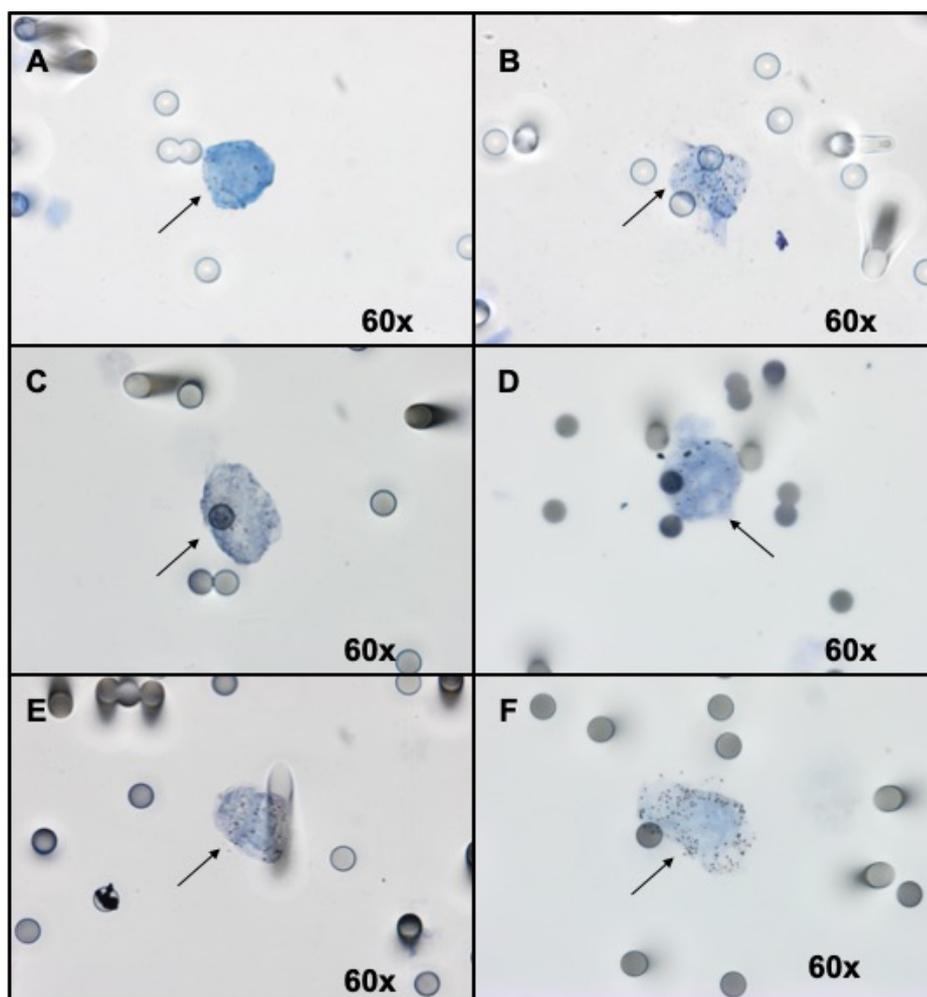


Figura 24 - Fotomicrografias de Células Tumorais Circulantes isoladas de paciente com câncer de cólon, positivas para expressão de RNAm de TYMS, visualizados pelos pontos marrons na célula. Todas as fotomicrografias foram tiradas em aumento de 60x, com a câmera SC100, no microscópio BX61 - Olympus. A seta representa a célula de interesse marcada e os asteriscos representam poros da membrana de policarbonato de 8 μ m de diâmetro.

4.1.7 Droplet Digital PCR (ddPCR)

Utilizando esta técnica avaliamos 53 amostras de CTCs para mutação em *KRAS* nos códons 12 e 13, três amostras para *NRAS* no códon 61 e uma amostra para *KRAS* no códon 61, onde o tumor primário dos pacientes havia sido previamente estudado pela técnica de NGS pela rotina do A.C. Camargo Cancer Center. O resultado obtido pode ser observado na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Descrição dos casos testados para mutação em *KRAS* (12/13 e Q61) e *NRAS* (Q61) no tumor primário por *Next Generation Sequencing* (NGS), resultado da análise em CTCs pelo *droplet digital PCR*.

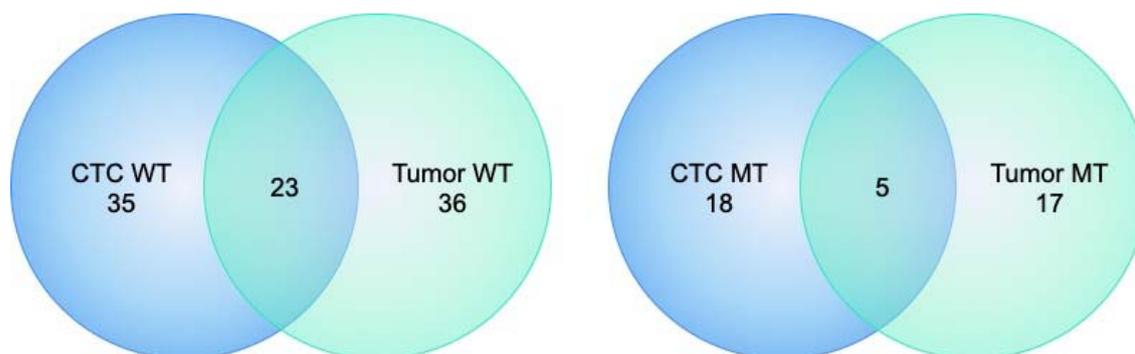
	<i>KRAS</i> 12/13 tumor MT	<i>KRAS</i> Q61 tumor MT	<i>NRAS</i> Q61 tumor MT	Tumor WT	Total
<i>KRAS</i> 12/13 MT CTC	5			13	18
<i>KRAS</i> Q61 MT CTC		1			1
<i>NRAS</i> Q61 MT CTC			2		2
CTC WT	12		1	23	36
Total	16	1	3	37	57

Abreviações: CTC: células tumorais circulantes; WT: *wild-type* (selvagem); MT: mutante.

A **Figura 25** mostra os resultados concordantes, tanto para presença quanto para ausência de mutação em *KRAS* nos códons 12 e 13, regiões mais comumente mutadas, observadas entre CTCs e tumor primário. Encontramos 23 das 53 amostras com concordância em relação à ausência de mutação nestas regiões, porém apenas 5 com concordância em relação à presença de mutação. Em relação aos resultados discordantes, encontramos 12 das 53 amostras testadas com mutação nas CTCs, mas não no tumor primário. Ao contrário, 13 das 53 amostras testadas apresentaram mutação no tumor primário, mas não nas CTCs. Estes

resultados nas CTCs apresentaram sensibilidade de 29,4%, especificidade de 63,8%, VPP de 27,8%, VPN de 65,7% e acurácia de 52,8% ($p= 0,63$). Os testes foram realizados seguindo as instruções do fabricante.

***KRAS* códons 12/13 – resultados concordantes**



***KRAS* códons 12/13 – resultados discordantes**

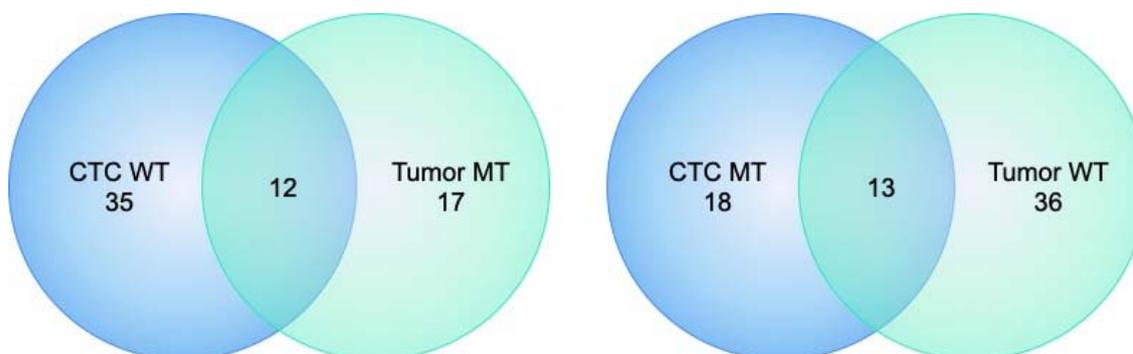


Figura 25 - Resultados concordantes e discordantes em relação ao estado de mutação em *KRAS* nos códons 12 e 13 observados entre CTCs e tumor primário.

4.1.8 Análise de populações celulares por citometria de fluxo

Analizamos amostras de sangue (200 μ l) de 10 casos coletados antes da cirurgia de ressecção do tumor primário. No entanto, 4 casos foram excluídos da casuística por apresentarem ausência de neoplasia residual (2) e carcinoma *in situ* (2) no laudo patológico. Nosso intuito foi avaliar o perfil imunológico dos pacientes associado às CTCs. Incluímos nos painéis as citoqueratinas 18 e 19 e o EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) para detectar as CTCs, porém obtivemos resultados inconclusivos em relação a estes marcadores.

Avaliamos a porcentagem de células do sistema imune nos últimos seis casos incluídos no estudo. Avaliamos a população total de linfócitos e monócitos/macrófagos (**Tabela 11**). Interessantemente, foi encontrada uma correlação positiva, estatisticamente significativa entre a porcentagem de células T Reguladoras (T-Reg) e o número de CTCs por mL avaliadas pelo método ISET ($\rho= 0,88$, $p= 0,01$) (**Figura 26A**). Ainda, foi encontrada uma correlação negativa estatisticamente significativa entre a porcentagem de linfócitos T totais e o número de CTCs por mL ($\rho= -0,88$, $p= 0,01$) (**Figura 26B**).

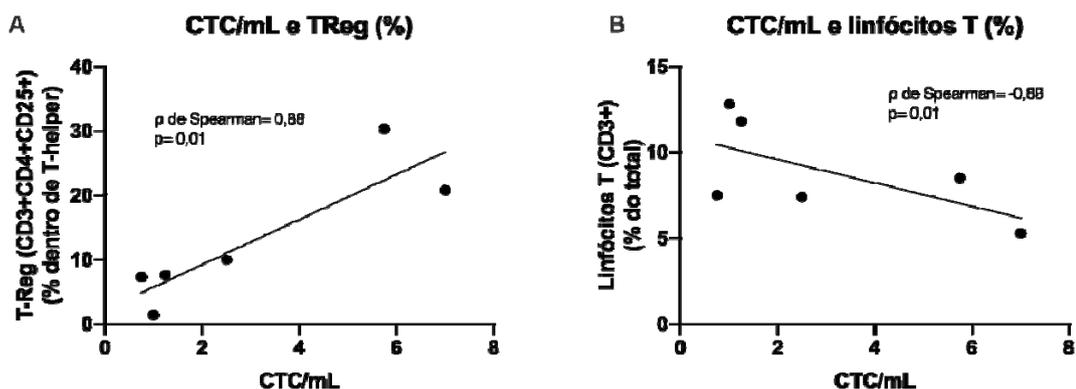


Figura 26 - Gráficos representando o coeficiente de correlação referente aos dados obtidos nas análises de citometria de fluxo nos últimos 6 pacientes incluídos. **A)** Coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e a porcentagem de células T-Reg dentro da população de células T-helper (ρ de Spearman= 0,88, $p=0,01$). **B)** Coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e a porcentagem de linfócitos T dentro da população de todas as células analisadas por amostra (ρ de Spearman= -0,88, $p=0,01$).

Tabela 11 - Descrição dos casos em relação às porcentagens de cada subtipo celular. As porcentagens de cada população (terceira linha do quadro) estão apresentadas em relação às populações da primeira linha. Na segunda linha se encontram os marcadores que foram utilizados para identificar cada população.

Porcentagem analisada em relação às populações:	Todas as células	Linfócitos totais		Linfócitos T		T-helper	Todas as células	Monócitos/macrófagos (%)	Níveis de CTC/mL (baseline)
	População Total (tamanho e granulosidade)	CD20+ CD3-	CD3+	CD3+CD8+	CD3+CD4+	CD3+CD4+ CD25+	População Total	CD11b+	
Caso	Linfócitos totais (%)	Linfócitos B (%)	Linfócitos T (%)	T-citotóxico (%)	T-helper (%)	T-Reg (%)	Monócitos/Macrófagos (%)		
44	7,5	1,5	4,8	8,3	88,3	7,3	5,2	91	0,75
56	11,8	0,7	4,6	14	82,4	7,6	2	83,6	1,25
37	7,4	10	2,7	12,7	82,7	10	4,4	94	2,5
1	8,5	4,3	4	8,2	81,7	30,3	9	96	5,75
11	5,3	6,7	2,6	44,3	45,7	20,8	7,7	95	7,0
45	12,8	0,9	26,9	7,9	80,1	1,4	Não avaliável	Não avaliável	1,0

4.1.9 Contagem de elementos do sangue

Os elementos do sangue foram avaliados (hemograma completo) concomitantemente às coletas de CTCs, portanto, as taxas entre neutrófilos/linfócitos (*Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio* - NLR) e de plaquetas/linfócitos (*Platelet-to-Lymphocyte Ratio* - PLR) foram calculadas na primeira coleta.

A NLR foi avaliada em 65 casos. De acordo com FORGET et al (2017), níveis normais de NLR estão entre 0,78 – 3,53. Encontramos em nossa casuística uma mediana de NLR de 2,6 (mín – máx: 1,01 – 14,83). A maioria dos pacientes (67,7%) encontrava-se em estado de normalidade de NLR. Não houve associação desta condição com outra característica dos pacientes, nem com SLR (**Figura 27A**).

Foi observado que pacientes com PLR alta (acima de 124, de acordo com HUDZIK et al. 2015) encontravam-se em sua maioria com estadiamentos patológicos II de alto risco e III (75,6%), quando comparados aos estadiamentos I ou II de baixo risco (24,4%); $p= 0,014$. Ainda, 90% dos pacientes com presença de MEs na primeira coleta enquadravam-se no grupo de PLR alta *versus* 10% dos pacientes com presença de MEs e no grupo de PLR baixa ($p= 0,11$). Os 8 casos que apresentaram recidiva da doença também se encaixavam no grupo de alta PLR ($p= 0,02$), portanto, pacientes com PLR alta apresentaram uma SLR inferior quando comparados àqueles com PLR baixa (tempo de SLR não calculado; $p= 0,019$; **Figura 27B**).

Analisando separadamente os casos de estadiamento, foi observado, no estágio I que 80% dos casos com MEs na primeira coleta estavam com PLR alta ($p= 0,11$). Quando analisamos os estadiamentos II e III juntos, observamos que 100% dos casos com MEs na primeira coleta também estavam com PLR alta ($p= 0,31$).

Para pacientes com estadiamento I/II de baixo risco e ausência de MEs a mediana de PLR foi de 115. Já para este mesmo grupo de estadiamento e com presença de MEs a mediana de PLR foi de 166 ($p= 0,16$). Para pacientes com estadiamentos agrupados entre II de alto risco/III e presença de MEs, a mediana de PLR foi de 212, maior do que os casos com ausência de MEs, que apresentaram uma PLR mediana de 145 ($p= 0,09$) (**Figura 28**).

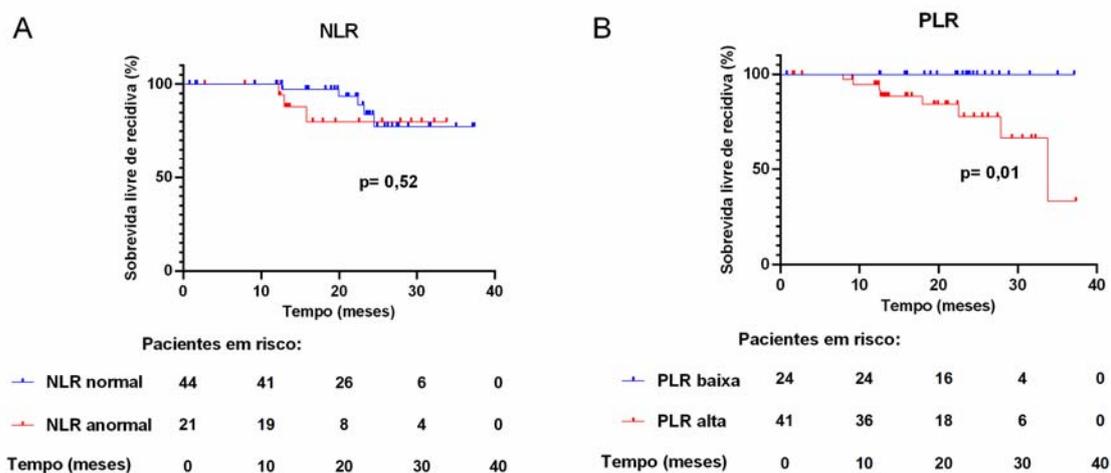


Figura 27 - Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos pacientes de acordo com a proporção entre neutrófilos e linfócitos (NLR) e a proporção entre plaquetas e linfócitos (PLR). **A)** SLR em relação às quantificações basais entre pacientes com NLR normal (entre 0,78 – 3,53) e anormal ($<0,78$ e $>3,53$), $p=$ não significativo. **B)** SLR em relação às quantificações basais entre pacientes com PLR baixa (<124) e PLR alta (>124), $p= 0,01$.

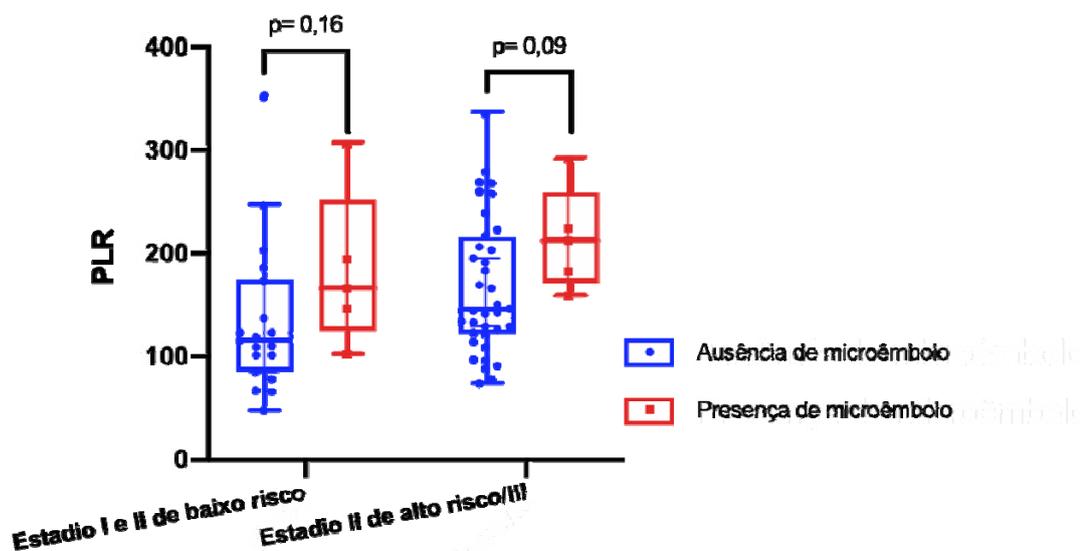


Figura 28 - Níveis de *platelet-to-lymphocyte ratio* (PLR) entre os pacientes com presença ou ausência de microembolos (MEs), dentro dos estadiamentos patológicos.

