

**IMPACTO PROGNÓSTICO DE CÉLULAS TUMORAIS
CIRCULANTES E POTENCIAL PAPEL PREDITOR DE
RESPOSTA AO TRATAMENTO EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO
LOCALMENTE AVANÇADO**

THIAGO BUENO DE OLIVEIRA

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

Área de concentração: Oncologia

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Oliveira, Thiago Bueno de

Impacto prognóstico de células tumorais circulantes e potencial papel preditor de resposta ao tratamento em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localmente avançado / Thiago Bueno de Oliveira – São Paulo 2019.

157p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores: 1. Células Neoplásicas Circulantes/Neoplastic Cells, Circulating. 2. Neoplasias de Cabeça e Pescoço/Head and Neck Neoplasms. 3. Carcinoma de Células Escamosas/terapia/Carcinoma, Squamous Cell/therapy. 4. Biomarcadores Tumorais/Biomarkers, Tumor.

DEDICATÓRIA

A meus pais, Celso e Tereza, por tudo que me ensinaram;

A minha esposa Camila pelo apoio incondicional;

A meu filho Guilherme, por ser fonte de força e inspiração.

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes e familiares, pela participação no estudo;

A meus colegas do departamento de Oncologia Clínica, em especial ao grupo de cabeça e pescoço, Dr Ulisses e Dra Paola;

Aos colegas do departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e departamento de Radioterapia;

A minha orientadora Dra Ludmilla e a meu co-orientador Dr Kowalski;

A todos que contribuíram direta e indiretamente com esse estudo, em especial a Vanessa, Emne e Alexcia do grupo de CTCs e Vinicius da estatística;

A todos os funcionários do departamento de Oncologia Clínica, da pós-graduação e apoio ao aluno.

RESUMO

Oliveira TB. **Impacto prognóstico de células tumorais circulantes e potencial papel preditor de resposta ao tratamento em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localmente avançado.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O papel prognóstico de células tumorais circulantes (CTCs) em câncer de cabeça e pescoço localmente avançado (CCPLA) ainda não está determinado, devido a resultados conflitantes em estudos prévios, a maioria utilizando técnicas dependentes de citoqueratina para identificação e contagem de CTCs. O objetivo primário deste estudo é determinar a taxa de detecção utilizando o método ISET, o papel prognóstico e potencial papel preditivo de CTCs em CCPLA. **Métodos:** Prospectivamente amostras de sangue de pacientes com CCPLA não metastático, estágios III/IV, foram analisadas para CTCs antes e após o tratamento, em dois cenários: cirurgia curativa inicial e radioterapia (RT) adjuvante e candidatos a estratégia não cirúrgica (irressecáveis ou preservação de órgão) com RT concomitante a quimioterapia (QT) ou cetuximabe, precedida ou não por QT de indução (QTI). **Resultados:** Foram incluídos 83 pacientes e a taxa de detecção de CTCs *baseline* foi de 94% (78/83). A contagem de CTCs se correlacionou significativamente com sobrevida, com um aumento relativo de 18% no risco de óbito (HR=1,18; CI95%: 1,06-1,31; $p<0,001$), 16% no risco de progressão (HR=1,16; CI95%: 1,04-1,28; $p=0,004$) e uma redução de 26% na chance de resposta completa ao tratamento (OR=0.74; CI95%: 0.58-0.95; $p=0.022$) para cada aumento de uma CTC. Pacientes com CTCs $< 6,5/\text{mL}$ apresentaram estimativa de sobrevida global (SG) em dois anos de 85,6% x 22,9% para CTCs $\geq 6.5/\text{mL}$ (HR=0,18; CI95%: 0,06-0,49; $P<0,0001$) e pacientes com CTCs $\leq 3.8/\text{mL}$ uma estimativa de sobrevida livre de progressão (SLP) em dois anos de 71,8% x 37% para CTCs $> 3.8/\text{mL}$ (HR=0,32; CI95%: 0,15-0,67; $p=0,001$). Após o tratamento, contagens altas de CTCs (ponto de corte 6,6/mL) se correlacionaram significativamente com pior SG (HR=0,12; CI95%: 0,06-0,40; $p<0,001$) e SLP (HR=0,19; CI95%: 0,06-0,59;

p=0,001). No subgrupo de tratamento não cirúrgico (n=67), presença de microêmbolos (ME) se correlacionou significativamente com pior SG (HR=3,01; CI95%: 1,06-8,52; p=0,029) e SLP (HR=3,84; CI95%: 1,62-9,11; p<0,001). Neste subgrupo, CTCs altas (>3,8/mL) e ME foram identificados como potenciais preditores do benefício de QTI. Expressão de MRP-7 em ME *baseline* se relacionou a pior SG (HR=3,49; CI95%: 1,01-12,04; p=0,047) e SLP (HR=3,62; CI95%: 1,08-12,13; p=0,037) e expressão de TFGβRI nas CTCs após o tratamento a pior SG (HR=3,60; 1,03-12,59; p=0,032). Expressão de β-tubulina III nas CTCs se relacionou a pior SG em pacientes recebendo QTI (p=0,012). Pacientes com cinética favorável de CTCs tiveram melhor SG (HR=0,22; IC95%: 0,07-0,67; p=0,004) e SLP (HR=0,33; CI95%: 0,13-0,84; p=0,015). **Conclusões:** Contagem de CTCs *baseline* se correlacionaram com sobrevida e resposta ao tratamento e, junto com ME, são potenciais fatores preditivos do benefício de QTI. Contagens de CTCs altas após o tratamento e cinética desfavorável também foram prognósticos. Expressão de biomarcadores em CTCs e ME tem papel prognóstico e preditivo em CCPLA.

Descritores: Células Neoplásicas Circulantes. Neoplasias de Cabeça e Pescoço. Carcinoma de Células Escamosas/terapia. Biomarcadores Tumorais.

SUMMARY

Oliveira TB. [Prognostic impact and potential predictive role of circulating tumor cells in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: The prognostic role of circulating tumor cells (CTCs) in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (LAHNSCC) is yet to be determined, with conflicting results in previous trials, the majority utilizing cytokeratin dependent techniques for identification and counting of CTCs. The primary objective of this study is to determine the detection rates using the ISET method, the prognostic and potential predictive role of CTCs in LAHNSCC patients (pts) treated with a curative intent. **Methods:** In this prospective study, peripheral blood samples of pts with non-metastatic LAHNSCC, stages III/IV, were analyzed for CTCs before and after treatment, in two scenarios: curative surgical resection and adjuvant radiotherapy (RT) and candidates for a non-surgical strategy (unresectable or organ preservation) with RT concurrent with chemotherapy (CT) or cetuximab, preceded or not by induction CT (ICT). **Results:** Eighty-three pts were included, and the detection rate of baseline CTCs was 94% (78/83). The CTCs counts were significantly correlated with survival, with an a relative increase of 18% in the risk of death (HR=1.18; CI95%: 1.06-1.31; $p<0.001$), 16% in the risk of progression (HR=1.16; CI95%: 1.04-1.28; $p=0.004$) and a reduction of 26% in the odds of complete response to treatment (OR=0.74; CI95%: 0.58-0.95; $p=0.022$) for each increase of one CTC. Pts with CTCs $< 6.5/\text{mL}$ had an estimated two year overall survival (OS) of 85.6% x 22.9% for CTCs $\geq 6.5/\text{mL}$ (HR=0.18; CI95%: 0.06-0.49; $P<0.0001$) and pts with CTCs $\leq 3.8/\text{mL}$ had an estimated two year progression free survival (PFS) of 71.8% x 37% for CTCs $> 3.8/\text{mL}$ (HR=0.32; CI95%: 0.15-0.67; $p=0.001$). After treatment, high CTCs counts (cut-off 6,6/mL) were significantly correlated with worse OS (HR=0.12; CI95%: 0.06-0.40; $p<0.001$) and PFS (HR=0.19; CI95%: 0.06-0.59; $p=0.001$). In the non-surgical subgroup ($n=67$), the presence of microemboli (ME) was correlated with a significantly worse OS