4.2 MÓDULO II, PACIENTES COM TUMORES DE ALTO RISCO

Neste módulo serão apresentados achados dos pacientes que foram considerados como portadores de tumores de cólon de alto risco, portanto, submetidos à quimioterapia adjuvante, de maneira separada, na tentativa de avaliar os grupos onde as CTCs poderiam trazer informações clinicamente relevantes. Nestas análises, foram excluídos os dois casos que portavam tumores com estadiamento III, porém sem indicação de adjuvância (idade avançada).

4.2.1 Características Demográficas, Clínicas e Patológicas

As características clínico-patológicas dos pacientes estão dispostas na **Tabela 12**. Dos 40 pacientes de alto risco, 22 (55%) eram homens e 18 (45%) mulheres, com a idade mediana de 59 anos (33 – 78). As contagens de CTCs de todos os pacientes na primeira coleta foram realizadas.

No primeiro seguimento, foram coletadas amostras de sangue de 34 pacientes e as contagens de CTCs de todos os pacientes foram avaliadas. No segundo seguimento, após 6 meses do término da quimioterapia adjuvante, amostras de sangue de 29 pacientes foram coletadas e as contagens de CTCs de todos os pacientes foram realizadas. O número mediano dos níveis séricos do CEA (antígeno carcinoembrionário) na primeira coleta foi de 3,1 ng/mL (0,2 – 158 ng/mL). Os níveis de CEA na primeira coleta estavam disponíveis nos prontuários de todos os pacientes. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com estadiamento II e III.

O acometimento primário tumoral foi predominantemente no cólon descendente (70%), seguido de cólon ascendente (30%). Todos os tumores foram classificados histologicamente como adenocarcinoma.

Em relação ao estadiamento patológico, pacientes submetidos à quimioterapia adjuvante tinham tumores classificados em sua maioria como III (85%). Em relação ao pT e pN, a maioria dos tumores apresentaram-se como pT3 (67,5%) e linfonodos positivos (85%)

O *status* de mutação dos genes *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* no tumor estava disponível nos prontuários eletrônicos de 29 dos 40 pacientes.

Destes, apenas 10 (34,5%) tinham algum dos genes mutantes. Os laudos de identificação de instabilidade microssatélite (MSI) no tumor primário estavam disponíveis em 35 dos 40 pacientes. Destes, a maioria dos tumores (n= 31; 88,6%) apresentou um perfil de microssatélite estável. Coletamos dados sobre o tabagismo dos pacientes e a maioria (52,5%) alegou o uso de tabaco em algum momento da vida (pacientes tabagistas ou ex-tabagistas).

Tabela 12 - Características clínico-patológicas dos pacientes considerados como portadores de tumores de alto risco envolvidos neste estudo (n= 40). Estadiamento TNM de acordo com AJCC UICC 2017.

Variáveis (n)	Nº	%
Número total de pacientes	40	100
Idade ao entrar no estudo, em anos (40)		
Mediana	59	
Variação (mín – máx)	33 - 78	
Gênero (40)		
Masculino	22	55
Feminino	18	45
Grau histológico (40)		
Adenocarcinoma mucinoso	4	10
Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	36	90
Sítio primário (40)		
Cólon ascendente	12	30
Cólon descendente	28	70
Status RAS (29)		
Selvagem	19	65,5
Mutante	10	34,5
Tamanho do tumor (pT) (40)		
1	1	2,5
2	5	12,5
3	27	67,5
4a/4b	7	17,5
Acometimento Linfonodal (pN) (40)		
N0	6	15
N+	34	85
Estadiamento patológico (40)		
IIA/IIB	6	15
IIIA/IIIB/IIIC	34	85

Cont/Tabela 12

Variáveis (n)	Nº	%
MMR (<i>mismatch repair</i>) (35)		
Microssatélite estável	31	88,6
MLH-1 e PMS-2	4	11,4
Estratégia Terapêutica (40)		
Adjuvância	40	100
Regime de tratamento (39)		
FOLFOX	18	46,15
CAPOX	14	35,9
Capecitabina	5	12,85
5-Fluorouracil	2	5,1
Níveis medianos de CEA (ng/mL)		
1ª coleta (avaliados em 40/40)	3,1 (0,2 – 158)	
1ª seguimento (avaliados em 20/34)	1,7 (0,7 – 33)	
2ª seguimento (avaliados em 27/29)	2,4 (0 – 19,5)	
Nº mediano de CTCs/mL		
1ª coleta (avaliados em 40/40)	2,4 (0 – 11,7)	
1ª seguimento (avaliados em 34/34)	1,8 (0 – 7,3)	
2ª seguimento (avaliados em 29/29)	1,3 (0,1 – 10)	
Microêmbolos Tumorais Circulantes		
1ª coleta (avaliados em 40/40)		
Presença	4	10
Ausência	36	90
1ª seguimento (avaliados em 34/34)		
Presença	4	11,75
Ausência	30	88,25
2ª seguimento (avaliados em 29/29)		
Presença	3	10,3
Ausência	26	89,7

4.2.2 Contagem de CTCs e Microêmbolos

No grupo de pacientes indicados à quimioterapia adjuvante, foi encontrada uma mediana de 2,4 CTCs/mL (0 – 11,7) na primeira coleta, 1,8 CTCs/mL (0 – 7,3) no primeiro seguimento e 1,3 CTCs/mL (0 – 10) no segundo seguimento. A taxa de detecção de CTCs foi de 95% na primeira coleta, de 94,1% no primeiro seguimento e de 100% no segundo seguimento.

Foi observada uma taxa de detecção de CTCs similar entre os grupos de estadiamento (II = 100% e III = 94,1%; $p > 0,99$), bem como na mediana de CTCs/mL (2 e 2,4, respectivamente) na primeira coleta. Em relação à média, houve um aumento crescente proporcional ao estadiamento, (2,7 e 3,4, respectivamente), porém sem significância estatística ($p = 0,81$; Teste U de Mann-Whitney). No primeiro e no segundo seguimentos, também não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação às contagens de CTCs entre os grupos de estadiamento. Dados detalhados de CTCs e microêmbolos em cada grupo de estadiamento em todas as coletas estão disponíveis nas **Tabelas 13 e 14**.

Quando a mediana de CTCs (primeira coleta) foi analisada, agrupando os casos de estadiamento pT1+pT2 e pT3+pT4, é possível observar que a mediana foi maior no segundo grupo (pT3+pT4: 2,4/mL) comparado ao primeiro grupo (pT1+pT2: 1,7/mL), $p = 0,19$ (**Figura 29A**; Teste U de Mann-Whitney). Foi encontrado um maior nível de CTCs na primeira coleta nos pacientes tabagistas/ex-tabagistas (mediana: 2,8 CTCs/mL) em relação aos não tabagistas (mediana: 2 CTCs/mL), $p = 0,04$ (**Figura 29B**; Teste U de Mann-Whitney). Resultado estatisticamente significativo também foi observado no primeiro seguimento em relação à condição de tabagismo (mediana: 3 CTCs/mL) quando comparado aos não tabagistas (mediana: 1,3 CTCs/mL), $p = 0,007$ (**Figura 29C**; Teste U de Mann-Whitney).

Em relação ao seguimento dos pacientes, 7 dos 40 (17,5%) apresentaram recidiva da doença ou recidiva em uma média de 29,5 meses

(Intervalo de Confiança (IC) de 95%: 25,9 – 33,1 meses) (**Figura 30**). A mediana do tempo de SLR não foi atingido. O tempo mediano de seguimento foi de 19,8 meses (IC 95%: 14,7 – 24,8 meses).

Foi realizada uma análise de sensibilidade e especificidade utilizando a curva ROC para determinação do melhor ponto de corte para as CTCs nos três momentos analisados. Após esta análise, foi escolhido tanto para a primeira coleta quanto para o primeiro seguimento o ponto de corte de 0,7 CTC/mL. Para o segundo seguimento o ponto de corte foi de 2 CTCs/mL. Pacientes com $\leq 0,7$ CTC/mL na primeira coleta tiveram uma tendência a SLR superior aos que tinham $>0,7$ CTC/mL (tempo de SLR não calculado; $p= 0,29$; **Figura 31A**). Resultado similar foi observado no primeiro seguimento, pacientes com $\leq 0,7$ CTC/mL tiveram uma tendência a SLR superior aos que tinham $>0,7$ CTC/mL (tempo de SLR não calculado; $p= 0,19$; **Figura 31B**). Já no segundo seguimento, utilizando o ponto de corte de 1,2 CTCs/mL, não foi observada diferença em relação a SLR, quando comparado ao grupo que tinha $>1,2$ CTCs/mL (tempo médio de SLR: 27 meses versus 28,6 meses; $p= 0,51$; **Figura 31C**).

A presença de MEs foi observada em 4/40 (10%) das amostras analisadas na primeira coleta, em 4/34 (11,8%) das amostras analisadas no primeiro seguimento e em 3/29 (10,3%) das amostras analisadas no segundo seguimento. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à distribuição (%) de MEs e estadiamento patológico na primeira coleta; dos 4 casos com MEs tanto na primeira coleta quanto no primeiro seguimento, ficaram distribuídos na seguinte maneira: 25% enquadravam-se

no estágio II e 75% no estágio III ($p= 0,49$ na primeira coleta e $p= 0,48$ no primeiro seguimento). Dos três casos com ME na última coleta, um paciente (33,3%) enquadrava-se no estágio II e dois pacientes (66,7%) se enquadravam no estágio III. Analisamos a SLR dos pacientes de acordo com a presença e ausência de MEs nos três momentos avaliados. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos momentos: primeira coleta ($p= 0,54$), primeiro seguimento ($p= 0,27$) e segundo seguimento ($p= 0,57$); **Figuras 31D, 31E e 31F**.

Tabela 13 - Dados referentes à taxa de detecção de CTCs, mediana, média nos pacientes com tumores de alto risco e submetidos ao tratamento adjuvante, em cada grupo de estadiamento em todos os momentos do estudo.

Coleta	Estágio (n)	Taxa de detecção de CTCs (%)	Valor de p^a	Mediana de CTCs/mL (mín-máx)	Média de CTCs/mL ($\pm dp$)	Valor de p^b
Primeira coleta	IIA/IIB (6)	100	> 0,99	2 (1,2-6)	2,7 ($\pm 1,76$)	0,81
	IIIA/IIIB/IIIC (34)	94,1		2,4 (0-11,7)	3,4 ($\pm 2,81$)	
	Total (40)	95		2,4 (0-11,7)	3,3 ($\pm 2,67$)	
Primeiro seguimento	IIA/IIB (5)	100	> 0,99	4,3 (1-7,3)	3,8 ($\pm 2,77$)	0,27
	IIIA/IIIB/IIIC (29)	93,1		1,6 (0-6)	2,2 ($\pm 1,75$)	
	Total (34)	94,1		1,8 (0-7,3)	2,4 ($\pm 1,96$)	
Segundo seguimento	IIA/IIB (6)	100	NC	1,1 (0,5-3,8)	1,8 ($\pm 1,42$)	0,93
	IIIA/IIIB/IIIC (23)	100		1,8 (0,1-10)	2,3 ($\pm 2,5$)	
	Total (29)	100		1,3 (0,1-10)	2,2 ($\pm 2,3$)	

^a Teste de qui-quadrado; ^b Teste de Kruskal Wallis. NC: não calculado (todos os pacientes tinham presença de CTC).

Tabela 14 - Dados sobre microêmbolos nos pacientes com tumores de alto risco e submetidos ao tratamento adjuvante, em cada grupo de estadiamento em todos os momentos do estudo (n= 40).

Coleta	Estágio (n)	Nº de casos com presença de microêmbolos	Nº de microêmbolos	Nº de CTCs no maior microêmbolo	Nº total de CTCs em microêmbolos
Primeira coleta	IIA/IIB (6)	1	1	7	7
	IIIA/IIIB/IIIC (34)	3	3	17	27
	Total (40)	4	4	24	34
Primeiro seguimento	IIA/IIB (5)	1	1	5	5
	IIIA/IIIB/IIIC (29)	3	5	5	19
	Total (34)	4	6	10	24
Segundo seguimento	IIA/IIB (6)	1	1	3	3
	IIIA/IIIB/IIIC (23)	2	3	8	18
	Total (29)	3	4	11	21

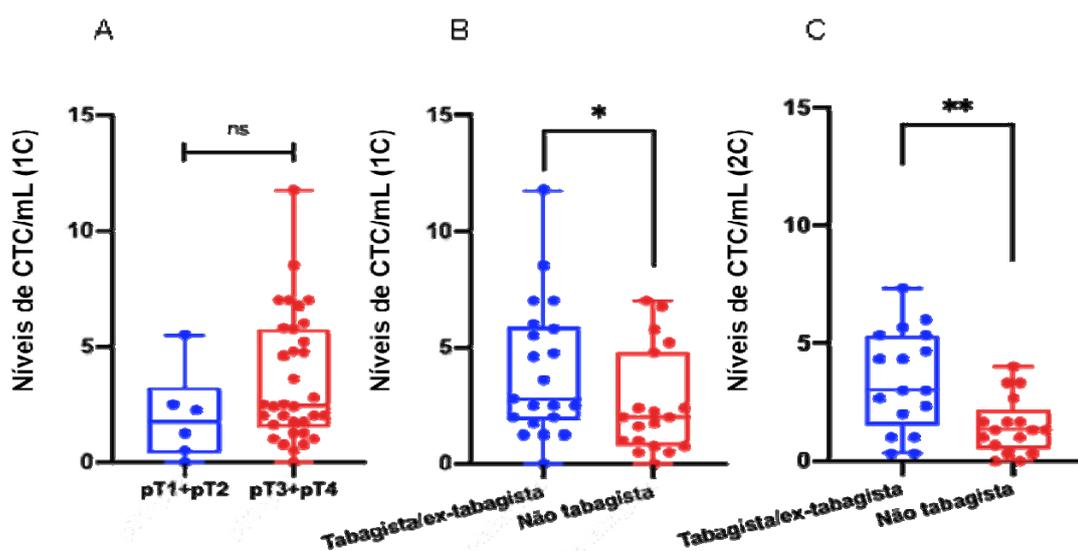
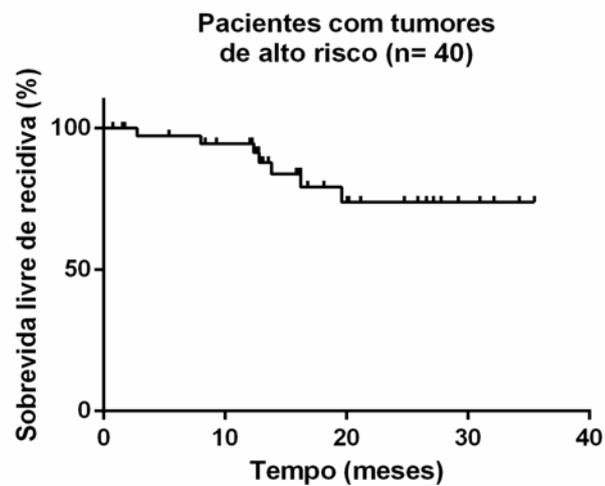


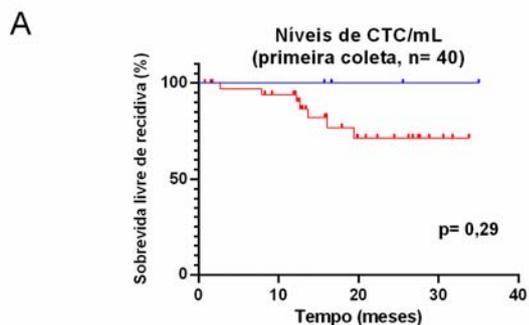
Figura 29 - Diagramas de caixa demonstrando a distribuição de CTCs dos pacientes submetidos ao tratamento adjuvante, de acordo com os grupos estabelecidos. **A)** Mediana de CTCs (primeira coleta) de acordo com o estadiamento T patológico agrupado (pT1+pT2 *versus* pT3+pT4; p= 0,19; Teste U de Mann-Whitney). **B)** Mediana de CTCs (primeira coleta) de acordo com a condição de tabagismo (tabagista/ex-tabagista *versus* não tabagista; p= 0,04; Teste U de Mann-Whitney). **C)** Mediana de CTCs (segunda coleta) de acordo com a condição de tabagismo (tabagista/ex-tabagista *versus* não tabagista; p= 0,006; Teste U de Mann-Whitney)



Pacientes em risco:

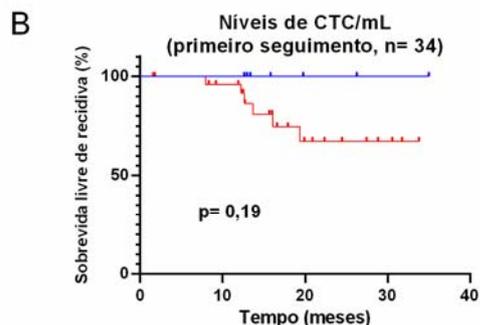
	40	33	15	5	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40

Figura 30 - Gráfico de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos 40 casos de alto risco tratados com quimioterapia adjuvante. Média de tempo: 29,5 meses (Intervalo de Confiança (IC) de 95%: 25,9 – 33,1 meses).



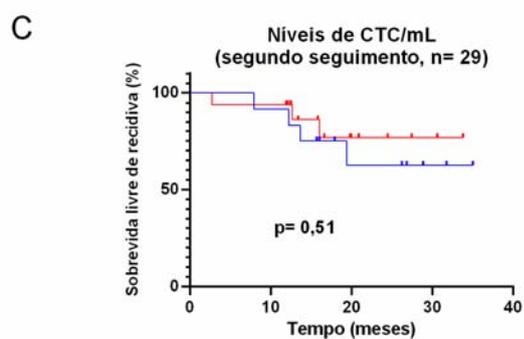
Pacientes em risco:

CTC <0,7/mL	4	3	1	0	0
CTC ≥0,7/mL	36	29	11	3	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40



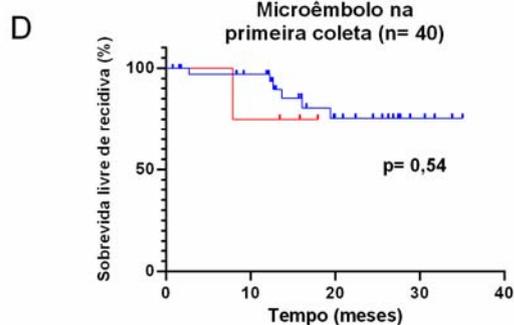
Pacientes em risco:

CTC <0,7/mL	7	7	2	0	0
CTC ≥0,7/mL	27	22	8	3	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40



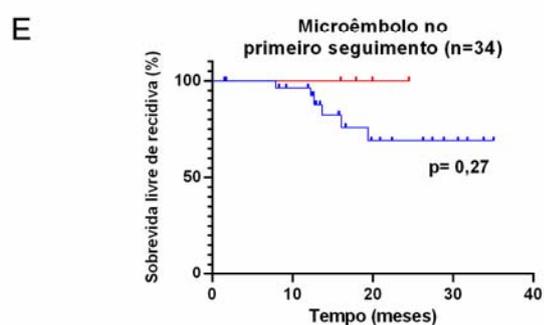
Pacientes em risco:

CTC <1,2/mL	12	11	5	2	0
CTC ≥1,2/mL	17	16	5	2	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40



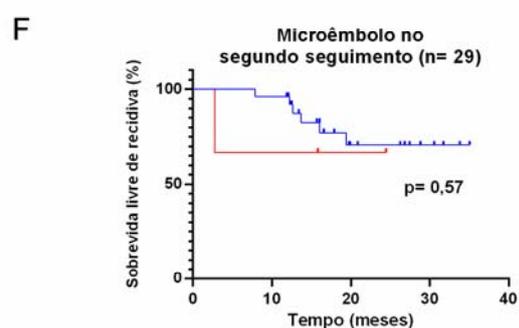
Pacientes em risco:

Ausência de ME	36	30	13	4	0
Presença de ME	4	3	0	0	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40



Pacientes em risco:

Ausência de ME	30	25	9	4	0
Presença de ME	4	3	0	0	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40



Pacientes em risco:

Ausência de ME	26	25	9	4	0
Presença de ME	3	2	1	0	0
Tempo (meses)	0	10	20	30	40

Figura 31 - Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos casos de alto risco tratados com quimioterapia adjuvante de acordo com a quantificação de CTCs **(A-C)** e presença ou ausência de MEs **(D-F)**. **A)** SLR em relação à primeira coleta de acordo com o número de CTCs (\leq e $>0,7$; $p= 0,29$). **B)** SLR em relação ao primeiro seguimento de acordo com o número de CTCs (\leq e $>0,7$; $p= 0,19$). **C)** SLR em relação ao segundo seguimento de acordo com o número de CTCs (\leq e $>1,2$; $p= 0,51$). **D)** SLR em relação à primeira coleta de acordo com presença e ausência de MEs ($p= 0,54$). **E)** SLR em relação ao primeiro seguimento de acordo com presença e ausência de MEs ($p= 0,27$). **F)** SLR em relação ao segundo seguimento de acordo com presença e ausência de MEs ($p= 0,57$).

4.2.3 Correlação entre os níveis de CTCs e de CEA

O coeficiente de correlação entre os níveis de CTCs e CEA foi analisado nos pacientes de alto risco tratados com quimioterapia adjuvante, em 40 casos na primeira coleta, em 20 casos no primeiro seguimento e em 27 casos no segundo seguimento. No entanto, não observamos correlação entre os níveis destes biomarcadores quando analisados neste grupo de pacientes **(Figuras 32A, 32B e 32C)**. Quando os coeficientes de correlação foram avaliados restringindo aos pacientes com recidiva da doença ($n= 7$), observamos uma forte correlação entre os níveis de CTC e CEA (ρ de Spearman= 0,95; $p= 0,001$) na primeira coleta **(Figura 32D)**. Não foram observadas correlações estatisticamente significativas em nenhum dos seguimentos **(Figuras 32E e 32F)**.

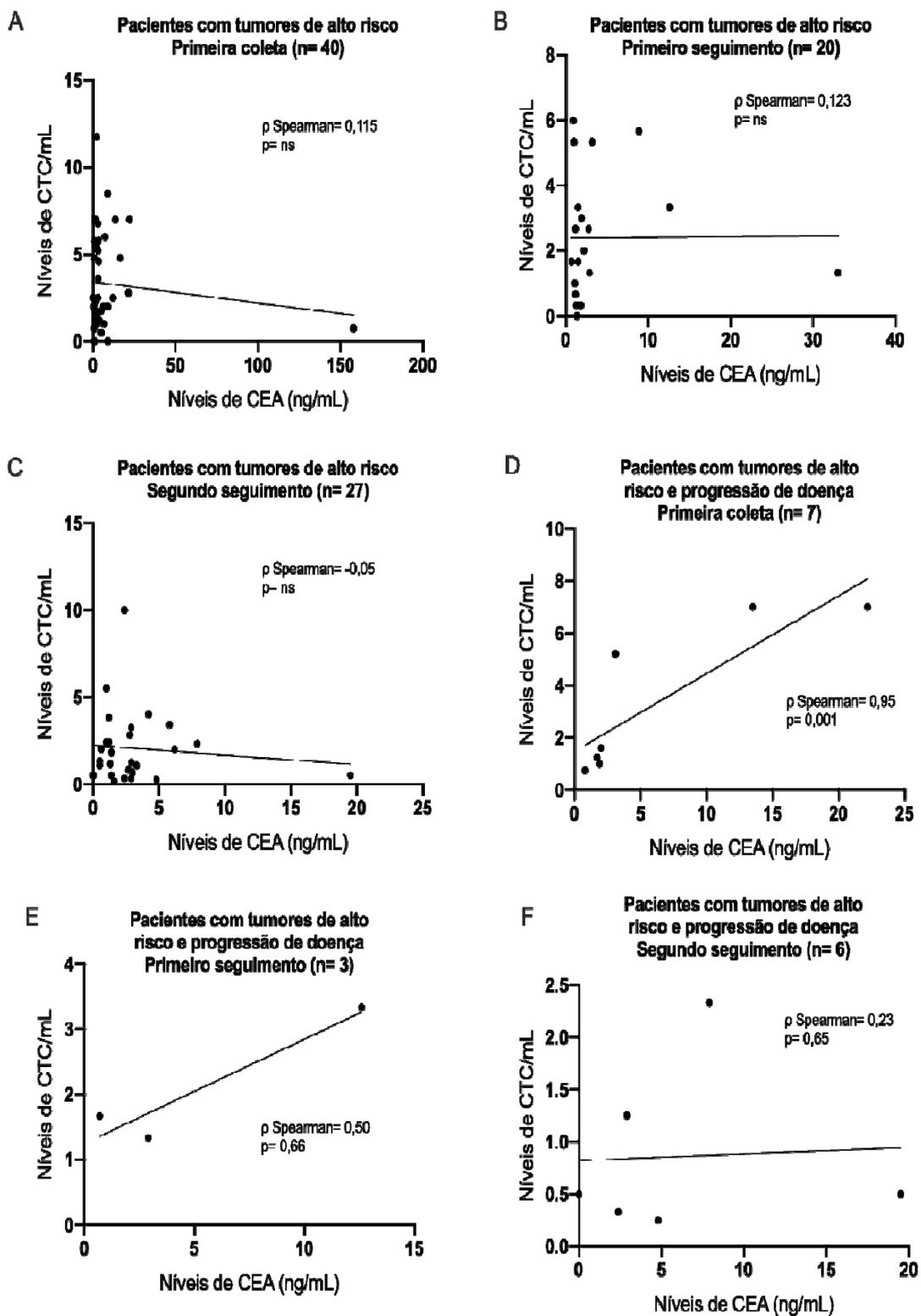


Figura 32 - Gráficos representando o coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA dos pacientes com tumores de alto risco e tratados com quimioterapia adjuvante. **A)** Coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA (níveis de CEA disponíveis em prontuários de 40 casos na primeira coleta; ρ de Spearman= 0,115, $p= 0,48$). **B)** Coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA (níveis de CEA disponíveis em prontuários de 20 casos no primeiro seguimento; ρ de Spearman= 0,123, $p= 0,6$). **C)** Coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA (níveis de CEA disponíveis em prontuários de 27 casos no segundo seguimento; ρ de Spearman= -0,05, $p= 0,77$). **D)** Coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA referentes à primeira coleta nos pacientes que apresentaram recidiva da doença (níveis dos biomarcadores disponíveis em 7/7 casos na primeira coleta; ρ de Spearman= 0,95; $p= 0,001$). **E)** Coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA referentes ao primeiro seguimento nos pacientes que apresentaram recidiva da doença (níveis dos biomarcadores disponíveis em 3/7 casos na primeira coleta; ρ de Spearman= 0,50; $p= 0,66$). **F)** Coeficiente de correlação entre os níveis de CTC e CEA referentes ao segundo seguimento nos pacientes que apresentaram recidiva da doença (níveis dos biomarcadores disponíveis em 6/7 casos na primeira coleta; ρ de Spearman= 0,23; $p= 0,65$).

4.2.4 Expressão Proteica nas CTCs

Avaliamos a expressão das proteínas por imunocitoquímica nas CTCs de 40 pacientes na primeira coleta, de 34 pacientes no primeiro seguimento e de 29 pacientes no segundo seguimento. O número de amostras testadas, positivas e negativas para cada marcador em todos os casos na primeira coleta está representado na **Figura 33**, no primeiro seguimento na **Figura 34** e no segundo seguimento na **Figura 35**.

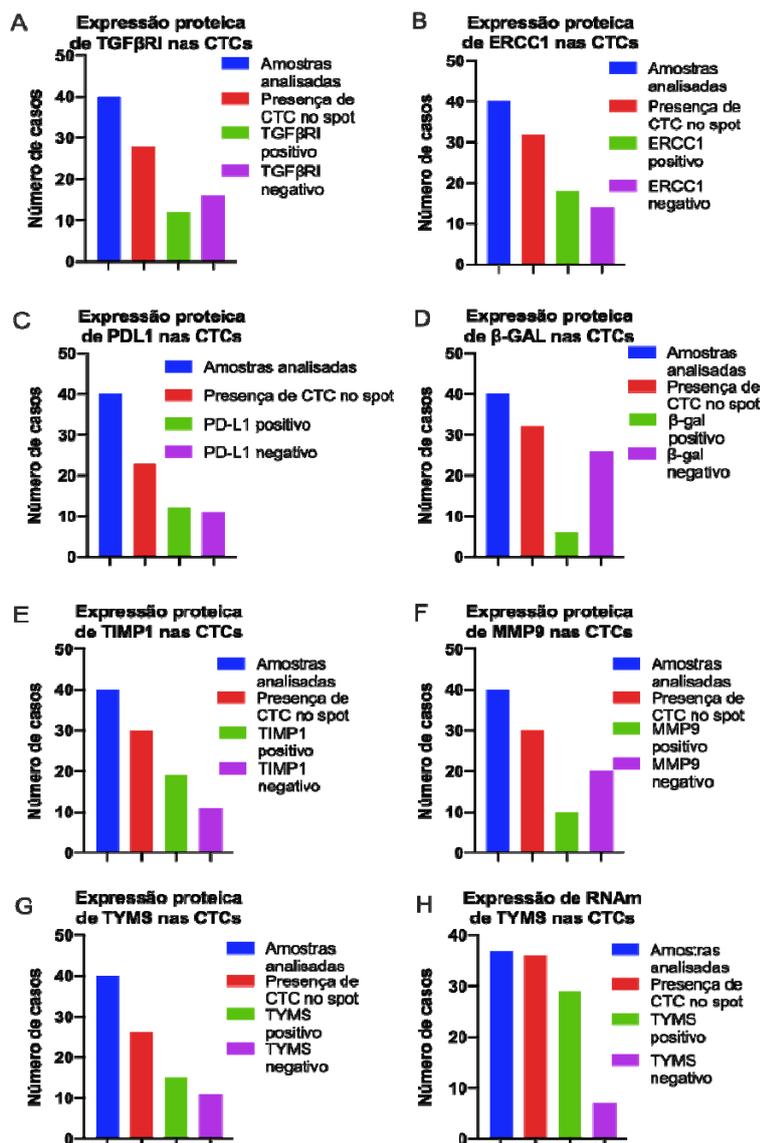


Figura 33 - Número de amostras de CTCs analisadas na primeira coleta, positivas e negativas para cada marcador nos casos de alto risco submetidos ao tratamento adjuvante, para: **A)** expressão proteica de TGFβRI (40 amostras analisadas, 28 com CTCs, 12 positivas e 16 negativas); **B)** expressão proteica de ERCC1 (40 amostras analisadas, 32 com CTCs, 18 positivas e 14 negativas); **C)** expressão proteica de PD-L1 (40 amostras analisadas, 23 com CTCs, 12 positivas e 11 negativas); **D)** expressão proteica de β-galactosidase (40 amostras analisadas, 32 com CTCs, 6 positivas e 26 negativas); **E)** expressão proteica de TIMP1 (40 amostras analisadas, 30 com CTCs, 19 positivas e 11 negativas); **F)** expressão proteica de MMP9 (40 amostras analisadas, 30 com CTCs, 10 positivas e 20 negativas); **G)** expressão proteica de TYMS (40 amostras analisadas, 26 com CTCs, 15 positivas e 11 negativas); **H)** expressão de RNAm de TYMS (37 amostras analisadas, 36 com CTCs, 29 positivas e 7 negativas).

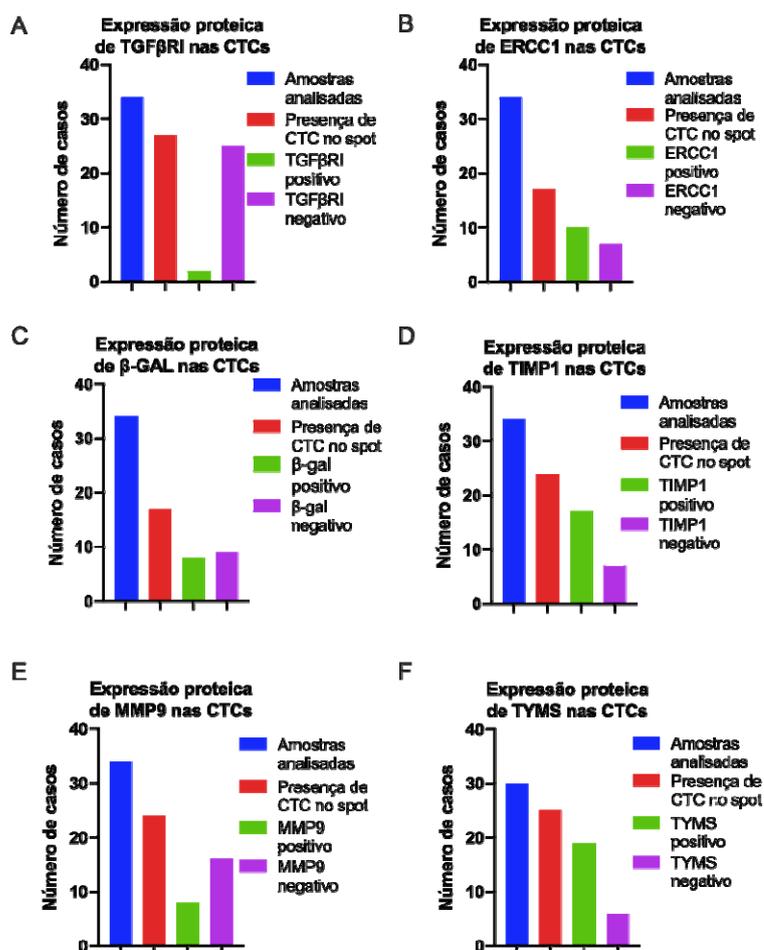


Figura 34 - Número de amostras de CTCs analisadas no primeiro seguimento, positivas e negativas para cada marcador nos casos de alto risco submetidos ao tratamento adjuvante, para: **A)** expressão proteica de TGFβRI (34 amostras analisadas, 27 com CTCs, 2 positivas e 25 negativas); **B)** expressão proteica de ERCC1 (34 amostras analisadas, 17 com CTCs, 10 positivas e 7 negativas); **C)** expressão proteica de β-galactosidase (34 amostras analisadas, 17 com CTCs, 8 positivas e 9 negativas); **D)** expressão proteica de TIMP1 (34 amostras analisadas, 24 com CTCs, 17 positivas e 7 negativas); **E)** expressão proteica de MMP9 (34 amostras analisadas, 24 com CTCs, 8 positivas e 16 negativas); **F)** expressão proteica de TYMS (30 amostras analisadas, 25 com CTCs, 19 positivas e 6 negativas).