(HR=3.01; CI95%: 1.06-8.52; p=0.029) and PFS (HR=3.84; CI95%: 1.62-9.11; p<0.001). In this subgroup, high CTCs counts (>3,8/mL) and ME were identified as potential predictive factors for efficacy of ICT. Baseline expression of MRP-7 in ME was related to a worse OS (HR=3.49; CI95%: 1.01-12.04; p=0.047) and PFS (HR=3.62; CI95%: 1.08-12.13; p=0.037) and TFG β RI expression in CTCs after treatment to a worse OS (HR=3.60; 1.03-12.59; p=0.032). β -tubulin III expression in CTCs was related to a worse OS in pts receiving ICT (p=0.012). Patients with favorable kinetics of CTCs had better OS (HR=0.22; IC95%: 0.07-0.67; p=0.004) and PFS (HR=0.33; CI95%: 0.13-0.84; p=0.015). **Conclusions:** Baseline CTCs counts were correlated with survival and response to treatment and, along with ME, potential predictive factors of ICT benefit. High CTCs counts after treatment and unfavorable kinetics were also prognostic. Biomarker expression in the CTCs and ME have prognostic and predicitive role in LAHNSCC.

Key-words: Neoplastic Cells, Circulating. Head and Neck Neoplasms. Carcinoma, Squamous Cell/therapy. Biomarkers, Tumor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Box-plot demonstrando a relação entre contagens de CTCs <i>baseline</i> e estágio N.....	39
Figura 2	Box-plot demonstrando a relação entre contagens de CTCs <i>baseline</i> e estágio pela AJCC	40
Figura 3	Correlação entre contagem de CTCs <i>baseline</i> (eixo x) e risco de óbito (HR; eixo y) considerando HR=1,00 para ausências de CTCs	42
Figura 4	Correlação entre contagem de CTCs <i>baseline</i> (eixo x) e risco de progressão de doença (HR; eixo y) considerando HR=1.0 para ausências de CTCs	43
Figura 5	Análise de pontos de corte de CTCs <i>baseline</i> e risco de óbito, demonstrando CTCs acima de 6,5 como ponto de corte ideal.....	45
Figura 6	Curvas de Kaplan Meier correlacionando CTCs <i>baseline</i> (< ou ≥ 6.5/mL) e sobrevida global	46
Figura 7	Análise de pontos de corte de CTCs <i>baseline</i> e risco de óbito, excluindo o extremo superior de contagem de CTCs, demonstrando CTCs acima de 2,8 como segundo ponto de corte ideal	47
Figura 8	Curvas de Kaplan Meier correlacionando CTCs <i>baseline</i> (≤ ou > 2.8/mL) e sobrevida global	48

Figura 9	Análise de pontos de corte de CTCs <i>baseline</i> e risco de progressão, demonstrando CTCs acima de 3,8 como ponto de corte ideal.....	49
Figura 10	Curvas de Kaplan Meier correlacionando CTCs <i>baseline</i> ($\leq$ ou $>$ 3.8/mL) e sobrevida livre de progressão	50
Figura 11	Curvas de Kaplan Meier correlacionando presença de microêmbolos antes do tratamento e sobrevida global	53
Figura 12	Curvas de sobrevida de Kaplan Meier correlacionando presença de microêmbolos antes do tratamento e sobrevida livre de progressão..	54
Figura 13	Fotomicrografias de Células Tumerais Circulantes (CTCs) isoladas do sangue de pacientes com câncer de cabeça e pescoço localmente avançado.....	55
Figura 14	Fotomicrografias de Células Tumerais Circulantes (CTCs) isoladas do sangue de pacientes com câncer de cabeça e pescoço localmente avançado.....	56
Figura 15	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global de acordo com expressão de EGFR (A) e β -tubulina III (B) em CTCs antes do tratamento.....	58
Figura 16	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e sobrevida livre de progressão (B), de acordo com a expressão de MRP-7 em microêmbolos antes do tratamento.....	62

Figura 17	Curvas de Kaplan Meier para expressão de β -tubulina III em ME e sobrevida global	62
Figura 18	Correlação entre contagem de CTCs <i>baseline</i> (eixo x) e risco (HR; eixo y) de óbito	64
Figura 19	Análise de pontos de corte de CTCs <i>baseline</i> e risco de óbito	67
Figura 20	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global, considerando ponto de corte de 6,5 CTCs/mL	67
Figura 21	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida livre de progressão, considerando ponto de corte de 3,8 CTCs/mL, apenas na população submetida a tratamento definitivo (n=67)	68
Figura 22	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global	69
Figura 23	Curva ROC avaliando sensibilidade e especificidade da contagem de CTCs como preditor de resposta completa ao tratamento.....	70
Figura 24	Curvas de Kaplan Meier de sobrevida global (A) e livre de progressão (B) comparando os pacientes submetidos ou não a quimioterapia de indução	72
Figura 25	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global, demonstrando o uso de quimioterapia de indução ou não em pacientes com CTCs <i>baseline</i> acima de 2,8/mL (A) e acima de 3,8/mL (B)	73

Figura 26	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global, demonstrando o uso de quimioterapia de indução ou não em pacientes com CTCs $\leq 2,8/\text{ml}$ (A) e $\leq 3,8/\text{ml}$ (B)	74
Figura 27	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global correlacionando a contagem de CTCs baseline ($\leq$ ou $> 3,8/\text{mL}$) e a realização ou não de QT de indução	75
Figura 28	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global correlacionado a presença ou ausência de microêmbolos e a realização ou não de QT de indução	76
Figura 29	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida livre de progressão correlacionado a presença ou ausência de microêmbolos e a realização ou não de QT de indução	77
Figura 30	Curva de Kaplan Meier para sobrevida global dos pacientes submetidos a quimioterapia de indução (n=33) de acordo com a expressão de β -tubulina III em CTCs baseline	78
Figura 31	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e livre de progressão (B) correlacionando a expressão de β -tubulina III em CTCs baseline e realização ou não de QT de indução	79
Figura 32	Análise de pontos de corte de CTCs após o tratamento e risco de óbito	82