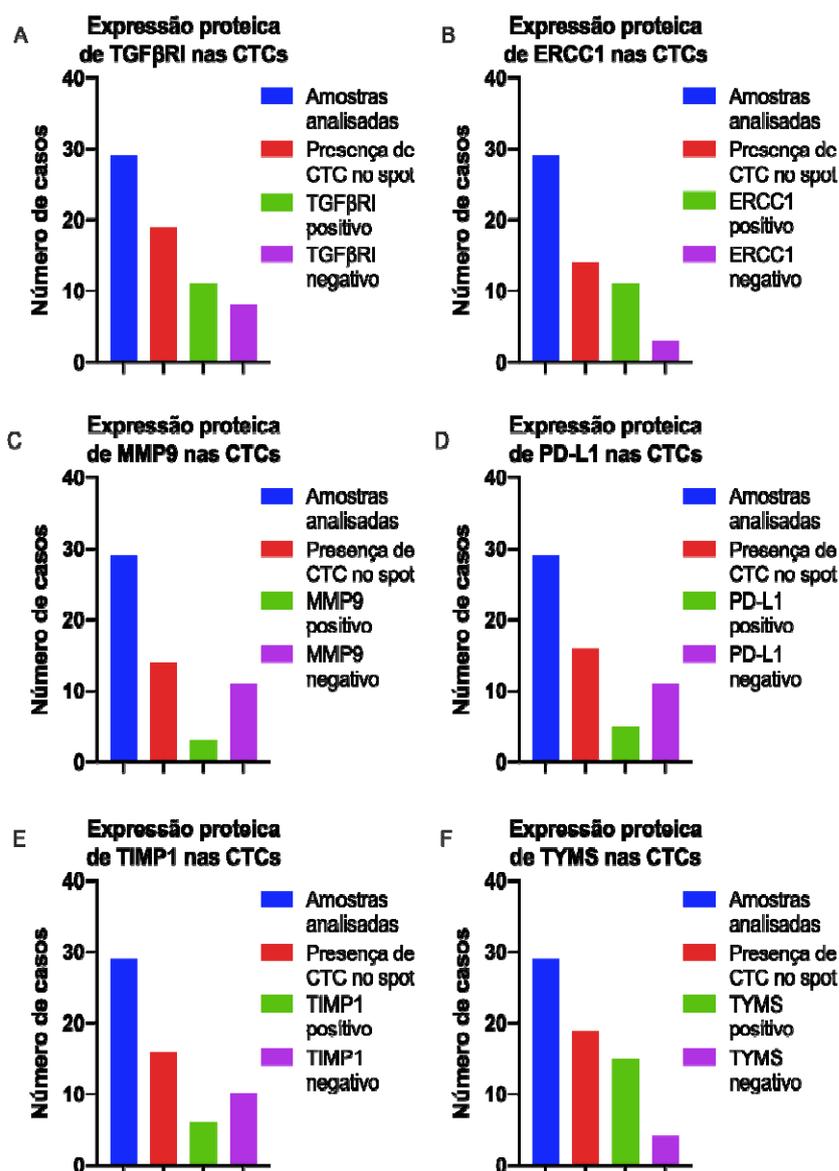


Figura 35 - Número de amostras de CTCs analisadas no segundo seguimento, positivas e negativas para cada marcador nos casos de alto risco submetidos ao tratamento adjuvante, para: A) expressão proteica de TGFβRI (29 amostras analisadas, 19 com CTCs, 11 positivas e 8 negativas); B) expressão proteica de ERCC1 (29 amostras analisadas, 14 com CTCs, 11 positivas e 3 negativas); C) expressão proteica de MMP9 (29 amostras analisadas, 14 com CTCs, 3 positivas e 11 negativas); D) expressão proteica de PD-L1 (29 amostras analisadas, 16 com CTCs, 5 positivas e 11 negativas); E) expressão proteica de TIMP1 (29 amostras analisadas, 16 com CTCs, 6 positivas e 10 negativas); F) expressão proteica de TYMS (29 amostras analisadas, 19 com CTCs, 15 positivas e 4 negativas).

A expressão de cada marcador foi analisada separadamente e é possível observar que as proteínas mais frequentemente encontradas nas CTCs na primeira coleta dos pacientes de alto risco submetidos ao tratamento adjuvante foram: TIMP1 (19 casos), ERCC1 (18 casos) e TYMS (15 casos), seguidos de TGF β RI (12 casos), PD-L1 (12 casos), MMP9 (10 casos) e β -galactosidase (6 casos) (**Figura 33**). No primeiro seguimento, as proteínas mais frequentemente encontradas foram: TYMS (19 casos), TIMP1 (17 casos), ERCC1 (10 casos), MMP9 (8 casos), seguidos de β -galactosidase (8 casos) e TGF β RI (2 casos) (**Figura 34**). No segundo seguimento, é possível observar que a proteína mais frequentemente encontrada expressa nas CTCs é a TYMS (15 casos), seguida de TGF β RI e TYMS (11 casos para ambas as proteínas), e TIMP1, PD-L1 e MMP9 (6, 5 e 3 casos, respectivamente) (**Figura 35**).

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa aos marcadores quando associados aos grupos de estadiamento ou condição de recidiva da doença. Descritivamente, foi notado que todos os pacientes com recidiva de doença, que tinham CTC no *spot* analisado, tiveram a presença de TGF β RI em suas CTCs na primeira coleta (n= 4; p= 0,06). Ainda, foi observado que todos os pacientes com MMP9 em suas CTCs no primeiro seguimento eram do estágio III (n= 8; p= 0,13). Em relação ao segundo seguimento, foi observado que todos os pacientes com recidiva da doença tinham ERCC1 positiva em suas CTCs (n= 4; p= 0,5). Todos os pacientes com ERCC1 positiva em suas CTCs enquadravam-se no estágio III.

Assim como na avaliação da coorte completa (n= 69), não foi encontrada uma relação entre a expressão dos marcadores e SLR dos pacientes estratificados por realização de tratamento adjuvante (n= 40), utilizando a variável de positivo ou negativo nas amostras de primeira coleta. No entanto, para esta coorte de 40 pacientes, foi observado que aqueles com expressão positiva TGF β RI nas CTCs na primeira coleta tiveram uma tendência a SLR inferior quando comparados aos pacientes com CTCs com TGF β RI negativo nas CTCs (p= 0,06; **Figura 36A**).

Na avaliação do primeiro seguimento, pacientes com TIMP1 positivo em suas CTCs tiveram uma tendência a SLR superior, quando comparados aos pacientes com ausência de TIMP1 (p= 0,16; **Figura 36B**). Inversamente, pacientes com MMP9 positivo em suas CTCs no primeiro seguimento tiveram uma tendência a SLR inferior, quando comparados aos pacientes com MMP9 negativo (p= 0,09; **Figura 36C**). No segundo seguimento, é possível observar uma diferença nas curvas de SLR em relação à expressão de ERCC1, porém, sem significância estatística (p= 0,26; **Figura 36D**).

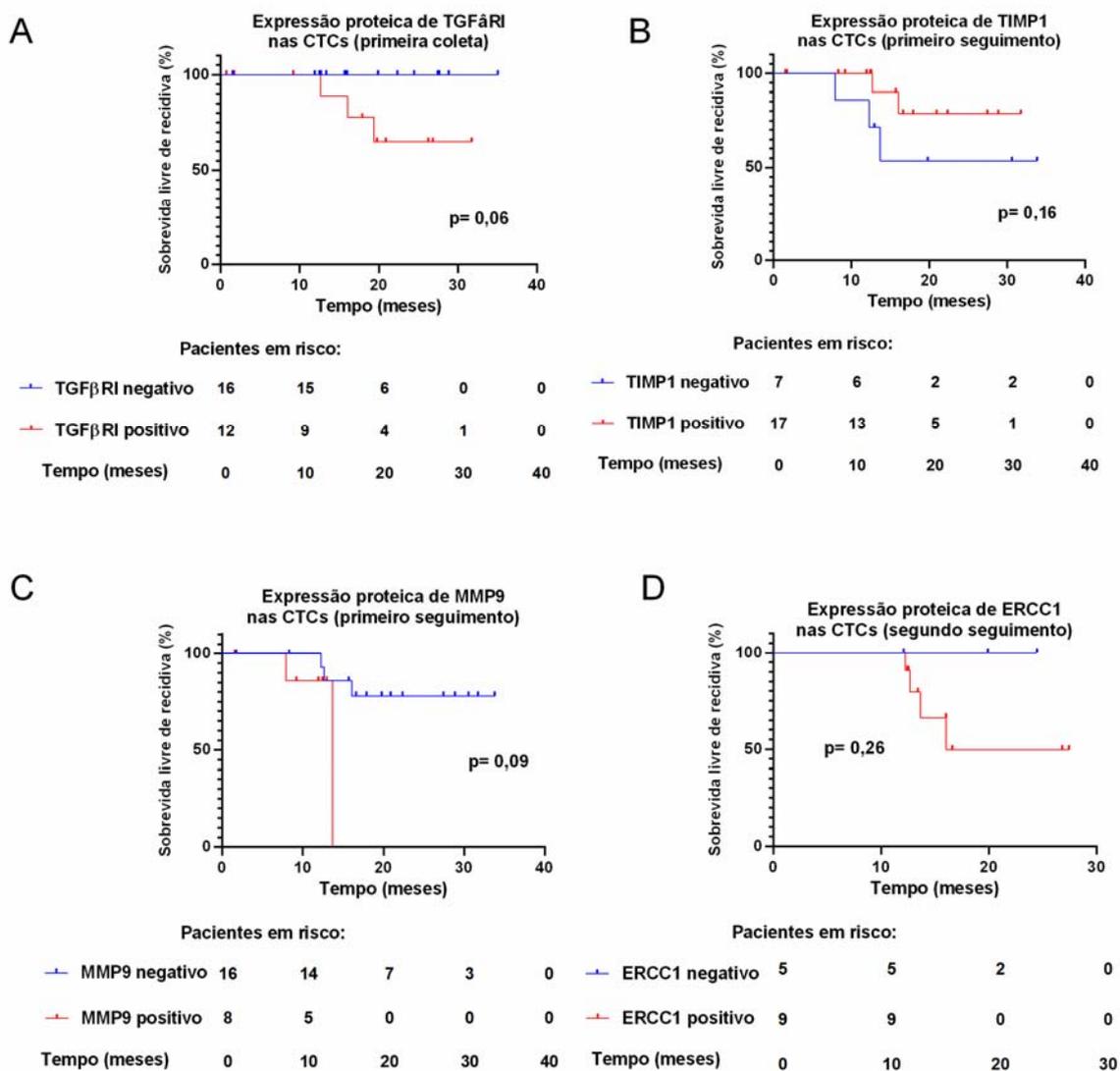


Figura 36 - Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos casos de alto risco tratados com quimioterapia adjuvante de acordo com a expressão dos marcadores escolhidos. **A)** SLR em relação à primeira coleta de acordo com a expressão de TGF β RI (positivo e negativo; $p=0,06$). **B)** SLR em relação ao primeiro seguimento de acordo com a expressão de TIMP1 (positivo e negativo; $p=0,16$). **C)** SLR em relação ao primeiro seguimento de acordo com a expressão de MMP9 (positivo e negativo; $p=0,09$). **D)** SLR em relação ao segundo seguimento de acordo com a expressão de ERCC1 (positivo e negativo; $p=0,26$).

Utilizando o IP de cada marcador nas CTCs $\left(\frac{\text{número de CTCs positivas}}{\text{número total de CTCs no spot}}\right)$, realizamos o teste de sensibilidade e especificidade com a curva ROC para determinação do melhor ponto de corte dos marcadores escolhidos (**Figuras 37, 38 e 39**). Após análises de área abaixo da curva, sensibilidade e especificidade, no primeiro seguimento, foi notado que pacientes com CTCs com IP de ERCC1 $>0,37$ tiveram uma tendência a SLR inferior, quando comparados aos pacientes com IP $\leq 0,37$ ($p= 0,15$; **Figura 40A**). Resultado similar foi observado, também no primeiro seguimento, em relação ao IP, que pacientes com CTCs com IP de MMP9 $>0,26$ tiveram uma tendência a SLR inferior comparados àqueles pacientes que tiveram IP de MMP9 $\leq 0,26$ ($p= 0,1$; **Figura 40B**). No segundo seguimento, foi notado que pacientes com CTCs com IP de ERCC1 $>0,83$ tiveram uma SLR significativamente inferior, quando comparados aos pacientes com IP $\leq 0,83$ ($p= 0,013$; **Figura 40C**).

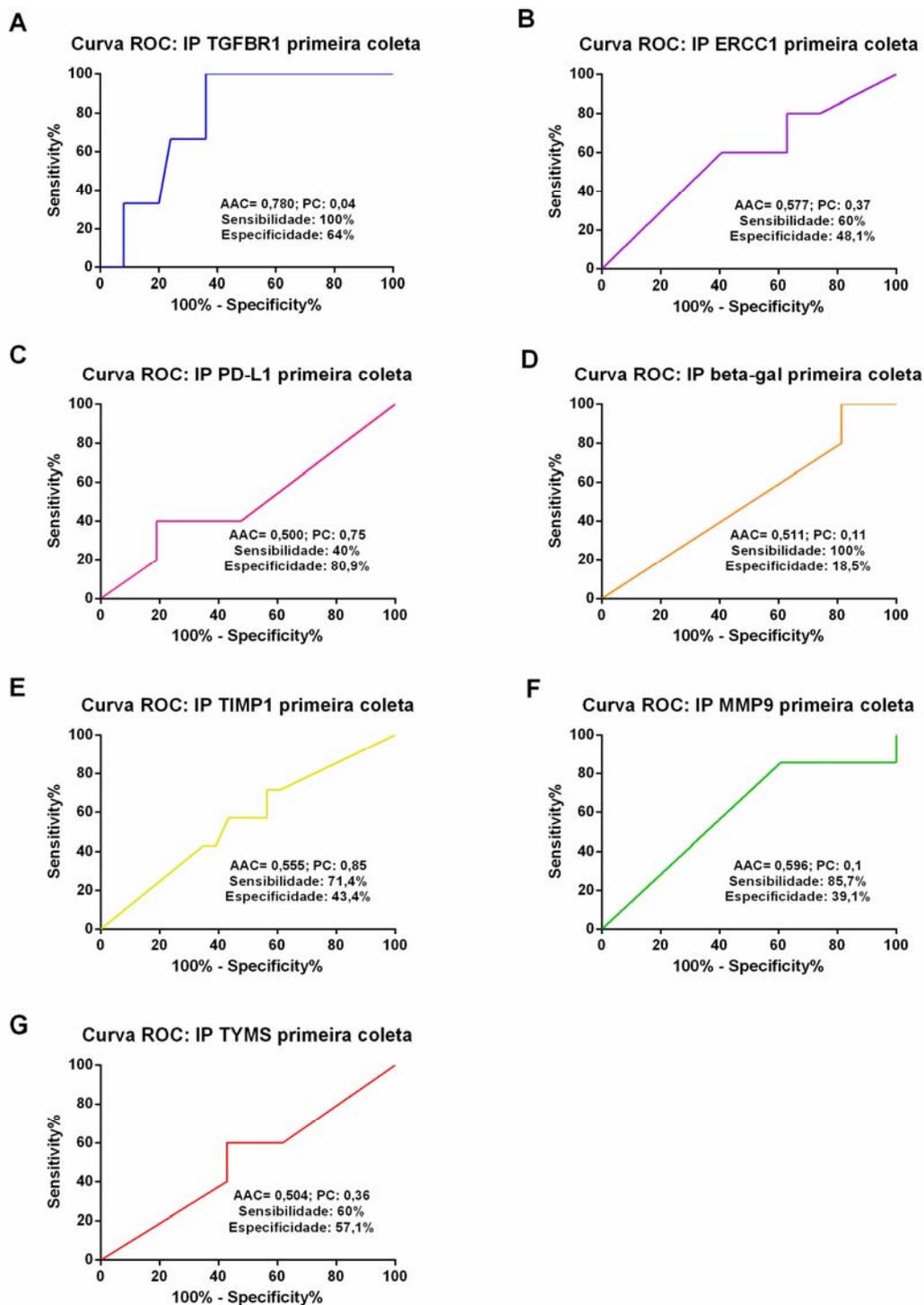


Figura 37 - Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs na primeira coleta (análise em pacientes com tumores de alto risco, submetidos a tratamento adjuvante).

Abreviações: IP: índice de positividade; AAC: área abaixo da curva; PC: ponto de corte.

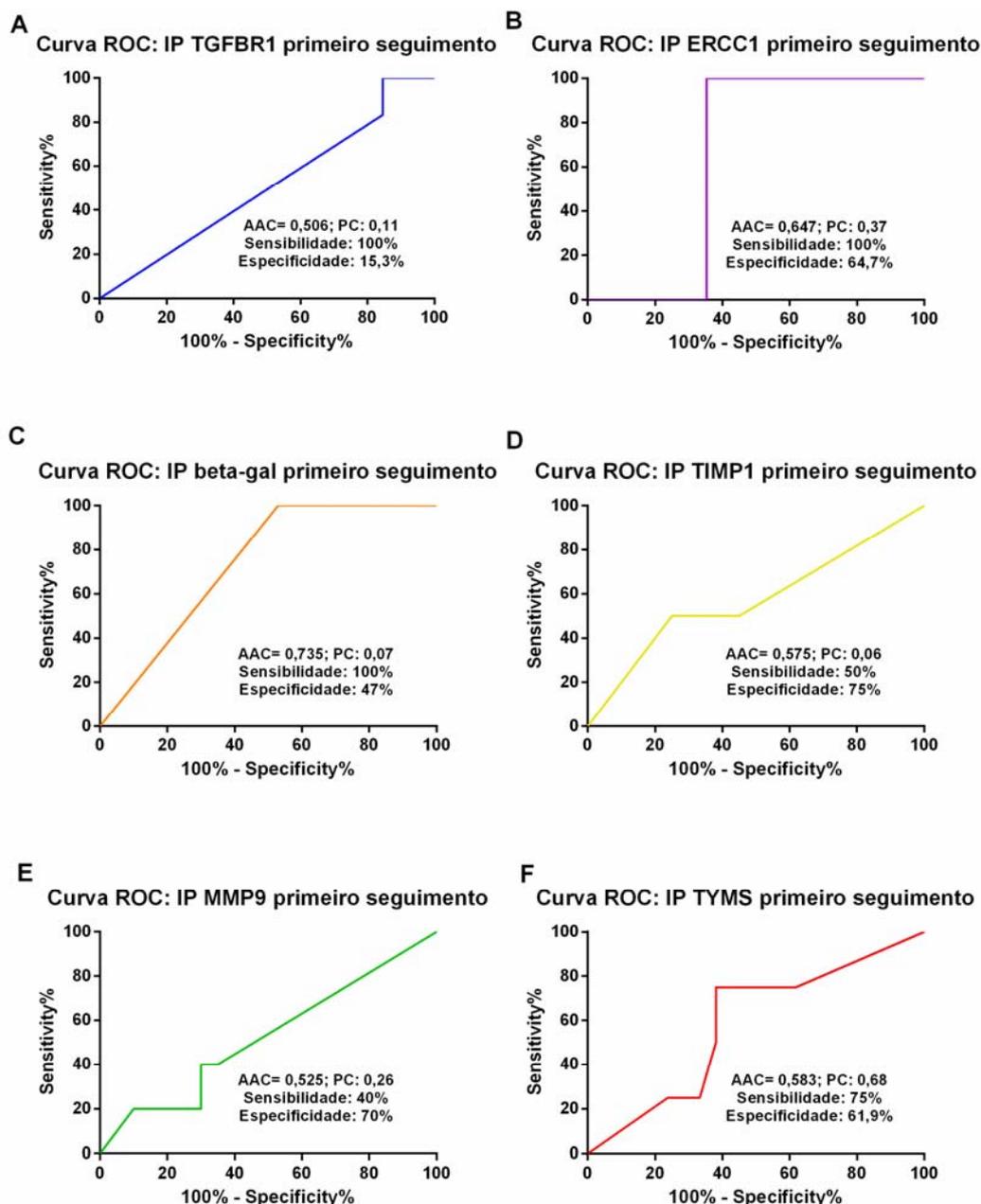


Figura 38 - Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs no primeiro seguimento (análise em pacientes com tumores de alto risco, submetidos a tratamento adjuvante).

Abreviações: IP: índice de positividade; AAC: área abaixo da curva; PC: ponto de corte.

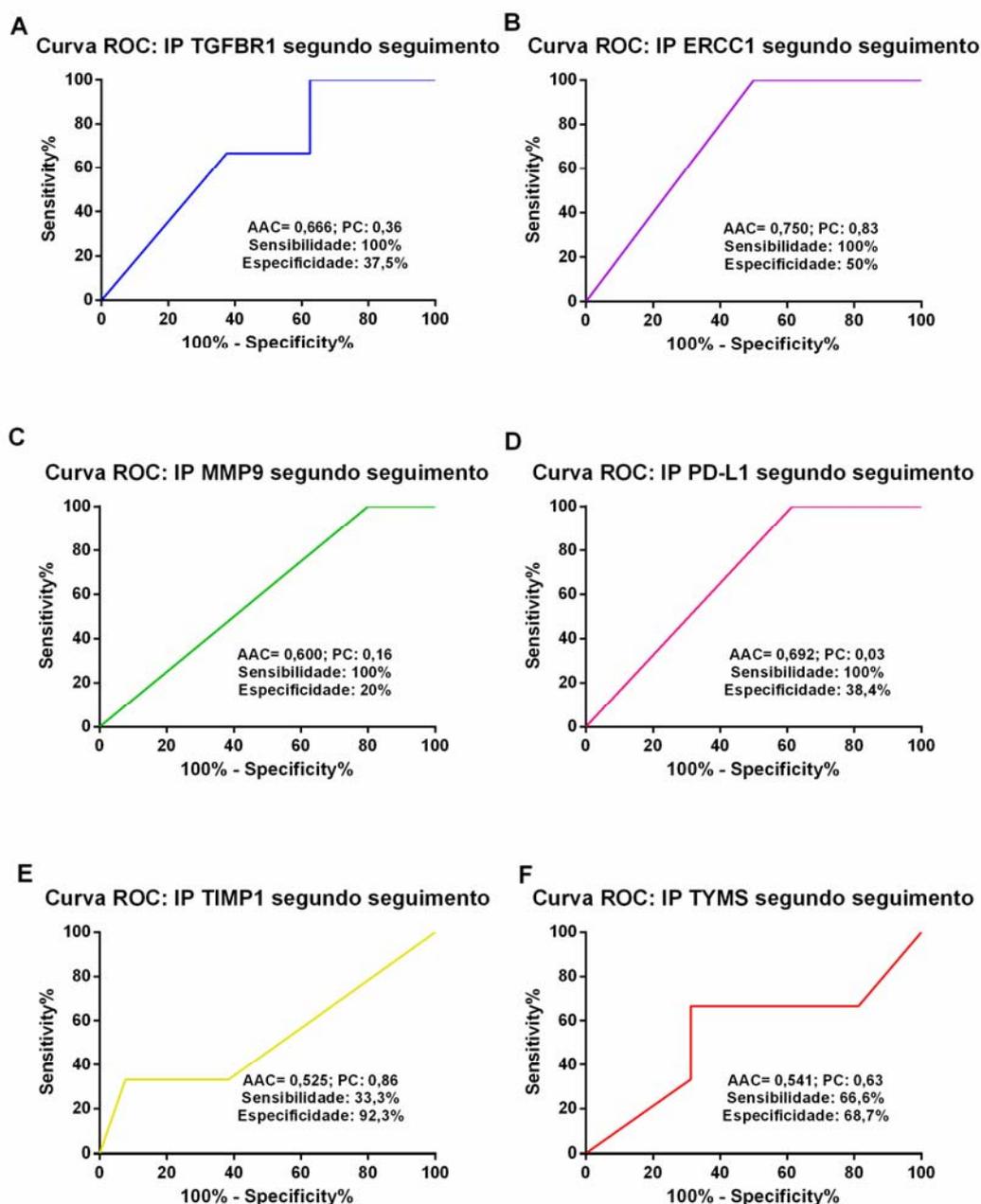


Figura 39 - Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para estimativas de pontos de corte (melhor sensibilidade e especificidade) a partir dos índices de positividade em cada marcador, observados nas CTCs no segundo seguimento (análise em pacientes com tumores de alto risco, submetidos a tratamento adjuvante).

Abreviações: IP: índice de positividade; AAC: área abaixo da curva; PC: ponto de corte

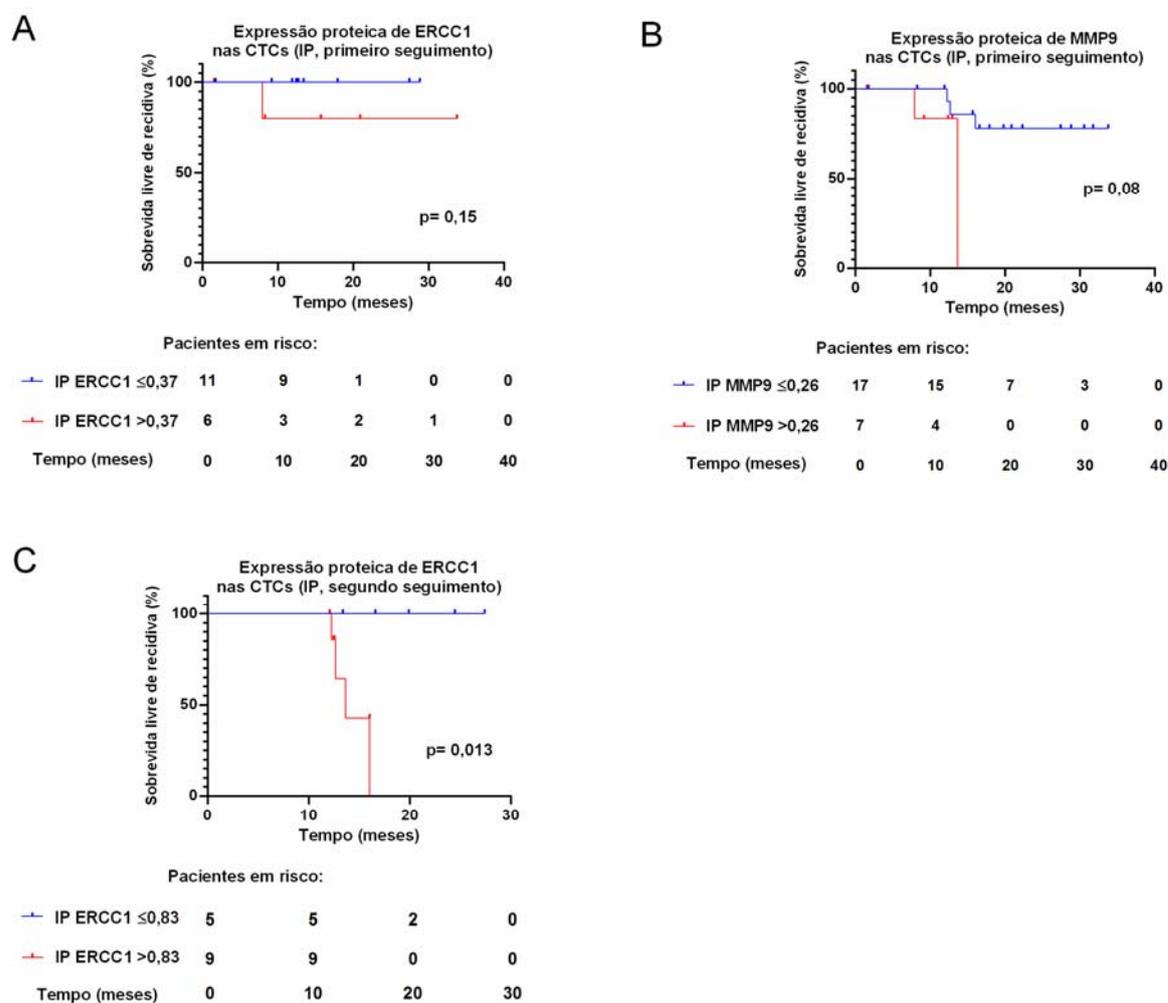


Figura 40 - Gráficos de sobrevida livre de recidiva (SLR) dos casos de alto risco tratados com quimioterapia adjuvante de acordo com o índice de positividade (IP) da expressão dos marcadores escolhidos. **A)** SLR em relação ao primeiro seguimento de acordo com o IP da expressão de ERCC1 ($\leq 0,37$ e $> 0,37$; $p=0,15$). **B)** SLR em relação ao primeiro seguimento de acordo com o IP da expressão de MMP9 ($\leq 0,26$ e $> 0,26$; $p=0,15$). **C)** SLR em relação ao segundo seguimento de acordo com o IP da expressão de ERCC1 ($\leq 0,83$ e $> 0,83$; $p=0,013$).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avalia uma população portadora de câncer de cólon não metastático submetida a tratamento cirúrgico, totalizando o número de 176 coletas seriadas, sendo 69 pacientes inclusos para acompanhamento e 21 pacientes excluídos. As análises foram divididas em módulos: no módulo I, foi abrangida a população total (n= 69, estágios I, II e III); no módulo II foi abrangida a população de alto risco (n= 40, estágios II e III submetidos a tratamento adjuvante). Demograficamente, em ambos os módulos, a porcentagem da população masculina foi ligeiramente predominante (52,2% no módulo I e 55% no módulo II), porém praticamente pareada com a população feminina. A mediana de idade foi de 61 anos no módulo I e de 59 anos no módulo II. Foi observada recidiva da doença em 8 de 69 pacientes (11,6%) no módulo I e em 7 dos 40 (17,5%) no módulo II. Fatores clássicos como estágio T e estágio N avançados foram determinantes de SLR inferior, quando avaliados na casuística total. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação a SLR por outros parâmetros demográficos, clínicos ou patológicos, como idade, lateralidade tumoral, gênero ou estado de mutação de RAS. Em relação à lateralidade, foi demonstrada uma proporção exata de 2:1, sendo duas partes representando o acometimento tumoral no cólon descendente e uma parte representando o acometimento tumoral no cólon ascendente.

5.1 MÓDULO I, TODOS OS PACIENTES

A população estudada no módulo I possui um alto estadiamento patológico, sendo a maioria classificada como estágio III (52,2%), estágio pT 3 ou 4 (65,2%) e estágio pN+ (52,2%). Estes dados refletem o diagnóstico tardio do câncer de cólon. Dos pacientes considerados como de alto risco, submetidos ao tratamento adjuvante, a maioria foi tratada com o regime quimioterápico considerado como “*standard of care*” (82%, FOLFOX ou CAPOX). Foi observado de que houve diferença estatisticamente significativa em relação à distribuição dos níveis de CEA sérico e o estágio patológico, sendo os maiores níveis encontrados no estágio III ($p= 0,007$). Após a análise por comparação múltipla, foi detectada a diferença entre os grupos I e III ($p= 0,007$). Esta observação está de acordo com outros trabalhos relatados na literatura (WANEBO et al. 1978; TONG et al. 2018).

Em relação a todos os pacientes incluídos no estudo, foi encontrada uma alta taxa de detecção de CTCs utilizando o método ISET em todos os momentos do estudo (94,2% na primeira coleta, 94,6% no primeiro seguimento e 96,3% no segundo seguimento). Um estudo demonstrou a detecção de uma porcentagem similar em pacientes com câncer colorretal (83%), utilizando uma metodologia de filtração (Metacell®). Avaliando especificamente a taxa de detecção em câncer de cólon, esta porcentagem aumenta para 89% (ELIASOVA et al. 2017). Comparando nossos dados com os dados da literatura (**Tabela 1**, 25 estudos), notavelmente nosso estudo demonstrou taxas mais altas de detecção. A taxa de detecção dos

outros estudos variou de 6,9% (ROTHÉ et al. 2019) a 83% (ELIASOVA et al. 2017), sendo encontrada uma média de 43,1% de detecção. No entanto, a maioria dos estudos (12/25, 48%) utilizou o método CellSearch para investigação das CTCs, que é o método que apresenta as taxas de detecção mais baixas (COHEN et al. 2008, 2009; HIRAIWA et al. 2008; TOL et al. 2010; AGGARWAL et al. 2013; GAZZANIGA et al. 2013; KUBOKI et al. 2013; SEEBERG et al. 2015; SOTELO et al. 2015; BORK et al. 2015; GERMANO et al. 2018; ROTHÉ et al. 2019) e 40% dos estudos analisaram exclusivamente estágios metastáticos (COHEN et al. 2008, 2009; AGGARWAL et al. 2013; GAZZANIGA et al. 2013; KUBOKI et al. 2013; BARBAZÁN et al. 2014; SEEBERG et al. 2015; NING et al. 2015; SOUZA E SILVA et al. 2016; GERMANO et al. 2018). Apenas 5 estudos avaliaram CTCs exclusivamente em pacientes não metastáticos, a maioria apresentando resultados negativos em relação às CTCs e desfechos clínicos relevantes (SOTELO et al. 2015; BROWN et al. 2018; YANG et al. 2018; ROTHÉ et al. 2019). No entanto, LU e colaboradores (2013), utilizando uma técnica de detecção de mRNA de transcriptase reversa de telomerase humana CK19, CK20 e CEA e avaliando apenas pacientes com estágio patológico III, demonstraram que a presença de CTCs (taxa de detecção: 23,3%) após a quimioterapia adjuvante foi fator preditor independente de recidiva (HR: 6.273; 95% CI: 2.442–16.117) (LU et al. 2013).

Em nosso estudo, avaliando a coorte completa (pacientes com estágios patológicos I-III), foi possível determinar um ponto de corte na

primeira coleta (0,6 CTCs/mL ou 5 CTCs/8mL) e no primeiro seguimento (0,8 CTCs/mL ou 6,5 CTCs/8mL) que separasse a população com e sem recidiva (**Figuras 12A e 12B**), porém, sem uma diferença estatisticamente significativa. No segundo seguimento, foi observada uma queda na quantificação de uma maneira geral. Este resultado pôde ser observado até na maioria dos pacientes com recidiva da doença, resultado que pode ser melhor visualizado na **Figura 14**. Este fato pode levantar a hipótese de que o pico dos níveis de CTCs precede o momento de apresentação clínica da recidiva da doença; portanto, o momento de escolha da coleta pode não ter representado o desenvolvimento da doença conforme o esperado.

Observando a **Figura 9**, representando a mediana de CTCs em cada coleta e em cada grupo de estadiamento, pode-se observar um padrão de queda dos níveis de CTCs ao longo do tratamento, representando uma redução seletiva das CTCs, mas não completa. Analisando a distribuição pelo teste de Wilcoxon de amostras pareadas, foi notado que não houve diferença estatisticamente significativa nesta queda em nenhuma das variáveis analisadas. Esta análise nos leva a crer que o tratamento desempenhe uma influência na queda destas contagens. Da mesma maneira, foi observada uma queda na contagem de MEs ao longo do tratamento, sendo encontrados em 13 de 69 amostras (18,8%) na primeira coleta, em 8 de 56 amostras (14,3%) no primeiro seguimento e em três de 30 (10%) amostras no segundo seguimento. No entanto, a persistência de MEs ao longo do tratamento não foi significativamente determinante de pior SLR até o presente momento.

Partindo do pressuposto de que utilizamos um método independente de marcação para seleção das células, é possível inferir que as CTCs que foram isoladas, ainda que apresentem todos os critérios morfológicos de malignidade podem apresentar capacidades e mecanismos heterogêneos, de acordo com seu clone de origem no tumor primário. Por este motivo, ainda se faz necessário identificar um marcador ou um conjunto de marcadores que classifiquem bem os pacientes curados ou não da cirurgia e respondedores/não-respondedores a determinado quimioterápico nestas células enriquecidas por seu tamanho, possibilitando a observação da população total de CTCs naquela fração de sangue. Ainda, o cálculo do índice de positividade ($\frac{\text{número de CTCs positivas}}{\text{número total de CTCs no spot}}$) foi uma ferramenta que possibilitou ver a taxa de células positivas para cada marcador. Da mesma maneira, a mudança fenotípica (perda ou ganho de expressão de marcadores ao longo do tratamento) pareceu importante, visto que o alto índice de positividade de ERCC1 no segundo seguimento retratou a falta de resposta dos pacientes ao tratamento com oxaliplatina, observado tanto na coorte completa, quanto nos pacientes de alto risco, refletido por uma seleção clonal de células resistentes ao tratamento. Esta hipótese mostra-se como um indicativo de que métodos baseados em detecção de epítomos/antígenos, mesmo que plataformas *multiplex*, perdem CTCs pelo fato de sua ampla heterogeneidade e instabilidade genômica, conforme já descrito em revisões sobre metodologias de enriquecimento de CTCs (FERREIRA et al. 2016; BANKÓ et al. 2019).

Analisando os 8 pacientes que apresentaram recidiva da doença (**Figura 14**), é possível observar diferentes padrões de expressão dos marcadores, indicando diferentes mecanismos ao longo do curso da doença, com reprogramações em relação à invasão, inibição da invasão, resistência aos quimioterápicos receitados (5-fluorouracil, capecitabina, oxaliplatina).

Ainda falando sobre as CTCs na coorte completa, foi possível observar uma diferença numérica na distribuição de CTCs na primeira coleta, avaliando pacientes com tumores pT1+pT2 *versus* pT3+pT4, visto que a mediana foi maior no segundo grupo (pT3+pT4: 2,5/mL) quando comparada ao primeiro grupo (pT1+pT2: 2,2/mL), $p=0,15$.

Para nosso conhecimento, até o presente momento, este foi o primeiro estudo que apresentou resultado estatisticamente significativo em relação ao aumento no nível de CTCs na primeira coleta e no primeiro seguimento nos pacientes tabagistas/ex-tabagistas quando comparados aos não tabagistas.