Figura 33	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global, considerando ponto de corte de 6,6 CTCs/mL após o tratamento	83
Figura 34	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global, considerando ponto de corte de 1 CTC/mL após o tratamento	84
Figura 35	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida livre de progressão, considerando ponto de corte de 6,6 CTCs/mL após o tratamento	85
Figura 36	Curvas de Kaplan Meier de sobrevida global (A) e sobrevida livre de progressão (B), de acordo com a presença ou ausência de microêmbolos após o tratamento	86
Figura 37	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global de pacientes com ou sem expressão de TGF- β RI em CTCs após o tratamento	88
Figura 38	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida livre de progressão de pacientes com ou sem expressão de TGF- β RI em CTCs após o tratamento.....	90
Figura 39	Curvas de Kaplan Meier de sobrevida global (A) e sobrevida livre de progressão (B), de acordo com a expressão de MRP-2 em CTCs após o tratamento	91
Figura 40	Curvas de Kaplan Meier de sobrevida global (A) e sobrevida livre de progressão (B), de acordo com a expressão de EGFR em CTCs após o tratamento	92

Figura 41	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global de pacientes com ou sem expressão de TGF- β RI em ME após o tratamento.....	94
Figura 42	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e livre de progressão (B), comparando pacientes com dosagem de CTC2 > CTC1 versus pacientes com dosagem de CTC2 $\leq$ CTC1	95
Figura 43	Análise de pontos de corte do delta de CTCs (CTC2 – CTC1) e risco de óbito	96
Figura 44	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global de acordo com delta de CTCs (< ou $\geq$ 3,8/mL).....	97
Figura 45	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida livre de progressão de acordo com delta de CTCs (< ou $\geq$ 3,8/mL)	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Revisão dos estudos avaliando CTCs em câncer de cabeça e pescoço localmente avançado	18
Tabela 2	Descrição detalhada dos anticorpos testados nas CTCs	33
Tabela 3	Características demográficas da população do estudo.....	37
Tabela 4	Relação entre médias de contagens de CTCs <i>baseline</i> e características clínicas dos pacientes	41
Tabela 5	Correlação entre incremento do número de CTCs <i>baseline</i> e aumento do risco de óbito (HR), considerando ausência de CTCs como HR=1,0.....	42
Tabela 6	Correlação entre incremento do número de CTCs <i>baseline</i> e aumento do risco de progressão, considerando ausência de CTCs como HR=1.0.....	44
Tabela 7	Análise multivariada de sobrevida global para contagem de CTCs <i>baseline</i> na população total do estudo (n=83)	51
Tabela 8	Análise multivariada de sobrevida livre de progressão para contagem de CTCs <i>baseline</i> na população total do estudo (n=83)....	51

Tabela 9	Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em CTCs antes do tratamento (<i>baseline</i>) e sobrevida global.....	57
Tabela 10	Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em CTCs antes do tratamento (<i>baseline</i>) e sobrevida livre de progressão.....	59
Tabela 11	Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em ME antes do tratamento (<i>baseline</i>) e sobrevida global.....	60
Tabela 12	Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em ME antes do tratamento (<i>baseline</i>) e sobrevida livre de progressão.....	61
Tabela 13	Correlação entre incremento do número de CTCs <i>baseline</i> e aumento do risco de óbito ou progressão, considerando ausência de CTCs como HR=1.0, na população submetida a tratamento definitivo (n=67)	64
Tabela 14	Análise multivariada de sobrevida global para contagem de CTCs <i>baseline</i> na população submetida a tratamento definitivo (n=67)	65
Tabela 15	Análise multivariada de sobrevida livre de progressão para contagem de CTCs <i>baseline</i> na população submetida a tratamento definitivo (n=67)	66

Tabela 16	Relação entre médias de contagens de CTCs após o tratamento e características clínicas dos pacientes	81
Tabela 17	Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em CTCs após o tratamento e sobrevida global...	87
Tabela 18	Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em CTCs após o tratamento e sobrevida livre de progressão	89
Tabela 19	Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em ME após o tratamento e sobrevida global	93
Tabela 20	Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em ME após o tratamento e sobrevida livre de progressão	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracil
AJCC	American joint committee on cancer
BRCA1	Breast Cancer 1
BT-3	β -tubulin III
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
CCPLA	Câncer de cabeça e pescoço localmente avançado
CCRm	Câncer colorretal metastático
CD45	Cluster of differentiation
CEC	Carcinoma espinocelular
CECP	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
CECPLA	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localmente avançado
CK	Cytokeratin
CPNPC	Câncer de pulmão não pequenas células
CTCs	Células tumorais circulantes
CTM	Circulating Tumor Microemboli
D1	Dia 1
D22	Dia 22
D43	Dia 43
DMFS	Distant metastasis free survival
DNA	Deoxyribonucleic acid
EC	Estágio clínico
EEC	Extravazamento extracapsular
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial mesenchymal transition
EORTC	European organization of research and treatment of cancer
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
ERCC1	Excision repair and cross-complementation group 1
FISH	Fluorescence in situ hybridization
GLOBOCAN	Global cancer incidence, mortality and prevalence

GORTEC	Groupe d'oncologie radiothérapie tête et cou
HPV	Human papilloma virus
HR	Hazard ratio
IC	Intervalo de confiança
ICC	Imunocitoquímica
ICT	Induction chemotherapy
ICT	Induction chemotherapy
ISET	Isolation by size of epithelial tumor cells
LAHNSCC	Locally advanced head and neck squamous cell carcinoma
LAHNSCC	Locally advanced head and neck squamous cell carcinoma
MACH NC	Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer
ME	Microêmbolos
MMP2	Matrix metalloproteinase 2
MO	Medula óssea
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRP-2	Multidrug resistance associated protein 2
MRP-7	Multidrug resistance associated protein 7
NA	Não avaliado
NR	Não reportado
ns	Não significativo
PCC	Paclitaxel, carboplatina e cetuximabe
PF	Cisplatina e 5-fluorouracil
pts	Patients
QT	Quimioterapia
QTI	Quimioterapia de indução
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Radioterapia
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
TBS	Tris-buffered saline

TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	Transforming growth factor beta
TGF-βRI	Transforming growth factor beta receptor type I
TPF	Docetaxel, Cisplatina e 5-fluorouracil
TPF-C	Docetaxel, cisplatina, 5-fluorouracil e cetuximabe
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
vIII EGFR	Variante III do epidermal growth fator receptor
XRCC1	X-ray repair cross-complementation group 1

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Tratamento do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.....	1
1.1.1	Tratamento Adjuvante após ressecção cirúrgica.....	1
1.1.2	Tratamento definitivo não cirúrgico	4
1.1.3	Resumo do Tratamento do Câncer de Cabeça e Pescoço Localmente Avançado	12
1.2	Conceito e Visão Geral de Células Tumoraes Circulantes.....	13
1.3	Aplicação Clínica de Células Tumoraes Circulantes em Câncer de Cabeça e Pescoço.....	15
1.4	Células Tumoraes Circulantes e Genes de Resistência a Drogas em Câncer de Cabeça e Pescoço	20
1.5	ISSET e Detecção de CTCs.....	25
1.6	Justificativa	26
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo Primário.....	29
2.2	Objetivos Secundários.....	29
3	MATERIAL E MÉTODO.....	30
3.1	Crítérios Gerais de Inclusão	30
3.2	Crítérios Gerais de Exclusão.....	31
3.3	Procedimentos do Estudo.....	31
3.4	Amostras de Sangue.....	32
3.4.1	Isolamento, purificação, contagem, caracterização e imunocitoquímica de CTCs	32
3.5	Análise Estatística	34
4	RESULTADOS	36
4.1	Características Demográficas.....	36

4.2	Características Demográficas e Impacto em Sobrevida.....	38
4.3	Taxa de Detecção de CTCs e Correlação da Contagem de CTCs <i>Baseline</i> com Características Clínicas	38
4.4	Impacto Prognóstico da Contagem de CTCs antes do Tratamento (<i>Baseline</i>)	41
4.5	Impacto Prognóstico da Presença de Microêmbolos antes do Tratamento (<i>Baseline</i>)	52
4.6	Impacto Prognóstico da Expressão de Biomarcadores por Imunocitoquímica nas CTCS antes do Tratamento (<i>Baseline</i>)	54
4.7	Impacto Prognóstico da Expressão de Biomarcadores por Imunocitoquímica em Microêmbolos antes do Tratamento (<i>Baseline</i>)	59
4.8	Potencial Papel Preditor de Resposta ao Tratamento de CTCs e ME antes do Tratamento (<i>Baseline</i>).....	63
4.9	Potencial Papel Preditor de Resposta ao Tratamento da Expressão de Biomarcadores em CTCs antes do Tratamento (<i>Baseline</i>)	77
4.10	Taxa de Detecção de CTCs após o Tratamento e Correlação da Contagem de CTCS com Características Clínicas	80
4.11	Impacto Prognóstico da Contagem de CTCs após o Tratamento	82
4.12	Impacto Prognóstico da Presença de Microêmbolos após o Tratamento.....	86
4.13	Impacto Prognóstico da Expressão de Biomarcadores por Imunocitoquímica nas CTCs após o Tratamento	87
4.14	Impacto Prognóstico da Expressão de Biomarcadores por Imunocitoquímica em Microêmbolos após o Tratamento.....	92
4.15	Impacto Prognóstico da Cinética de CTCs.....	95
5	DISCUSSÃO.....	99
6	CONCLUSÕES	125
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

APÊNDICES

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Apêndice 2 Características Demográficas e Sobrevida

Apêndice 3 Características demográficas e sobrevida na população submetida a tratamento definitivo

Apêndice 4 Características demográficas de acordo com realização ou não de quimioterapia de indução

Apêndice 5 Expressão de biomarcadores nas CTCs em relação a realização ou não de quimioterapia de indução

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRATAMENTO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

Câncer de cabeça e pescoço é um termo amplo que abrange neoplasias malignas epiteliais que se originam dos seios paranasais, cavidade nasal, cavidade oral, faringe e laringe. A quase totalidade dessas neoplasias são carcinomas espinocelulares (CEC) ou carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECP), que são nomenclaturas sinônimas, para os quais os fatores de risco mais importantes são tabagismo e etilismo (ARGIRIS e ENG 2003). Evidências crescentes também documentam a infecção pelo HPV (*human papiloma virus*) como fator de risco de certos subtipos de câncer de cabeça e pescoço, notadamente tumores primários da orofaringe (D'SOUZA et al. 2007; ANG et al. 2010; DAYYANI et al. 2010).

Baseado nos dados do *Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence-GLOBOCAN* (estima-se para 2019 cerca de 700 mil novos casos com cerca de 350 mil óbitos pela doença (BRAY et al. 2018). A maioria dos pacientes, cerca de dois terços, é diagnosticada com doença locorregional avançada, necessitando de tratamento multi-modal mas, a despeito do mesmo, cerca de 50% dos pacientes vão apresentar recidiva de doença em 5 anos (PIGNON et al. 2009; JEMAL et al. 2011).

O manejo do câncer de cabeça e pescoço é multidisciplinar. Cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo e, mais recentemente, imunoterapia, são rotineiramente aplicados, em combinações variadas, para eliminar tanto a doença macroscópica quanto as micrometastases. O objetivo primordial do tratamento é maximizar o potencial de cura da doença preservando a função e a qualidade de vida, tentando-se evitar toxicidades e morbidades a curto, médio e longo prazo.

1.1.1 Tratamento Adjuvante após ressecção cirúrgica

Embora as estratégias preservadoras de órgão sejam utilizadas no tratamento do câncer de cabeça e pescoço avançado em pacientes selecionados, a ressecção cirúrgica ainda é uma opção terapêutica para muitos pacientes. Historicamente, após

a ressecção cirúrgica completa da doença avançada, o risco de recidiva locorregional situa-se ao redor de 40% enquanto o risco de recidiva à distância fica em torno de 25% (LARAMORE et al. 1992). Alguns fatores sabidamente aumentam o risco de recidiva como margens exúguas (< 5 mm) ou positivas, estadiamento T avançado (T3 ou T4), comprometimento de dois ou mais linfonodos, extravazamento extracapsular linfonodal (EEC), invasão vascular, perineural ou linfática e presença de comprometimento linfonodal em cadeias cervicais baixas (níveis IV a VI) (AMDUR et al. 1989; PETERS et al. 1993; ZELEFSKY et al. 1993). Com a presença destes fatores, o risco de recidiva pode ultrapassar 60% (COOPER et al. 1998).

A radioterapia adjuvante tem o papel de reduzir o risco de recidiva locorregional após a cirurgia, principalmente para pacientes de alto risco. Pelo menos duas análises retrospectivas pareadas demonstram este benefício (HUANG et al. 1992; LUNDAHL et al. 1998). Como no tratamento definitivo da doença avançada há benefício da associação de quimioterapia à radioterapia (PIGNON et al. 2000, 2009), este racional foi utilizado também no contexto adjuvante.

Pelo menos três estudos randomizados comprovam o benefício da associação de cisplatina à radioterapia no tratamento adjuvante de doença com alto risco de recidiva (BACHAUD et al. 1996; COOPER et al. 2004; BERNIER et al. 2004). O primeiro estudo a sugerir este benefício foi reportado por BACHAUD et al. (1996), e avaliou a associação de cisplatina 50 mg dose cheia semanal (7 a 9 semanas) concomitante à radioterapia. Foram randomizados 88 pacientes com CEC de cabeça e pescoço estágio clínico (EC) III e IV e presença de EEC. O grupo de tratamento combinado apresentou menores taxas de recidiva locorregional (23% x 41%; $p=0,08$), sobrevida livre de doença em 5 anos (47% x 23%; $p<0,05$) e sobrevida global (SG) em 5 anos (36% x 13%; $p<0,01$).

COOPER et al. (2004) relataram os resultados de estudo RTOG 9501 avaliando a associação de cisplatina na dose de 100 mg/m² a cada três semanas (D1, D22 e D43) concomitante à radioterapia. Foram randomizados 459 pacientes portadores de CEC de cavidade oral, orofaringe, laringe e hipofaringe após a ressecção completa e que possuíam fatores de alto risco de recidiva (invasão de dois ou mais linfonodos, EEC ou margens positivas). O grupo de tratamento combinado apresentou melhores taxas de controle locorregional em dois anos (82% x 72%; HR=

0,61; IC95%: 0,41-0,91; $p=0,01$) e sobrevida livre de doença (HR=0,78; IC95%: 0,61-0,99; $p=0,04$) porém não houve diferença significativa em SG (HR=0,84; IC 95%: 0,65-1,09; $p=0,19$).