De acordo com a experiência de nosso grupo, a presença de MEs (grupos de 3 CTCs ou mais) depende do tipo tumoral. Em dados não mostrados, possuímos evidências de que eles são encontrados em alta frequência em tipos específicos de tumores, como por exemplo, câncer de cabeça e pescoço e cancer gástrico. Por outro lado, este tipo de estrutura não foi encontrado em câncer de reto localmente avançado, utilizando a metodologia ISET. De acordo com FRIEDL e colaboradores (2012), os diferentes modos de invasão celular se dão por mecanismos celulares e moleculares variados inerentes ao tumor, como, por exemplo, as diferenças

de padrão histológicas, mecanismos autônomos célula-específicos ou sinalizações provenientes do microambiente local (FRIEDL et al. 2012).

Neste estudo, encontramos uma alta frequência de MEs no sangue venoso de pacientes com estágio patológico I. A presença de MEs foi detectada em 6 dos 18 casos de estágio I da doença na primeira coleta, representando 33,3% dos casos. O número total de casos em que foi observada a presença de MEs foram 13 casos, sendo a maioria em estágio I (6 casos, 46,15%). A presença de MEs já foi demonstrada em estágios iniciais de câncer de pulmão, indicando o potencial uso desta ferramenta no diagnóstico de malignidade (MASCALCHI et al. 2016, 2017) e para predição de pior prognóstico (MURLIDHAR et al. 2017).

Em nossa casuística, a presença de MEs não indicou necessariamente uma evolução ruim para os pacientes até o presente momento. O fato de termos encontrado estas estruturas em estágios iniciais nos lança a hipótese de que esta forma de migração pode representar o início da doença e formação de micrometástases que podem ou não atingir o sucesso em relação à sobrevivência e proliferação celular no sítio distante. O destino final destas células pode depender de diversos fatores: 1) MEs possuem meia-vida mais curta que as CTCs, explicados pelo tamanho da estrutura e rápida retenção em pequenos capilares localizados ao redor do tumor. Considerando que a maioria das tecnologias utiliza sangue periférico para analisar os componentes da biópsia líquida, é importante enfatizar a possível contagem incorreta, resultando em não-representatividade do *status* da doença (ACETO et al. 2014); 2) eliminação por sistema

imunológico ou falta de comunicação celular, por citocinas, quimiocinas e pelo próprio microambiente tumoral; 3) dormência em sítios de micrometástases por anos. Por estes motivos, acreditamos que precisamos realizar um seguimento com um tempo mais longo destes pacientes para melhor entender estes achados.

O tratamento padrão para pacientes com câncer de cólon é a cirurgia, seguida de tratamento adjuvante com FOLFOX ou XELOX, para pacientes de alto risco. No entanto, é importante ressaltar que não são todos os pacientes que se beneficiam do tratamento com a quimioterapia, pois uma parte dos pacientes é curada com a cirurgia por si só e outra parte possui células tumorais que são resistentes ao tratamento proposto. Fatores preditivos ainda são escassos para esta população. Para nosso conhecimento, analisamos os pacientes de câncer de cólon estágio II separadamente do restante da população, a fim de determinar um ponto de corte de CTCs para auxiliar na determinação de risco deste grupo de pacientes. De acordo com MARSHALL (2010), aproximadamente 75% dos pacientes deste grupo são curados com tratamento cirúrgico, sem necessidade de abordagem adjuvante. No entanto, os 25% restantes precisam ser identificados após a cirurgia, de acordo com os fatores de risco já conhecidos, como histologia pouco diferenciada (na ausência de instabilidade microssatélite), invasão linfática, vascular ou perineural, obstrução ou perfuração intestinal, margens positivas, ou menos do que 12 linfonodos examinados. Neste estudo, apenas um paciente dos 15 com estágio II incluídos apresentou recidiva de doença, tornando inviável a

análise de eficiência do tratamento nos pacientes neste estágio considerados como alto risco (n= 6).

Ainda falando da coorte completa, analisamos coeficiente de correlação de postos de Spearman de CTCs e de CEA nos três momentos analisados. No entanto, não encontramos correlações significativas entre os marcadores analisados (**Figura 13**).

Durante o período de doutorado, padronizamos a técnica de hibridização *in situ* cromogênica para avaliar a presença de RNAm de TYMS nas CTCs. No entanto, até o momento da última análise, não encontramos significância clínica com a presença da proteína TYMS. Para câncer de reto localmente avançado, em trabalho recentemente publicado por nosso grupo, a presença de RNAm de TYMS antes do tratamento com quimiorradioterapia neoadjuvante foi indicativa de não resposta ao tratamento. Além do mais, a presença da proteína TYMS após o tratamento neoadjuvante também indicou pior prognóstico, mostrando previamente que os resultados entre RNAm e proteína não são necessariamente concordantes (TRONCARELLI FLORES et al. 2019). Apesar de surpreendente, este é um resultado esperado, visto que células tumorais possuem mecanismos complexos de desregulação e reprogramação da tradução de RNAm para proteínas (SILVERA et al. 2010).

Os marcadores aqui escolhidos foram baseados em resultados preliminares *in vitro* ou *in vivo* por desempenharem funções importantes no desenvolvimento e agressividade do câncer, além de resistência ao tratamento. No entanto, dentre as proteínas escolhidas, existem outras

centenas de proteínas que agem em conjunto, como por exemplo, outros membros da família das metaloproteinases (MMP2, MMP7) (SAID et al. 2014) ou outras proteínas que fazem parte da maquinaria de reparo ao dano ao DNA. O ERCC1, outro exemplo, age em dupla com o XPF para formar uma nuclease bipartida essencial para o reparo de NER (*nucleotide excision repair*) e ligações cruzadas entre as fitas e participa do reparo de quebra de dupla-fita de DNA (AHMAD et al. 2008).

Em relação à análise por PCR digital de mutação de *KRAS* (códon 61, n= 1) e *NRAS* (códon 61, n= 2), foi encontrada 100% de concordância nos três casos analisados. Já em relação aos códons 12 e 13 de *KRAS*, a porcentagem de mutação nas CTCs (18 de 53, 34%) foi similar à quantidade de amostras com mutação no tumor primário (17 de 53, 32%). No entanto, a concordância de resultados, tanto para mutação quanto para ausência de mutação nos dois compartimentos tumorais, apresentou-se em 28 casos (acurácia: 52,8%, p= 0,63). Todas as reações foram realizadas com um controle positivo, um controle negativo e um branco. Os resultados obtidos mostram uma ampla heterogeneidade nos perfis genéticos das células que estavam sendo analisadas. O que era esperado, já que a população encontrada em uma análise de biópsia líquida é variável, pensando tanto na temporalidade quanto nas diferentes regiões/clones do tumor primário, representando populações celulares heterogêneas. Neste estudo, foram avaliadas CTCs de todos os pacientes (n= 53) que possuíam laudo de mutação nos genes de interesse. Considerando que os tumores são extremamente dinâmicos em relação a seus mecanismos de proliferação e

sobrevivência, e que estes pacientes com tumores não metastáticos não são suscetíveis a tratamento com anti-EGFR, devido à ausência de benefício em estudo randomizado de fase 3 (ALBERTS et al. 2012), é importante ressaltar que estes testes devam ser repetidos em caso de recidiva da doença e eventual indicação a este tipo de tratamento.

Estudo realizado em 2016 demonstrou que PCR digital apresenta alta sensibilidade, com a capacidade de detecção de mutação em uma taxa de 0,05% em menos de uma célula mutante por mL para o gene *KRAS* em sangue total, quando comparados com aproximadamente 0,5% em 50-75 células para TaqMeltPCR e HRM. Avaliando os 35 pacientes com câncer colorretal em diversos estágios, foi encontrada uma concordância de 77% com sensibilidade de 83%, ressaltando que o material genético foi pré-amplificado por WGA (*whole-genome amplification*) (DENIS et al. 2016). Estudo prévio comparando o perfil genético de CTCs com tumor primário de pacientes com câncer colorretal metastático, demonstrou mutações pelas técnicas de CGH-Array e NGS inicialmente nas CTCs, que estavam presentes em níveis mais baixos no tumor primário e em metástases, consideradas, então, mutações clonais e subclonais (HEITZER et al. 2013). Esta observação foi mais tarde realizada em tumores de próstata resistentes à castração metastáticos pela técnica de sequenciamento de exoma completo (LOHR et al. 2014). CHEMI e colaboradores (2019) avaliaram CTCs provenientes da veia pulmonar de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas antes do procedimento cirúrgico curativo. Eles observaram mais similaridade no perfil genético das CTCs (a nível de *single*

cell) com a metástase (91%), do que com o tumor primário (79%), sugerindo, então, que as CTCs podem servir como uma ferramenta de predição de recorrência precoce neste grupo de pacientes (CHEMI et al. 2019).

Outro fator que se encontra como objeto de estudo para melhor elucidar os mecanismos em que as CTCs utilizam para sobreviver na corrente sanguínea, é a interação com outras células do sangue e sistema imunológico, como neutrófilos, plaquetas e macrófagos. Com este mecanismo de interação, as CTCs adquirem maior capacidade de sobrevivência na corrente sanguínea (HEEKE et al. 2019). Além disso, a comunicação célula a célula no microambiente dos MEs certamente oferece vantagens para uma sobrevivência celular bem-sucedida na corrente sanguínea. Neste trabalho, objetivamos verificar alguns dos elementos do sistema imunológico que possam indicar pior prognóstico, quando avaliados em conjunto com as CTCs, como as taxas entre linfócitos e neutrófilos (NLR) e taxas entre plaquetas e linfócitos (PLR), com dados obtidos dos prontuários dos pacientes. Ainda, no final do projeto, conseguimos avaliar o perfil imunológico dos pacientes por meio de análise de citometria de fluxo.

O fato de termos encontrado uma tendência de distribuição de níveis maiores de PLR em pacientes com MEs, inclusive em estágios iniciais do câncer de cólon corrobora a hipótese de sinalização entre CTCs e plaquetas. Ainda, pacientes com alta PLR (>124) apresentaram uma SLR significativamente inferior, demonstrando a interação entre altos níveis de plaquetas e a recidiva do câncer. Alta PLR já foi demonstrada em uma metanálise como preditora de pior SG quando avaliada em 13.964 diversos

tumores derivados de 26 estudos (HR de 1,60 (IC95%: 1,35-1,90) e confirmada em subgrupo de câncer colorretal (HR=1,65, 95%CI: 1,33-2,05) (ZHOU et al. 2014).

Observamos por microscopia de campo claro, elementos do sistema imunológico co-agregados em MEs de CTCs, como plaquetas, linfócitos e neutrófilos, em 6 dos 13 casos com presença de MEs na primeira coleta. Plaquetas, juntamente com fibrinas, podem proteger as células tumorais como um escudo físico da lise mediada por células *natural killer* em camundongos, aumentando o potencial metastático (NIESWANDT et al. 1999; PALUMBO et al. 2005). Fatores derivados de plaquetas induzem TEM no tumor (LABELLE et al. 2011) e nas CTCs (FANELLI et al. 2017), através da sinalização de TGF β . Assim, embora a ocorrência de TEM nas células tumorais seja comum e possa influenciar em muitos aspectos da biologia do câncer, como a quimiorresistência, por exemplo, seu papel nas metástases, tanto nas CTCs quanto nos MEs, não é claro (ZHENG et al. 2015). Para nosso conhecimento, já foi desenvolvida uma plataforma microfluídica que isola CTCs e MEs de acordo com a cobertura destas células por plaquetas, possibilitando o isolamento de CTCs tanto com fenótipo epitelial, quanto mesenquimal, além de *clusters* de CTCs (MEs), contudo, ainda não está disponível para comercialização (JIANG et al. 2017).

Por último, nosso resultado de estudo piloto avaliando CTCs e populações do sistema imunológico por citometria de fluxo, demonstrou uma correlação positiva entre o número de CTCs por mL e porcentagem de células T-Reg ($\rho= 0,88$, $p= 0,01$). Inversamente, foi encontrada uma

correlação negativa entre o número de CTCs por mL e porcentagem de linfócitos T totais (CD3+) ($\rho = -0,88$, $p = 0,01$). Embora com um número pequeno de amostras, esta análise nos possibilita inferir uma interação entre estes subgrupos celulares. Em condições normais, células T-Reg representam uma população menor de células T que têm como função manter a homeostase no sistema imune. Em uma situação em que o câncer se desenvolve, estas células regulam de maneira negativa a resposta contra o tumor, possibilitando, assim a promoção do crescimento tumoral, progressão, metástase, podendo ser responsáveis por recorrência e resistência ao tratamento. Além disto, estas células ativam múltiplos sinais, como TGF β 1 e *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1). Um estudo demonstrou que células T-Reg infiltrando o tumor de pacientes com câncer de mama são significativamente mais prevalentes nas pacientes com CTCs detectáveis (XUE et al. 2018).

Ao contrário, células T citotóxicas (CD8+) são consideradas como imuno-efetoras e têm interações negativas com células reguladoras (revisado por NAJAFI et al. 2019), corroborando nossos resultados em relação ao coeficiente de correlação com CTCs. Estudo publicado em 2017, utilizando uma metodologia denominada CanPatrol CTC *enrichment*, que filtra a CTCs de acordo com seu tamanho, seguido de hibridização *in situ* de RNA com marcadores epiteliais e mesenquimais, demonstrou que pacientes com câncer colorretal com presença de CTCs tinham uma contagem inferior de linfócitos quando comparados aos pacientes com CTCs negativas (WU et al. 2017). Resultados similares, tanto para a correlação positiva entre CTCs

e TReg, quanto para a correlação negativa entre CTCs e linfócitos CD3+, foram observados em câncer de mama inflamatório (MEGO et al. 2016) e em câncer de pulmão de células não pequenas (YE et al. 2017).

5.2 MÓDULO II, PACIENTES COM TUMORES DE ALTO RISCO

Neste trabalho, avaliando os pacientes considerados de alto risco, interessante é possível notar que os resultados em relação à SLR inferior com CTCs altas se mantiveram na primeira coleta e no primeiro seguimento, eliminando a possibilidade de que estágios iniciais possam ter interferido na análise. No entanto, o ponto de corte foi ligeiramente modificando, sendo, portanto, 0,7 CTCs/mL de sangue, tanto na primeira coleta, quanto no primeiro seguimento. Importante ressaltar que quando arredondamos o valor do ponto de corte para 5 CTCs/8 mL de sangue, estas análises de sobrevida se mantêm. TSAI e colaboradores (2016), utilizando a plataforma CmX (lipídios biomiméticos revestindo dispositivo microfluídico para isolar CTCs viáveis), demonstraram que o desenvolvimento de metástase à distância em pacientes não metastáticos foi maior no grupo em que foi observada a presença de ≥ 5 CTCs/2 mL, quando comparado ao grupo com < 5 CTCs/2 mL (TSAI et al. 2016).

Ainda nesta coorte estratificada, pacientes que tinham a expressão de TGF β R1 em suas CTCs na primeira coleta, expressão negativa de TIMP1 e positiva de MMP9 no primeiro seguimento e de ERCC1 no segundo seguimento, não responderam ao tratamento adjuvante, mostrando que

estes marcadores, quando avaliados em conjunto, podem ser úteis no monitoramento do câncer de cólon.

No CCR, há uma secreção aumentada de ligantes da família TGF β tanto pelo estroma quanto pelas células epiteliais, levando à secreção autócrina aumentada, regulação imune e TEM, bem como proliferação de fibroblastos e supressão do crescimento de células tumorais (JUNG et al. 2017). Portanto, a inibição do TGF β pode ser uma alternativa promissora nesse contexto. O Galunersitibe (LY2157299), é uma pequena molécula inibidora da atividade quinase do TGF β RI (BUENO et al. 2008)18/12/2019 10:09:00, com inibição correspondente da sinalização *downstream* por meio de inibição de fosforilação de SMAD. Esta molécula mostrou efetividade no tratamento de pacientes com hepatocarcinoma avançado (FAIVRE et al. 2019) e em combinação com gemcitabina em câncer de pâncreas não ressecável (MELISI et al. 2018). Ainda, já foi demonstrado *in vivo*, em camundongos imunodeficientes inoculados com células tronco de câncer de cólon, que há um acúmulo de SMAD2 fosforilado nas células estromais, e que depois do crescimento tumoral, o tratamento com LY2157299, além de reduzir a positividade de SMAD2 fosforilado nas células estromais, reduziu a formação de tumores e de metástases hepáticas (CALON et al. 2012).

Outras moléculas baseadas no bloqueio de TGF β RI estão em estudo em fase de desenvolvimento pré-clínico, como por exemplo, EW-7197, SB-431542 e SB-505124 (GlaxoSmithKline), SD-093 e SD-208 (Scios) e LY580276 (*Lilly Research Laboratories*) (HJELMELAND et al. 2004; SUBRAMANIAN et al. 2004; UHL et al. 2004; SAUNIER e AKHURST 2006;

JIN et al. 2014) e em estudo de escalonamento de dose (YL-13027) (XU et al. 2017) (NCT03869632).

Importante também enfatizar que além da contagem de CTCs e da avaliação da expressão dos marcadores neste grupo estratificado, o índice de positividade pareceu um fator importante para separar significativamente os pacientes respondedores e não respondedores no segundo seguimento, 6 meses após o fim do tratamento. Um marcador relevante neste momento, foi o ERCC1, marcador de resistência à platina, que mostrou que a quantidade de células positivas para este marcador (índice de positividade, **Figuras 40A e 40C**) em cada caso, no primeiro e no segundo seguimento foi mais importante do que apenas ver se ERCC1 estava presente ou ausente (**Figura 36D**). Da mesma maneira, o índice de positividade alto de MMP9 pareceu influenciar em pior SLR, quando avaliada no primeiro seguimento ($p= 0,08$; **Figura 40B**), resultado similar ao obtido com a estratificação entre positivo e negativo ($p= 0,09$; **Figura 36C**).

A abordagem mais desafiadora é reconhecer um único mecanismo responsável pela falta de resposta ao tratamento. ERCC1 aparecendo no último seguimento na maioria dos pacientes refratários ao tratamento pode ser um valioso indicador. O fato de termos escolhido este momento (6 meses após o fim do tratamento) nos dá uma ideia em relação a um dos mecanismos biológicos tumorais envolvidos na resistência ao tratamento. Talvez esta avaliação deva ser realizada com menos tempo de seguimento para possibilitar uma intervenção (mudança no regime quimioterápico) ou

abordagem (dosagem maior) diferente antes da doença manifestar-se clinicamente.