BERNIER et al. (2004) relataram os resultados do estudo EORTC 22931, nos mesmos moldes do estudo do RTOG, utilizando combinação semelhante de cisplatina à radioterapia. Foram randomizados 334 pacientes portadores de CEC de cavidade oral, orofaringe, laringe e hipofaringe EC III e IV (exceto laringe T3N0) com presença de achados patológicos desfavoráveis (margens positivas, EEC, invasão perineural ou invasão vascular e, para pacientes com primário de cavidade oral ou orofaringe, comprometimento de linfonodos níveis IV ou V). Mais uma vez o grupo de tratamento combinado apresentou menores taxas de recidiva locorregional em 5 anos (18% x 31%; $p=0,007$) e sobrevida livre de progressão (SLP) em 5 anos (47% x 36%; HR=0,75; IC95%: 0,56-0,99; $p=0,04$). Neste estudo demonstrou-se também um ganho significativo na SG em 5 anos (53% x 40%; HR=0,70; IC95%: 0,52-0,95; $p=0,02$). Numa análise combinada dos estudos do RTOG e do EORTC (BERNIER et al. 2005) avaliando os fatores de risco de recidiva e o impacto da associação da cisplatina à radioterapia adjuvante, os únicos fatores para os quais o impacto do tratamento combinado foi significativo em ambos os estudos, inclusive com ganho de SG, foram o EEC e a presença de margens positivas.

Portanto, para pacientes com CEC de cabeça e pescoço ressecados e que apresentam margens positivas ou EEC deve ser oferecido tratamento adjuvante com radioterapia associado à cisplatina, tendo em vista seu impacto positivo em SG, às custas de um melhor controle locorregional. Em relação a dose 100 mg/m² a cada três semanas (D1, D22 e D43) é a dose preferencial, visto que estudo prospectivo e randomizado de fase III demonstrou que cisplatina semanal concomitante a radioterapia, na dose de 30 mg/m², foi inferior a dose alta a cada três semanas no desfecho de controle locorregional em dois anos (58,5% x 73,1%; HR=1,76; IC 95%: 1,11-2,79; $p=0,014$), provavelmente pela dose cumulativa ter sido inferior a 200 mg/m² na maioria dos pacientes no grupo experimental (NORONHA et al. 2018). Em casos selecionados, considera-se ainda aceitável o uso de cisplatina semanal na dose de 40 mg/m² associado à radioterapia (que culminaria em uma dose cumulativa

acima de 200 mg/m²), para pacientes que tenham contra-indicação à dose alta e sejam capazes de receber a dose semanal.

Para pacientes que não possuam estes fatores de risco maiores de recidiva (EEC ou margem positiva), mas que possuam outros fatores de risco, a indicação de cisplatina concomitante à radioterapia no cenário adjuvante deve ser discutida de maneira individualizada. Análises retrospectivas de bases de dados (TRIFILETTI et al. 2017; ZUMSTEG et al. 2019) sugerem, por exemplo, que pacientes com mais de dois linfonodos positivos, mesmo sem EEC, podem se beneficiar desta estratégia.

1.1.2 Tratamento definitivo não cirúrgico

Historicamente a cirurgia foi a base do tratamento do câncer de cabeça e pescoço ressecável para a maioria dos pacientes, o que poderia levar a morbidade significativa em alguns casos, principalmente relacionada à perda de capacidade fonatória e distúrbios de deglutição. A radioterapia era reservada apenas para pacientes com doença irresssecável ou inoperáveis. Este cenário mudou com a ascensão das estratégias preservadoras de órgão, principalmente no tratamento do câncer de orofaringe, laringe e hipofaringe, que utilizavam a radioterapia como pilar do tratamento, reservando a cirurgia para aqueles pacientes com doença não responsiva ou recidiva. Com a adição da quimioterapia e de terapias alvo à radioterapia observou-se um melhor controle locorregional da doença, renovando o interesse em estratégias que melhorassem o controle sistêmico, como a quimioterapia de indução. Estas modalidades terapêuticas e seus contextos serão discutidos a seguir.

- **Quimioterapia e Terapias Alvo Concomitante à Radioterapia**

Diversos estudos avaliaram o impacto da adição da quimioterapia ao tratamento radioterápico, com intuito de melhorar seus resultados, sendo que a maioria deles demonstrou benefício desta associação (BRIZEL et al. 1998; WENDT et al. 1998; CALAIS et al. 1999; JEREMIC et al. 2000; FORASTIERE et al. 2003; ADELSTEIN et al. 2003). O trabalho mais robusto nesse contexto foi a metanálise publicada por PIGNON et al. (2000), que avaliou 63 estudos e quase 11000 pacientes, demonstrando de maneira definitiva que a adição da quimioterapia à

radioterapia resultava em um benefício absoluto de sobrevida de 4% em 5 anos (HR=0,90; IC95%: 0,85-0,94; $p<0,0001$). Quando analisada a adição de maneira concomitante, o benefício da quimioterapia foi ainda maior, atingido 8% de diferença absoluta de sobrevida em 5 anos (HR=0,81; IC95%: 0,76-0,88; $p<0,0001$). Este benefício foi confirmado com a atualização desta metanálise, que incluiu 24 estudos adicionais. O benefício do tratamento se manteve em doença EC III ou IV, entre os diferentes sítios primários e quando se utilizava fracionamento padrão ou alternativo da radioterapia. Entretanto, a quimioterapia não teve efeito significativo na redução de recidiva à distância e resultou em maior toxicidade do tratamento, principalmente mucosite, dermatite e mielossupressão (PIGNON et al. 2009).

No cenário de estratégia preservadora de órgão para tratamento do câncer de laringe, evidências também suportam o uso do tratamento de quimio e radioterapia concomitantes. O principal estudo neste contexto é o RTOG 9111 (FORASTIERE et al. 2003), que incluiu 547 pacientes portadores de CEC de laringe EC III ou IV não metastáticos à distância, candidatos à laringectomia total com intuito curativo, que foram randomizados para três braços de tratamento: radioterapia exclusiva, quimioterapia de indução (Cisplatina e 5-FU por três ciclos) seguida de radioterapia isolada ou radioterapia concomitante à cisplatina 100 mg/m² D1, D22 e D43. Com um seguimento mediano de 3,8 anos, a taxa de preservação de laringe em dois anos foi melhor com o tratamento combinado, quando comparado à radioterapia isolada ou à quimioterapia de indução seguida de radioterapia (88% x 70%; $p<0,001$ x 75%; $p=0,005$ respectivamente). A sobrevida livre de laringectomia em dois anos também foi significativamente maior para o grupo do tratamento concomitante (66% x 59% x 53%; $p=0,01$). Numa atualização do estudo (FORASTIERE et al. 2013), com seguimento mediano de 6,9 anos, a taxa de controle locorregional em 5 anos foi de 68,8% para o tratamento concomitante, 54,9% para quimioterapia de indução e 51% para radioterapia ($p=0,0018$ e $p=0,0005$ respectivamente para concomitância e indução *versus* radioterapia isolada). A taxa de preservação de laringe em 5 anos manteve a vantagem do tratamento combinado sobre a quimioterapia de indução e a radioterapia isolada (83% x 70,5%; $p=0,005$ x 65,7%; $p<0,001$ respectivamente). Entretanto, em 5 anos, a sobrevida livre de laringectomia e sobrevida livre de doença foi semelhante entre o tratamento concomitante (46,6% e 39%) e a quimioterapia de

indução (44,6% e 38,6%), e ambos foram superiores a radioterapia isolada (33,9% e 27,3%; $p=0,011$ e $p=0,0058$). Não houve diferença em SG em 5 anos entre os grupos, situando-se ao redor de 55%.