Enzimas proteolíticas secretadas pelas células, como as metaloproteinases de matriz (MMPs), desempenham a função de clivar proteínas da matriz extracelular, facilitando a migração celular, removendo barreiras, como, por exemplo, colágenos, fibronectinas e elastinas (STAMENKOVIC 2003). Estas enzimas participam ativamente na invasão de células tumorais em tecidos adjacentes e na formação de metástases (FARINA e MACKAY 2014). Além disto, desempenham papel de alterar as interações célula-célula e célula-matriz extracelular, clivagem em proteínas na superfície celular e também no ambiente extracelular (FIORE et al. 2002; VAISAR et al. 2009).

Neste estudo, pacientes com MMP9 positivo em suas CTCs no primeiro seguimento tiveram uma tendência a SLR inferior, quando comparados aos pacientes com MMP9 negativo ($p= 0,09$; **Figura 36C**). Da mesma maneira, pacientes com CTCs com IP de MMP9 $>0,26$ tiveram uma tendência a SLR inferior comparados àqueles pacientes que tiveram IP de MMP9 $\leq 0,26$ ($p= 0,1$; **Figura 40B**). De acordo com estes achados, estudos prévios demonstraram a expressão de MMP1 em tumores de pacientes com câncer de mama em estágio inicial associada com o fenótipo de TEM nas CTCs, sugerindo, então, uma conexão entre MMP1 e CTC, que pode favorecer a disseminação tumoral (CIERNA et al. 2014). Níveis séricos de MMP2 foram significativamente maiores em pacientes com câncer de mama HER2+ que desenvolveram metástase no sistema nervoso central,

assim como a presença de CTCs foi um fator preditivo negativo de SG nestas pacientes. No mesmo estudo, foi verificado que níveis séricos de MMP9 foram significativamente correlacionados com recidiva da doença no grupo de câncer de próstata resistente à castração (SKERENOVA et al. 2017). Corroborando estes resultados apresentados, um estudo publicado recentemente desenvolveu um dispositivo microfluídico funcional integrado que, além de enriquecer as CTCs, quantifica a secreção de MMPs provenientes das CTCs. Demonstraram que a atividade das CTCs foi mais alta do que os leucócitos dos mesmos pacientes, sugerindo processos proteolíticos ativos nas CTCs de pacientes com câncer de próstata (DHAR et al. 2018).

Por outro lado, já foi demonstrado que a super-expressão de TIMP1 induzida por vetores adenovirais em células de tumor de pâncreas, injetadas em camundongos *nude*, foi fator preditor protetor para sobrevida ($p < 0,009$), comprovando a hipótese de que super-expressão de TIMP1 pode reverter o fenótipo invasivo (RIGG e LEMOINE 2001). Da mesma maneira, no presente estudo, foi observado que pacientes com TIMP1 positivo em suas CTCs após a cirurgia apresentaram uma tendência a SLR superior em relação aos negativos ($p = 0,16$).

Estudos prévios avaliando a importância de CTCs em câncer colorretal encontraram correlação positiva entre os níveis de CTCs e CEA (ZHAO et al. 2017; WANG et al. 2019). Neste trabalho, olhando a coorte de pacientes com câncer de cólon de alto risco, não encontramos uma correlação entre os níveis destes biomarcadores. Porém, avaliando os 7

casos tratados com quimioterapia adjuvante após a cirurgia e que apresentaram recidiva da doença, esta correlação foi positiva e estatisticamente significativa (ρ de Spearman= 0,95; $p= 0,001$; **Figura 32D**).

O grande interesse em trabalhar com este grupo de pacientes é identificar quais pacientes provavelmente não responderão à quimioterapia adjuvante dentre aqueles que são elegíveis para esse tratamento. O desenvolvimento de uma ou mais ferramentas seria um passo importante para a personalização do tratamento, o que pouparia esses pacientes de toxicidades desnecessárias e alocaria de uma maneira mais eficaz os recursos de saúde dispensados ao tratamento.

6 CONCLUSÕES

- Foi possível verificar uma alta taxa de detecção de CTCs em todas as coletas, todos os estágios, nos dois módulos avaliados (módulo I: todos os pacientes; módulo II: apenas pacientes com tumores de alto risco, submetidos ao tratamento adjuvante);
- Foi verificado, tanto no módulo I, quanto no módulo II, que a presença de ERCC1 com alto índice de positividade no segundo seguimento foi relacionada a SLR inferior;
- Foi encontrada uma expressão maior de β gal e ERCC1 no estágio III em relação aos outros estágios, no primeiro seguimento. Todos os pacientes do módulo II que apresentaram recidiva tinham a expressão de TGF β RI nas CTCs na primeira coleta;
- Não foi encontrada uma relação entre a expressão proteica ou de RNAm de TYMS e resistência ao tratamento. Foi encontrada uma concordância de 50% entre proteína e RNAm nas amostras analisadas;
- Os padrões de mutação no gene *KRAS*, nos códons 12/13 foram diferentes entre as CTCs e tumor primário, representando uma alta heterogeneidade entre este grupo de células estudadas.
- Foi encontrada uma correlação significativa positiva entre os níveis de CTCs detectadas pelo método ISET e a porcentagem de células T-Reg. Inversamente, uma correlação significativa negativa entre CTCs

e porcentagem de linfócitos T foi encontrada. Além disto, pacientes com altos níveis de PLR (>124) apresentaram uma pior SLR. Alta PLR também foi encontrada em pacientes com presença de MEs.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Colorectal cancer**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2Nacy6w>> [2019 jan 15]

Abdallah EA, Fanelli MF, Buim MEC, et al. Thymidylate synthase expression in circulating tumor cells: a new tool to predict 5-fluorouracil resistance in metastatic colorectal cancer patients. **Int J Cancer** 2015; 137:1397-405.

Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. **Cell** 2014; 158:1110-22.

Aggarwal C, Meropol NJ, Punt CJ, et al. Relationship among circulating tumor cells, CEA and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. **Ann Oncol** 2013; 24:420-8.

Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, et al. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. **Mol Cell Biol** 2008; 28:5082-92.

Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, et al. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. **JAMA** 2012; 307:1383-93.

Alix-Panabières C, Pantel K. Real-time liquid biopsy: circulating tumor cells versus circulating tumor DNA. **Ann Transl Med** 2013; 1:18.

Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, et al. Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial. **J Clin Oncol** 2013; 31:359-64.

Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, et al. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. **Nat Med** 2000; 6:100-2.

Amin MB, Greene FL, Edge SB, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. **CA Cancer J Clin** 2017; 67:93-9.

André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. **N Engl J Med** 2004; 350:2343-51.

André T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. **J Clin Oncol** 2009; 27:3109-16.

Au SH, Storey BD, Moore JC, et al. Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2016; 113:4947-52.

Bankó P, Lee SY, Nagygyörgy V, et al. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. **J Hematol Oncol** 2019; 12:48.

Barbazán J, Alonso-Alconada L, Muínelo-Romay L, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in human metastatic colorectal cancer. **PLoS One** 2012; 7:e40476.

Barbazán J, Muínelo-Romay L, Vieito M, et al. A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer. **Int J Cancer** 2014; 135:2633-43.

Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, et al. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. **Histol Histopathol** 2015; 30:1059-67.

Beck DE. Surgical management of colon and rectal cancer. **Ochsner J** 2002; 4:156-62.

Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. **Cancer Metastasis Rev** 2012; 31:673-87.

Biagi JJ, Raphael MJ, Mackillop WJ, et al. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **JAMA** 2011; 305:2335-42.

Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. **World J Gastroenterol** 2014; 20:6786-808.

Boige V, Mendiboure J, Pignon J-P, et al. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05. **J Clin Oncol** 2010; 28:2556-64.

Bork U, Rahbari NN, Schölch S, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. **Br J Cancer** 2015; 112:1306-13.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:394-424.

Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. **Biochim Biophys Acta** 2010; 1803:55-71.

Brown JC, Rhim AD, Manning SL, et al. Effects of exercise on circulating tumor cells among patients with resected stage I-III colon cancer. **PLoS One** 2018; 13:e0204875.

Buder A, Tomuta C, Filipits M. The potential of liquid biopsies. **Curr Opin Oncol** 2016; 28:130-4.

Bueno L, de Alwis DP, Pitou C, et al. Semi-mechanistic modelling of the tumour growth inhibitory effects of LY2157299, a new type I receptor TGF-beta kinase antagonist, in mice. **Eur J Cancer** 2008; 44:142-50.

Cabel L, Proudhon C, Gortais H, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility. **Int J Clin Oncol** 2017; 22:421-30.

Calascibetta A, Contino F, Feo S, et al. Analysis of the Thymidylate Synthase Gene Structure in Colorectal Cancer Patients and Its Possible Relation with the 5-Fluorouracil Drug Response. **J Nucleic Acids** 2010; 2010:1-4.

Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. **Cancer Cell** 2012; 22:571-84.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007; 8:729-40.

Carter L, Rothwell DG, Mesquita B, et al. Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemosensitive and chemorefractory small-cell lung cancer. **Nat Med** 2017; 23:114-9.

Ceppi P, Volante M, Novello S, et al. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. **Ann Oncol** 2006; 17:1818-25.

Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:2029-43.e10.

Chemi F, Rothwell DG, McGranahan N, et al. Pulmonary venous circulating tumor cell dissemination before tumor resection and disease relapse. **Nat Med** 2019 Oct 7. [Epub ahead of print]

Cierna Z, Mego M, Janega P, et al. Matrix metalloproteinase 1 and circulating tumor cells in early breast cancer. **BMC Cancer** 2014; 14:472.

Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:3213-21.

Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. **Ann Oncol** 2009; 20:1223-9.

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. **N Engl J Med** 2004; 351:781-91.

Dasgupta A, Lim AR, Ghajar CM. Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? **Mol Oncol** 2017; 11:40-61.

de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:6302-9.

Denis JA, Patroni A, Guillermin E, et al. Droplet digital PCR of circulating tumor cells from colorectal cancer patients can predict KRAS mutations before surgery. **Mol Oncol** 2016; 10:1221-31.

Des Guetz G, Nicolas P, Perret G-Y, et al. Does delaying adjuvant chemotherapy after curative surgery for colorectal cancer impair survival? A meta-analysis. **Eur J Cancer** 2010; 46:1049-55.

Dhar M, Lam JN, Walser T, et al. Functional profiling of circulating tumor cells with an integrated vortex capture and single-cell protease activity assay. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2018; 115:9986-91.

Eliasova P, Pinkas M, Kolostova K, et al. Circulating tumor cells in different stages of colorectal cancer. **Folia Histochem Cytobiol** 2017; 55:1-5.

Faivre S, Santoro A, Kelley RK, et al. Novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor galunisertib (LY2157299) in advanced hepatocellular carcinoma. **Liver Int** 2019; 39:1468-77.

Fanelli MF, Oliveira TB, Braun AC, et al. Evaluation of incidence, significance, and prognostic role of circulating tumor microemboli and transforming growth factor- β receptor I in head and neck cancer. **Head Neck** 2017; 39:2283-92.

Farace F, Massard C, Vimond N, et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. **Br J Cancer** 2011; 105:847-53.

Farina AR, Mackay AR. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. **Cancers (Basel)** 2014; 6:240-96.

Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. **Mol Oncol** 2016; 10:374-94.

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

Fiore E, Fusco C, Romero P, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Oncogene** 2002; 21:5213-23.

Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **J Gastrointest Oncol** 2012; 3:153-73.

Forget P, Khalifa C, Defour J-P, et al. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? **BMC Res Notes** 2017; 10:12.

Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. **Nat Cell Biol** 2012; 14:777-83.

Galizia G, Gemei M, Orditura M, et al. Postoperative detection of circulating tumor cells predicts tumor recurrence in colorectal cancer patients. **J Gastrointest Surg** 2013; 17:1809-18.

Gazzaniga P, Gradilone A, Petracca A, et al. Molecular markers in circulating tumour cells from metastatic colorectal cancer patients. **J Cell Mol Med** 2010a; 14:2073-77.

Gazzaniga P, Naso G, Gradilone A, et al. Chemosensitivity profile assay of circulating cancer cells: prognostic and predictive value in epithelial tumors. **Int J Cancer** 2010b; 126:2437-47.

Gazzaniga P, Raimondi C, Gradilone A, et al. Circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer: do we need an alternative cutoff? **J Cancer Res Clin Oncol** 2013; 139:1411-6.

George JN. Platelets. **Lancet** 2000; 355:1531-9.

Germano G, Mauri G, Siravegna G, et al. Parallel evaluation of circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer** 2018; 17:80-3.

Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, et al. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. **Recent Results Cancer Res** 2003; 162:149-55.

Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal cancer biomarkers: where are we now? **Biomed Res Int** 2015; 2015:1-14.

Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. **BMC Cancer** 2012; 12:178.

Guo B, Oliver TG. Partners in crime: neutrophil–CTC collusion in metastasis. **Trends Immunol** 2019; 40:556-9.

Habr-Gama A. Câncer coloretal: a importância de sua prevenção. **Arq Gastroenterol** 2005; 42:2-3.

Haller DG, Tabernero J, Maroun J, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. **J Clin Oncol** 2011; 29:1465-71.

Heeke S, Mograbi B, Alix-Panabières C, Hofman P. Never Travel Alone: The Crosstalk of Circulating Tumor Cells and the Blood Microenvironment. **Cells** 2019; 8. pii: E714.

Heitzer E, Auer M, Gasch C, et al. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. **Cancer Res** 2013; 73:2965-75.

Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. **Nat Rev Genet** 2019; 20:71-88.

Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. **Ann Surg Oncol** 2008; 15:3092-100.

Hjelmeland MD, Hjelmeland AB, Sathornsumetee S, et al. SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. **Mol Cancer Ther** 2004; 3:737-45.

Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. **Nat Med** 2014; 20:897-903.

Hong B, Zu Y. Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends. **Theranostics** 2013; 3:377-94.

Hudzik B, Szkodzinski J, Gorol J, et al. Platelet-to-lymphocyte ratio is a marker of poor prognosis in patients with diabetes mellitus and ST-elevation myocardial infarction. **Biomark Med** 2015; 9:199-207.

Jiang X, Wong KHK, Khankhel AH, et al. Microfluidic isolation of platelet-covered circulating tumor cells. **Lab Chip** 2017; 17:3498-503.

Jin CH, Krishnaiah M, Sreenu D, et al. Discovery of N-((4- ([1,2,4]triazolo[1,5-a] pyridin-6-yl)-5 - (6-methylpyridin-2-yl) - 1H-imidazol-2-yl) methyl)-2-fluoroaniline (EW-7197): a highly potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of TGF- β type I receptor kinase as cancer immunotherapeutic/antifibrotic agent. **J Med Chem** 2014; 57:4213-38.

Josse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. **EMBO Mol Med** 2015; 7:1-11.

Josse SA, Pantel K. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. **Cancer Res** 2013; 73:8-11.

Jung B, Staudacher JJ, Beauchamp D. Transforming growth factor β superfamily signaling in development of colorectal cancer. **Gastroenterology** 2017; 152:36-52.

Katsumata K, Sumi T, Mori Y, et al. Detection and evaluation of epithelial cells in the blood of colon cancer patients using RT-PCR. **Int J Clin Oncol** 2006; 11:385-9.

Khan MS, Kirkwood A, Tsigani T, et al. Circulating tumor cells as prognostic markers in neuroendocrine tumors. **J Clin Oncol** 2013; 31:365-72.

Khoja L, Lorigan P, Zhou C, et al. Biomarker utility of circulating tumor cells in metastatic cutaneous melanoma. **J Invest Dermatol** 2013; 133:1582-90.

Kim M-Y, Oskarsson T, Acharyya S, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. **Cell** 2009a; 139:1315-26.

Kim S-H, Kwon H-C, Oh SY, et al. Prognostic value of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase pi for 5-FU/oxaliplatin chemotherapy in advanced colorectal cancer. **Am J Clin Oncol** 2009b; 32:38-43.

Köhne C-H, Bedenne L, Carrato A, et al. A randomised phase III intergroup trial comparing high-dose infusional 5-fluorouracil with or without folinic acid with standard bolus 5-fluorouracil/folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: the Pan-European Trial in Adjuvant Colon Cancer 2 study. **Eur J Cancer** 2013; 49:1868-75.

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, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2011; 29:1556-63.

Kuboki Y, Matsusaka S, Minowa S, et al. Circulating tumor cell (CTC) count and epithelial growth factor receptor expression on CTCs as biomarkers for cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer. **Anticancer Res** 2013; 33:3905-10.

Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, et al. Colorectal cancer. **Nat Rev Dis Primers** 2015; 1:15065.

Küsters B, Kats G, Roodink I, et al. Micronodular transformation as a novel mechanism of VEGF-A-induced metastasis. **Oncogene** 2007; 26:5808-15.

Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. **Cancer Cell** 2011; 20:576-90.

Lallo A, Gulati S, Schenk MW, et al. Ex vivo culture of cells derived from circulating tumour cell xenograft to support small cell lung cancer research and experimental therapeutics. **Br J Pharmacol** 176:436-50.

Lallo A, Schenk MW, Frese KK, et al. Circulating tumor cells and CDX models as a tool for preclinical drug development. **Transl Lung Cancer Res** 2017; 6:397-408.

Leone K, Poggiana C, Zamarchi R. The interplay between circulating tumor cells and the immune system: from immune escape to cancer immunotherapy. **Diagnostics** 2018; 8:59.

Li F, Lai M. Colorectal cancer, one entity or three. **J Zhejiang Univ Sci B** 2009; 10:219-29.

Lohr JG, Adalsteinsson VA, Cibulskis K, et al. Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. **Nat Biotechnol** 2014; 32:479-84.

Lord RVN, Brabender J, Gandara D, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 2002; 8:2286-91.

Lovly CM, Berger C, Vnencak-Jones CL. Last updated: Apr 03, 2019. **Circulating tumor DNA**. My Cancer Genome. Available from: <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/circulating-tumor-dna> [2019 apr 2019]

Lu C-Y, Tsai H-L, Uen Y-H, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining clinical outcome to mFOLFOX chemotherapy in patients with stage III colon cancer. **Br J Cancer** 2013; 108:791-7.

Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, et al. Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. **Am J Pathol** 1998; 153:865-73.

Marshall JL. Risk assessment in Stage II colorectal cancer. **Oncology (Williston Park, NY)** 2010; 24:9-13.

Martin TA, Ye L, Sanders AJ, Lane J, Jiang WG. Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective. In **Metastatic Cancer: Clinical and Biological Perspectives** 2013, ed. R Jandial. Austin: Landes Biosci.

Mascalchi M, Falchini M, Maddau C, et al. Prevalence and number of circulating tumour cells and microemboli at diagnosis of advanced NSCLC. **J Cancer Res Clin Oncol** 2016; 142:195-200.