Tendo em vista a toxicidade aguda e tardia da associação de quimioterapia à radioterapia, uma estratégia explorada foi a associação de terapias alvo molecular à radioterapia. Os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço exibem alta expressão de EGFR, *epidermal growth factor receptor* (MENDELSON e BASELGA 2003), além disso, a radioterapia aumenta a expressão de EGFR e o bloqueio de sua sinalização tem efeito radiosensibilizante (LIANG et al. 2003; BONNER et al. 2004). Baseado nestes dados, BONNER et al. (2006) conduziram estudo de fase III com 424 pacientes portadores de CEC de orofaringe, laringe e hipofaringe EC III e IV randomizados para tratamento com radioterapia isolada ou radioterapia concomitante a cetuximabe (dose de ataque de 400 mg/m^2 iniciada uma semana antes do início da radioterapia seguida de 250 mg/m^2 semanal concomitante à radioterapia). A taxa de controle local em três anos (47% x 34%; HR=0,68; IC95%: 0,52-0,89; $p=0,01$) e a SG em três anos (55% x 45%; HR=0,74; IC95%: 0,54-0,90; $p=0,05$) favoreciam o grupo de tratamento combinado. Não houve diferença na taxa de recidiva à distância entre os grupos. Atualização do estudo (BONNER et al. 2010) demonstra superioridade do tratamento combinado na SG em 5 anos (45,6% x 36,4%; HR=0,73; IC95%: 0,56-0,95; $p=0,018$). Além disso, foi demonstrado que pacientes que apresentaram *rash* acneiforme $\geq$ grau II alcançaram sobrevida significativamente maior que àqueles com ausência de *rash* ou *rash* grau I (HR=0,49; IC95%: 0,34-0,72; $p=0,002$).

Comparações diretas entre quimiorradioterapia baseada em cisplatina e biorradioterapia com cetuximabe foram publicadas recentemente em dois estudos prospectivos e randomizados de fase III, porém numa população específica portadora de tumores de orofaringe HPV relacionados, localmente avançados. O estudo RTOG 1016 (GILLISON et al. 2019) randomizou 987 pacientes p16 positivos para radioterapia concomitante a cisplatina ou cetuximabe, com desfecho primário de não inferioridade do cetuximabe em SG. O estudo desmontrou, entretanto, inferioridade do cetuximabe para SG em 5 anos (77,9% x 84,6%; HR=1,45; IC95%: 1,03-2,05; $p=0,0163$), SLP em 5 anos (67,3% x 78,4%; HR=1,72; IC95%: 1,29-2,29; $p=0,0002$)

e taxa de falha locorregional em 5 anos (17,3% x 9,9%; HR=2,05; IC95%: 1,35-3,10; p=0,0005). O estudo De-Escalate (MEHANNA et al. 2019) randomizou 334 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de orofaringe HPV relacionado de baixo risco (p16 positivo e carga tabágica ≤ 10 anos/maço) para radioterapia concomitante a cisplatina ou cetuximabe, tendo como desfecho primário incidência de toxicidade severa (graus 3 a 5). Não houve diferença significativa na toxicidade, porém o cetuximabe foi inferior em SG em dois anos (97,5% x 89,4%; HR=5,0; IC95%: 1,7-14,7; p=0,001) e taxa de recidiva em dois anos (6% x 16,1%; HR=3,4; IC95%: 1,6-7,2; p=0,0007).

De acordo com os resultados dos diversos estudos controlados acima citados, tem-se demonstrada a superioridade da associação de terapias radiosensibilizantes quando comparados à radioterapia isolada no manejo não cirúrgico do câncer de cabeça e pescoço localmente avançado (doença irresssecável e estratégia preservadora de órgão). A cisplatina foi a droga mais estudada, especialmente na dose de 100 mg/m² a cada três semanas (D1, D22 e D43), sendo aceitável o uso de doses semanais (40 mg/m² semanal) em pacientes selecionados. A associação de cetuximabe à radioterapia também se mostrou superior à radioterapia isolada, porém estudos recentes demonstram sua inferioridade em relação à associação de cisplatina, mesmo em uma população de melhor prognóstico como os tumores de orofaringe HPV relacionados, o que coloca esta droga como opção apenas para pacientes com contra-indicação absoluta ou relativa ao uso de cisplatina. A associação de ambas as estratégias (cisplatina e cetuximabe combinadas à radioterapia) não se mostrou superior a quimiorradioterapia com cisplatina apenas (ANG et al. 2010). Outros esquemas radiosensibilizantes também são superiores à radioterapia isolada no tratamento combinado, notadamente a carboplatina e o 5-fluorouracil (5-FU) e são opções no manejo dos pacientes, embora tenham sido menos utilizados com o advento da biorradioterapia.

- **Quimioterapia de indução**

O interesse na quimioterapia de indução se renovou nos últimos anos, pelo seu potencial de redução de recidiva à distância, que tem ganhado importância crescente frente ao melhor controle locorregional proporcionando por técnicas mais

modernas de radioterapia bem como a associação concomitante da quimioterapia ou terapia alvo. O CEC de cabeça e pescoço é uma neoplasia altamente responsiva na apresentação inicial e quimioterapia de indução baseada em platina produz altas taxas de resposta neste contexto. Apesar desta atividade anti-tumoral, diversos estudos de fase III que compararam a quimioterapia de indução seguida de controle local (cirurgia, radioterapia ou ambos) com tratamento local isolado não demonstraram benefício em sobrevida (PACCAGNELLA et al. 1994; DOMENGE et al. 2000; ZORAT et al. 2004). Tais estudos demonstravam redução do risco de recidiva à distância, porém o efeito no controle locorregional foi insignificante. Em avaliação de metanálise (PIGNON et al. 2000), a quimioterapia de indução resultou em aumento absoluto não significativo de SG de 2% em 5 anos (HR=0,95; IC95%: 0,88-1,01; p=0,10). Entretanto, na análise de 15 estudos contendo combinação de cisplatina e 5-FU, foi observado benefício em SG (HR=0,88; IC95%: 0,79-0,97; p=0,005).