Mascalchi M, Maddau C, Sali L, et al. Circulating tumor cells and microemboli can differentiate malignant and benign pulmonary lesions. **J Cancer** 2017; 8:2223-30.

Massagué J. TGFbeta in Cancer. **Cell** 2008; 134:215-30.

Mego M, Gao H, Cohen EN, et al. Circulating Tumor Cells (CTC) are associated with defects in adaptive immunity in patients with inflammatory breast cancer. **J Cancer** 2016; 7:1095-104.

Melisi D, Garcia-Carbonero R, Macarulla T, et al. Galunisertib plus gemcitabine vs. gemcitabine for first-line treatment of patients with unresectable pancreatic cancer. **Br J Cancer** 2018; 119:1208-14.

Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal Cancer. **J Biomed Biotechnol** 2011; 2011:1-19.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativas 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Murlidhar V, Reddy RM, Fouladdel S, et al. Poor prognosis indicated by venous circulating tumor cell clusters in early-stage lung cancers. **Cancer Res** 2017; 77:5194-206.

Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. **Nature** 2007; 450:1235-39.

Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Contribution of regulatory T cells to cancer: a review. **J Cell Physiol** 2019; 234:7983-93.

Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. **Cancer Res** 1999; 59:1295-300.

Nilsson RJA, Balaj L, Hulleman E, et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. **Blood** 2011; 118:3680-83.

Ning Y, Hanna DL, Zhang W, et al. Cytokeratin-20 and survivin-expressing circulating tumor cells predict survival in metastatic colorectal cancer patients by a combined immunomagnetic qRT-PCR Approach. **Mol Cancer Ther** 2015; 14:2401-8.

Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. **Sci Transl Med** 2013; 5:179ra47.

Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. **Blood** 2005; 105:178-85.

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

Perkins GL, Slater ED, Sanders GK, Prichard JG. Serum tumor markers. **Am Fam Physician** 2003; 68:1075-82.

Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:265-73.

Regmi S, Fu A, Luo KQ. High Shear Stresses under Exercise Condition Destroy Circulating Tumor Cells in a Microfluidic System. **Sci Rep** 2017; 7:39975.

Rigg AS, Lemoine NR. Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect in vivo. **Cancer Gene Ther** 2001; 8:869-78.

Roderfeld M, Graf J, Giese B, et al. Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. **Biol Chem** 2007; 388:1227-34.

Romiti A, Raffa S, Di Rocco R, et al. Circulating tumor cells count predicts survival in colorectal cancer patients. **J Gastrointestin Liver Dis** 2014; 23:279-84.

Rothé F, Maetens M, Rouas G, et al. CTCs as a prognostic and predictive biomarker for stage II/III Colon Cancer: a companion study to the PePiTA trial. **BMC Cancer** 2019; 19:304.

Saha D, Roman C, Beauchamp RD. New strategies for colorectal cancer prevention and treatment. **World J Surg** 2002; 26:762-6.

Said AH, Raufman J-P, Xie G. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer. **Cancers (Basel)** 2014; 6:366-75.

Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. **Biochemistry** 1974; 13:471-81.

Sarioglu AF, Aceto N, Kojic N, et al. A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters. **Nat Methods** 2015; 12:685-91.

Sastre J, Maestro ML, Puente J, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. **Ann Oncol** 2008; 19:935-8.

Saunier EF, Akhurst RJ. TGF beta inhibition for cancer therapy. **Curr Cancer Drug Targets** 2006; 6:565-78.

Seeberg LT, Waage A, Brunborg C, et al. Circulating tumor cells in patients with colorectal liver metastasis predict impaired survival. **Ann Surg** 2015; 261:164-71.

Sharma D, Brummel-Ziedins KE, Bouchard BA, Holmes CE. Platelets in tumor progression: a host factor that offers multiple potential targets in the treatment of cancer. **J Cell Physiol** 2014; 229:1005-15.

Shaw Bagnall J, Byun S, Begum S, et al. Deformability of tumor cells versus blood cells. **Sci Rep** 2015; 5:18542.

Schütz F, Stefanovic S, Mayer L, von Au A, Domschke C, Sohn C. PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. **Oncol Res Treat** 2017; 40:294-7.

Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:254-66.

Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. **Clin Interv Aging** 2016; 11:967-76.

Skerenova M, Mikulova V, Capoun O, et al. Circulating tumor cells and serum levels of MMP-2, MMP-9 and VEGF as markers of the metastatic process in patients with high risk of metastatic progression. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub** 2017; 161:272-80.

Sørensen NM, Byström P, Christensen IJ, et al. TIMP-1 is significantly associated with objective response and survival in metastatic colorectal cancer patients receiving combination of irinotecan, 5-fluorouracil, and folinic acid. **Clin Cancer Res** 2007; 13:4117-22.

Sotelo MJ, Sastre J, Maestro ML, et al. Role of circulating tumor cells as prognostic marker in resected stage III colorectal cancer. **Ann Oncol** 2015; 26:535-41.

Souza E Silva V, Chinen LTD, Abdallah EA, et al. Early detection of poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer: tumor kinetics evaluated by circulating tumor cells. **Onco Targets Ther** 2016; 9:7503-13.

Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **J Pathol** 2003; 200:448-64.

Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. **Sci Signal** 2008; 1:re6.

Stott SL, Hsu C-H, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. **Proc Natl Acad Sci USA** 2010; 107:18392-7.

Subramanian G, Schwarz RE, Higgins L, et al. Targeting endogenous transforming growth factor beta receptor signaling in SMAD4-deficient human pancreatic carcinoma cells inhibits their invasive phenotype¹. **Cancer Res** 2004; 64:5200-11.

Sun Q, Liu Y, Liu B, Liu Y. Use of liquid biopsy in monitoring colorectal cancer progression shows strong clinical correlation. **Am J Med Sci** 2018; 355:220-7.

Szczerba BM, Castro-Giner F, Vetter M, et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. **Nature** 2019; 566:553-7.

Tabassum DP, Polyak K. Tumorigenesis: it takes a village. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:473-83.

Tanaka K, Iwamoto Y, Ito Y, et al. Cyclic AMP-regulated synthesis of the tissue inhibitors of metalloproteinases suppresses the invasive potential of the human fibrosarcoma cell line HT1080. **Cancer Res** 1995; 55:2927-35.

Tao L, Zhang L, Peng Y, et al. Neutrophils assist the metastasis of circulating tumor cells in pancreatic ductal adenocarcinoma: A new hypothesis and a new predictor for distant metastasis. **Medicine (Baltimore)** 2016; 95:e4932.

Tesfamariam B. Involvement of platelets in tumor cell metastasis. **Pharmacol Ther** 2016; 157:112-9.

Thorsen SB, Christensen SL, Würtz SO, et al. Plasma levels of the MMP-9: TIMP-1 complex as prognostic biomarker in breast cancer: a retrospective study. **BMC Cancer** 2013; 13:598.

Tol J, Koopman M, Miller MC, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. **Ann Oncol** 2010; 21:1006-12.

Tong G, Xu W, Zhang G, et al. The role of tissue and serum carcinoembryonic antigen in stages I to III of colorectal cancer-A retrospective cohort study. **Cancer Med** 2018; 7:5327-38.

Troncarelli Flores BC, Souza E Silva V, Ali Abdallah E, et al. Molecular and kinetic analyses of circulating tumor cells as predictive markers of treatment response in locally advanced rectal cancer patients. **Cells** 2019; 8:E641.

Tsai W-S, Chen J-S, Shao H-J, et al. Circulating tumor cell count correlates with colorectal neoplasm progression and is a prognostic marker for distant metastasis in non-metastatic patients. **Sci Rep** 2016; 6:24517.

Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. **N Engl J Med** 2005; 352:2696-704.

Uhl M, Aulwurm S, Wischhusen J, et al. SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo. **Cancer Res** 2004; 64:7954-61.

Vaisar T, Kassim SY, Gomez IG, et al. MMP-9 sheds the beta2 integrin subunit (CD18) from macrophages. **Mol Cell Proteomics** 2009; 8:1044-60.

Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, et al. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. **J Clin Oncol** 2009; 27:3117-25.

Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. **Am J Pathol** 2000; 156:57-63.

Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, et al. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. **N Engl J Med** 1978; 299:448-51.

Wang L, Zhou S, Zhang W, et al. Circulating tumor cells as an independent prognostic factor in advanced colorectal cancer: a retrospective study in 121 patients. **Int J Colorectal Dis** 2019; 34:589-97.

Wang W-C, Zhang X-F, Peng J, et al. Survival Mechanisms and Influence Factors of Circulating Tumor Cells. **Biomed Res Int** 2018; 2018:1-9.

Wei EK, Giovannucci E, Wu K, et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. **Int J Cancer** 2004; 108:433-42.

Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:512-22.

Wu F, Zhu J, Mao Y, et al. Associations between the epithelial-mesenchymal transition phenotypes of circulating tumor cells and the clinicopathological features of patients with colorectal cancer. **Dis Markers** 2017; 2017:9474532.

Xu Z, Lou Y, Chen L, et al. A novel TGF-beta-receptor I kinase inhibitor demonstrated to be an effective immuno-therapy for cancer. **Cancer Res** 2017; 77(13 suppl):A4568. [Presented at Proceedings of the AACR Annual Meeting 2017; April 1-5, 2017; Washington, DC 2017].

Xue D, Xia T, Wang J, et al. Role of regulatory T cells and CD8+ T lymphocytes in the dissemination of circulating tumor cells in primary invasive breast cancer. **Oncol Lett** 2018; 16:3045-53.

Yaffee P, Osipov A, Tan C, et al. Review of systemic therapies for locally advanced and metastatic rectal cancer. **J Gastrointest Oncol** 2015; 6:185-200.

Yang C, Zhuang W, Hu Y, Zhu L. Clinical significance of peripheral circulating tumor cell counts in colorectal polyps and non-metastatic colorectal cancer. **World J Surg Oncol** 2018; 16:13.

Yang H-J, Jiang J-H, Liu Q-A, et al. Preoperative platelet-to-lymphocyte ratio is a valuable prognostic biomarker in patients with hepatocellular carcinoma undergoing curative liver resection. **Tumour Biol** 2017; 39:1010428317707375.

Yang L, Lang JC, 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.

Ye L, Zhang F, Li H, et al. Circulating Tumor Cells Were Associated with the Number of T Lymphocyte Subsets and NK Cells in Peripheral Blood in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. **Dis Markers** 2017; 2017:5727815.

Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. **J Clin Oncol** 2011; 29:3768-74.

Zarzynska JM. Two faces of TGF-beta1 in breast cancer. **Mediators Inflamm** 2014; 2014:141747.

Zhao J-X, Liu L-R, Yang X-Y, et al. Serum CA19-9 as a marker of circulating tumor cells in first reflux blood of colorectal cancer patients. **Oncotarget** 2017; 8:67918-32.

Zheng X, Carstens JL, Kim J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. **Nature** 2015; 527:525-30.

Zhou X, Du Y, Huang Z, et al. Prognostic value of PLR in various cancers: a meta-analysis. **PLoS One** 2014; 9:e101119.

Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. **Postgrad Med J** 2008; 84:403-11.

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



**A.C. Camargo
Cancer Center**

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 15 de dezembro de 2015.

À
Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen.

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2141/15
"Identificação de Proteínas e Genes de Fatores de Transcrição Relacionados à Resistência a Quimioterapia e Radioterapia em Células Tumorais Circulantes de Pacientes com Câncer de Cólon e Reto Localmente Avançados."**

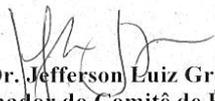
Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 08/12/2015, **aprovaram** a realização do projeto (datado de Outubro de 2015), o termo de consentimento livre e esclarecido (versão 1 datado de 28/10/2015) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração Sobre o Plano de Recrutamento dos Participantes de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela Obtenção do TCLE;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE);
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Núcleo de Tumores Colorretais;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE);
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração Sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedades das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Cronograma Detalhado.

Para iniciar o projeto, é necessário aguardar aprovação da CONEP.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gróss

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

NOME DO ESTUDO: IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E GENES DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO RELACIONADOS À RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA E RADIOTERAPIA EM CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON E RETO LOCALMENTE AVANÇADOS

Investigador Responsável: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

Nome do(a) Voluntário(a): _____

RGH: _____

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa.

Por favor, leia cuidadosamente este termo, pois ele informa o que você necessita saber sobre os objetivos deste estudo. Se concordar em tomar parte neste estudo, deverá assinar e datar este termo. A sua assinatura significa que recebeu as informações necessárias e que deseja participar deste estudo.

OBJETIVOS DO ESTUDO

Usar um equipamento laboratorial novo no mercado para isolar células tumorais circulantes (são células que se desprendem do tumor) no sangue periférico de pacientes com câncer de cólon/reto localmente avançados e correlacionar seus níveis com:

- recorrência tumoral local/à distância;
- resposta ao tratamento (verificaremos se há diminuição dos níveis dessas células durante e após o seu tratamento);
- expressão de genes e proteínas de resistência a drogas (ERCC1, resistência a derivados de platina e TYMS, resistência a 5-fluorouracil, tratamentos comumente utilizados), genes de invasão tumoral (TGF β , MMP2, MMP9), proliferação (Ki-67) e dormência celular (β -gal), que poderiam auxiliar no acompanhamento do câncer;
- sobrevida livre de progressão;
- tempo de vida após o tratamento.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se concordar em participar deste estudo, você será submetido a três coletas de sangue (aproximadamente 10 mL), antes do início do tratamento (cirurgia ou quimioterapia/radioterapia), após este tratamento e aproximadamente a cada 4 meses, até a mudança do protocolo do tratamento ou, se a doença progredir, até a progressão.

Caso haja necessidade, dependendo do tratamento e de seu consentimento, mais coletas de sangue serão realizadas.

Você não precisará vir ao hospital apenas para a coleta desta pesquisa. Contataremos você nas datas que você tiver exames e na maioria das vezes, aproveitaremos as punções venosas (coleta de sangue) dos exames no laboratório de rotina. Caso não tenha exames a ser realizados, contataremos você nos dias que tiver consulta ou outros procedimentos no hospital.

Todo o material coletado (sangue) será esgotado em um processo de filtração. Armazenaremos em freezer apenas o material contido no filtro (células, DNA, RNA, plaquetas e plasma) e analisaremos na pesquisa.

Toda identificação do seu material será feita por códigos para preservar sua confidencialidade.

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo, caso você participe ou não deste estudo. Não haverá danos imediatos ou tardios, que comprometam a sua saúde, salvos possíveis desconfortos e riscos decorrentes da punção venosa, procedimento comum para exames hematológicos.

Os riscos a que você estará sujeito são os riscos inerentes a qualquer punção venosa como: dor local no ato da punção, sangramento no local, hematoma e raramente flebite (infecção na veia puncionada), mas isto será evitado pela limpeza adequada do local de punção e realização do procedimento por profissional capacitado. Apesar de raro, pode ser que ocorra equimose (quando o sangue sai para a pele, resultando em uma mancha azul ou púrpura, redonda não elevada ou irregular) após a coleta de sangue. Caso isso aconteça com você, não há nada a ser feito, a não ser esperar que desapareça (desaparece em até 7 dias).

Os exames realizados em seu sangue não implicarão em nenhuma mudança em seu tratamento ou qualquer conduta médica que esteja sendo realizada ou venha a ser realizada no seu seguimento, uma vez que a pesquisa de CTCs no Brasil ainda é experimental, não havendo nenhum prejuízo para o sucesso das condutas médicas outras aos quais você esteja se submetendo.

Garantimos a assistência integral e gratuita pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa.

Embora garantindo que seus dados serão identificados por meio de códigos e siglas, existe sempre o risco da perda de confidencialidade entre os investigadores.

BENEFÍCIOS

Não haverá benefícios de qualquer espécie para você, apenas a importância de contribuir para uma pesquisa científica cujos dados obtidos poderão trazer benefícios para pessoas com câncer. A recusa em participar, não acarretará prejuízo na qualidade do seu tratamento. O pesquisador responsável se compromete a suspender a pesquisa imediatamente ao perceber algum risco ou dano à sua saúde, que não previsto neste termo de consentimento.

MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES

Apesar de métodos alternativos serem aprovados e usados na prática clínica em outros países, no Brasil, esses métodos ainda não estão disponíveis.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Os pesquisadores também se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo, porém, por se tratar de nova tecnologia, os resultados não poderão indicar cura ou piora do seu quadro, pois ainda não temos valores de referência para estabelecer uma comparação. Contato da pesquisadora: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189-5000 ramal 2936).

Caso os achados da pesquisa, fatos ou informações encontradas pelo pesquisador no decorrer da pesquisa sejam considerados de relevância para você ou para comunidades participantes, os mesmos serão divulgados de forma a contribuir com o acompanhamento do câncer, juntamente com os exames de rotina. Garantimos, ainda que os resultados dos exames genéticos não sejam fornecidos a terceiros (como, por exemplo: seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, entre outros).

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para você por sua participação neste estudo.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos neste estudo. Os dados obtidos pela análise do seu sangue são confidenciais, não sendo divulgada a identificação de nenhum

participante ainda que informações do registro médico sejam utilizadas para publicação.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais tem direito.

SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE

A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter seu anonimato. Você terá acesso aos seus dados de exames, atendimentos médicos e administração de terapia, quando solicitados.

ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Você não terá nenhum tipo de remuneração ao aceitar participar deste estudo. A pesquisa não envolve nenhuma forma de compensação financeira aos participantes.

ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PACIENTE SUJEITO À PESQUISA

A sua participação no estudo é voluntária. Você tem o direito de sair do estudo a qualquer momento e por qualquer motivo. Caso venha a abandonar o estudo ou decidir não participar do mesmo, o seu tratamento não será prejudicado. No entanto, se você decidir sair da pesquisa, deverá informar ao seu médico.

INFORMAÇÕES SOBRE NOMES, TELEFONES E ENDEREÇOS PARA CONTATOS

Esclarecimentos para questões sobre os direitos dos participantes na pesquisa e/ou danos relacionados à pesquisa, contatar a pesquisadora Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189 5000 ramal 2776), endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211- Liberdade- São Paulo, SP. Se o pesquisador principal não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer – A.C. Camargo/ SP, cujo horário de funcionamento é de segunda a quinta-feira, das 07h00 às 18h00 e de sexta-feira das 07h00 às 16h00 (Telefone 2189-5000 ramal 5020; endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211- Liberdade- São Paulo, SP).