A introdução de regimes quimioterápicos mais ativos, contendo novas drogas, principalmente os taxanos, fortaleceu novamente o racional para o uso de quimioterapia de indução, desta vez com terapias triplas. Nesse contexto, dois estudos emergiram com resultados interessantes. O estudo TAX 323 (VERMORKER et al. 2007) randomizou 358 pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço irressecável EC III e IV para receberem docetaxel, cisplatina e 5-FU (TPF) ou cisplatina e 5-FU (PF) de indução por 4 ciclos a cada 21 dias seguido de radioterapia isolada. Com um seguimento mediano de 32,5 meses, a SLP mediana foi de 11 meses no grupo TPF e 8,2 meses no grupo PF (HR=0,72; IC95%: 0,57-0,91; p=0,007). O tratamento com TPF também resultou numa redução de 27% no risco de morte, com SG mediana de 18,8 meses, comparada com 14,4 meses para o grupo PF (HR=0,73; IC95%: 0,56-0,94; p=0,02) e taxas de SG em três anos de 37% *versus* 26% respectivamente.

O estudo TAX 324 (POSNER et al. 2007) randomizou 501 pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço irressecáveis ou ressecáveis candidatos à preservação de órgão, para quimioterapia de indução com esquema TPF ou PF por três ciclos seguidos de radioterapia concomitante a carboplatina semanal. Com um seguimento mínimo de dois anos a SG em três anos foi de 62% no grupo TPF e 48%

no grupo PF (HR=0,70; IC95%: 0,54-0,90; p=0,006), com SG mediana de 71 *versus* 30 meses respectivamente. A SLP (taxa em dois anos de 36% x 13%; HR=0,71; IC95%: 0,56-0,90; p=0,004) e o controle locorregional (taxa de falha locorregional em dois anos de 30% x 38%; p=0,04) também foram melhores no grupo TPF.

Outro cenário que a quimioterapia de indução com esquema TPF se mostrou superior a PF foi como estratégia preservadora de órgão, conforme avaliado no estudo GORTEC 2000-01 (POINTREAU et al. 2009) que randomizou 213 pacientes portadores de CEC de laringe e hipofaringe candidatos à preservação de órgão para PF ou TPF, ambos seguidos de radioterapia. Com um seguimento mediano de 36 meses a taxa de preservação de laringe em três anos foi de 70,3% com TPF *versus* 57,5% com PF (p=0,03), sem diferença em SG em 3 anos (60% em ambos os braços; p=0,57) ou sobrevida livre de doença em três anos (58% x 44%; p=0,14). Estes resultados foram confirmados em análise de longo prazo do estudo (JANORAY et al. 2016), demonstrando taxa de preservação de laringe em 10 anos de 70,3% para TPF *versus* 46,5% para PF (p=0,01).

Apesar dos bons resultados, cabe lembrar que os estudos TAX 323, TAX 324 e GORTEC 2000-01 não comparam diretamente a estratégia de quimioterapia de indução com o tratamento considerado padrão, ou seja, quimiorradioterapia baseada em cisplatina. A comparação é de uma indução baseada em um regime de três drogas (TPF) *versus* um regime de duas drogas (PF) e a superioridade do regime triplo hoje é bem clara com base na metá-análise do grupo MACH NC (BLANCHARD et al. 2013) que incluiu 5 estudos randomizados que comparavam estes dois esquemas num total de 1772 pacientes. O esquema TPF se associou a uma melhor SLP (HR=0,78; IC95%: 0,69-0,87; p<0,001), SG (HR=0,72; IC95%: 0,63-0,83; p<0,001), controle locorregional (HR=0,79; IC95%: 0,66-0,94; p=0,007) e redução do risco de recidiva à distância (HR=0,63; IC95%: 0,45-0,89; p=0,009).

Fica claro por estes estudos que a quimioterapia de indução com esquema TPF é superior à indução com PF, mas resta a dúvida se esta estratégia é superior a quimiorradioterapia. Estudos de fase II sugerem superioridade significativa em desfechos como taxa de resposta completa ao tratamento e menor necessidade de cirurgia de resgate após o tratamento (PACCAGNELLA et al. 2010). Porém, até o momento, os 5 estudos de fase III com resultados publicados geraram dados

controversos (HADDAD et al. 2013; HITT et al. 2014; COHEN et al. 2014; GHI et al. 2017; GEOFFROIS et al. 2018).

No estudo reportado por HITT et al. (2014), foram randomizados 439 pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço localmente avançado irresssecável para três grupos de tratamento: quimiorradioterapia (cisplatina 100 mg/m² D1, D22 e D43 concomitante a radioterapia), quimioterapia de indução com PF por três ciclos ou TPF por três ciclos, ambos seguidos de quimiorradioterapia aos mesmos moldes. Na análise por intenção de tratar não houve diferença entre os três grupos em SLP (14,6 x 14,3 x 13,8 meses respectivamente para TPF indução, PF de indução e quimiorradioterapia; p=0,90) ou tempo para falha de tratamento (7,9 x 7,9 x 8,2 meses respectivamente; p=0,90). A SG também não foi estatisticamente diferente analisando os três grupos, porém um número considerável de pacientes alocados nos braços quimioterapia de indução (cerca de 30%) não receberam tratamento de quimiorradioterapia por motivos outros que não progressão de doença. Quando estes pacientes são excluídos da análise observa-se uma diferença a favor da quimioterapia de indução, mostrando que a seleção adequada de pacientes para esta estratégia é fundamental.

Outros dois estudos de fase III comparando quimioterapia de indução seguido de quimiorradioterapia *versus* quimiorradioterapia (HADDAD et al. 2013; COHEN et al. 2014) tiveram resultados negativos, porém ambos sofreram com baixo recrutamento e têm questionamentos relacionados aos seus desenhos. Num quarto artigo, GHI et al. (2017) reportaram os resultados do estudo prospectivo de fase III do grupo italiano de estudos do câncer de cabeça e pescoço, num desenho 2:2 comparando quimioterapia de indução seguido de tratamento local *versus* tratamento local inicial (desfecho primário: SG) e quimiorradioterapia *versus* biorradioterapia (desfecho primário: toxicidade) em 415 pacientes. O desfecho primário do estudo favoreceu a quimioterapia de indução com aumento significativo de SG, com mediana de 54,7 *versus* 31,7 meses e taxa em três anos de 57,5% *versus* 46,5% (HR=0,75; IC 95%: 0,55-0,97; p=0,029). Além disso, TPF de indução levou a melhores taxas de resposta completa ao tratamento (43,5% x 28%; p=0,0028), menores taxas de recaída locorregional (41% x 48%; HR=0,74; IC95%: 0,55-0,98; p=0,036) e maior SLP em três anos (47% x 38,5%; HR= 0,72; IC95%: 0,55-0,93;

$p=0,013$), numa população composta em sua maioria por pacientes com doença localmente muito avançada (mais de 40% T4; mais de 70% N2 ou N3). Em contraste aos resultados do grupo italiano, o grupo francês GORTEC publicou o estudo 2007-02 (GEOFFROIS et al. 2018), que randomizou 370 pacientes com doença cervical avançada (N2b, N2c e N3) para quimiorradioterapia concomitante (esquema carboplatina + 5-FU) ou TPF indução seguido de radioterapia concomitante a cetuximabe. Após um seguimento mediano de 2,8 anos, não houve diferença em SLP em dois anos, que era o desfecho primário do estudo, com 36% para TPF de indução *versus* 38% para quimiorradioterapia inicial (HR=0,93; IC95%: 0,73-1,20; $p=0,58$). Também não houve diferença em controle locorregional (HR=0,98; IC95%: 0,74-1,30; $p=0,90$) ou SG (HR=1,12; IC95%: 0,86-1,46; $p=0,39$) embora se observe uma diferença significativa em taxa de metástases a distância, favorecendo o grupo TPF (HR=0,54; IC95%: 0,86-1,46; $p=0,05$).

Outro esquema de quimioterapia de indução que foi estudado, especialmente na população de pacientes com tumores de orofaringe HPV relacionados, é a combinação de paclitaxel, carboplatina e cetuximabe (PCC) que foi avaliada em estudos de fase II. KIES et al. (2010) avaliaram o esquema PCC em 47 pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço localmente avançado, a maioria primário de orofaringe, em estudo de fase II de braço único. A taxa de resposta objetiva à indução foi de 97%, as taxas de SG e SLP em três anos foram de 91% e 87% respectivamente, sendo que na população HPV relacionada ($n=12$) nenhum paciente apresentou recidiva de doença. Mais recentemente, HADDAD et al. (2019) reportaram os resultados de estudo de fase II randomizado que comparou indução com esquema PCC *versus* TPF + cetuximabe (TPF-C), seguidos de tratamento local, em 136 pacientes com CEC de cabeça e pescoço localmente avançado. A taxa de SLP em dois anos foi semelhante em ambos os braços (89% para PCC *versus* 88% para TPF-C). Dividindo a população em baixo risco (a maioria dos HPV relacionados) e intermediário/alto risco, houve vantagem numérica em favor do PCC para SLP em dois anos em baixo risco (96% x 88%), enquanto que na população de risco intermediário e alto TPF-C foi superior (89% x 67%).

Portanto, as estratégias de quimioterapia de indução tem como racional teórico algumas vantagens, como o tratamento precoce da doença micrometastática,

reduzindo a incidência de recidiva à distância, a redução do volume tumoral, tendo em vista as altas taxas de resposta da poliquimioterapia neste contexto, possibilitando um melhor controle locorregional (que se traduz em maiores taxas de resposta completa ao término do tratamento e menor necessidade de cirurgia de resgate), além da possibilidade de de-escalonamento do tratamento concomitante em pacientes respondedores (utilização de carboplatina ou cetuximabe, ou mesmo radioterapia isolada) evitando toxicidades agudas e crônicas. Ainda pode-se analisar *in vivo* a quimiossensibilidade tumoral, o que poderia selecionar pacientes com doença resistente para estratégia cirúrgica.

Entretanto, até o momento, os dados prospectivos são conflitantes, sendo que a quimiorradioterapia acumula um maior volume de evidência e pode ser considerada tratamento padrão. Porém alguns resultados positivos colocam a possibilidade de utilização da quimioterapia de indução como uma das principais discussões no manejo não cirúrgico de pacientes com CEC de cabeça e pescoço localmente avançado. Na prática clínica, considera-se a utilização de QT de indução em pacientes com alto risco de recidiva à distância (doença N2 e N3, linfonodos em níveis IV e V) e com grande volume tumoral (lesões T4 ou irressecáveis) pelo potencial benefício desta estratégia, e esta opção é discutida individualmente.

1.1.3 Resumo do Tratamento do Câncer de Cabeça e Pescoço Localmente Avançado

Em suma, podemos identificar dois cenários de tratamento do câncer de cabeça e pescoço localmente avançado, com algumas variações dentro de cada um:

- Pacientes submetidos à ressecção cirúrgica curativa inicial de sua doença, que terão indicação de tratamento adjuvante complementar de radioterapia com ou sem associação de quimioterapia de maneira adjuvante, com intuito de redução do risco de recidiva da doença;
- Pacientes com doença irressecável ou candidatos a estratégia preservadora de órgão, que por estes motivos serão submetidos a tratamento não cirúrgico baseado em combinação de radioterapia, quimioterapia e/ou terapias alvo (quimiorradioterapia concomitante, biorradioterapia concomitante, quimioterapia de indução seguida de quimiorradioterapia ou biorradioterapia).

Conforme discutido previamente, existem diversas estratégias de tratamento para esta população, e a escolha baseia-se em fatores clínicos e patológicos, como a preferência de cirurgia inicial em tumores de cavidade oral (mais radioresistentes, mais acessíveis a ressecção cirúrgica e a técnicas de reconstrução) ou de estratégia não cirúrgica preservadora de função de órgão em tumores de orofaringe, laringe e hipofaringe. E dentre as possibilidades de tratamento não cirúrgico (ressaltando que quimiorradioterapia baseada em cisplatina deve ser considerada o tratamento padrão), discute-se o uso de quimioterapia de indução em pacientes que potencialmente possam beneficiar-se desta estratégia, ou seja, capazes de tolerar tal tratamento e que tenham alto risco de recidiva à distância (N2, N3, níveis cervicais baixos acometidos) ou alto volume de doença (T4, N3), ou ainda o uso de radioterapia com cetuximabe em pacientes com contra-indicação à quimioterapia com cisplatina.

Portanto, fatores prognósticos e preditivos seriam desejáveis nesta população, como uma maneira de personalizar o tratamento, oferecendo a melhor estratégia baseada em fatores intrínsecos ao tumor, microambiente tumoral e relacionados ao próprio paciente. Mais útil ainda seria se tais fatores pudessem ser avaliados de maneira pouco invasiva, com uma estratégia de biópsia líquida, passível de ser realizada previamente à escolha do tratamento e repetida ou monitorizada ao longo do curso de todo o tratamento.

1.2 CONCEITO E VISÃO GERAL DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

Tumores iniciais crescem como massas não-vascularizadas, que podem proliferar por meio de uma vasculatura pré-existente dentro de um microambiente. Após atingirem um tamanho de aproximadamente 2-3 mm, os tumores requerem sua própria vascularização (FOLKMAN 1995). Assim, a indução de angiogênese e de vasculatura tumoral é considerada fator patognomônico do processo maligno e são necessárias à progressão tumoral (STRIETER 2005). Além disso, células cancerígenas podem propagar-se invadindo os vasos sanguíneos vizinhos ou usando estes capilares formados dentro do tumor. Nas duas formas, há indução de transição

epitélio-mesênquima (EMT - *epithelial to mesenchymal transition*), que constitui uma mudança na expressão de moléculas de adesão (ex.: integrinas, lamininas) e na ativação de proteases (ex.: metaloproteinases de matriz), que eventualmente permitem às células tumorais entrar na circulação (ELSHIMALI e GRODY 2006).

Acredita-se que a disseminação do câncer dependa da presença de células tumorais circulantes (CTCs - *circulating tumor cells*), que são células raras circundadas por bilhões de células hematopoiéticas na circulação sanguínea (MEGO et al. 2010). A presença de CTCs no sangue periférico foi relatada pela primeira vez por ASHWORTH (1869), um médico austríaco, quando fazia a necrópsia de um paciente com tumores subcutâneos metastáticos, situados na parede anterior do tórax e do abdômen. Ele observou células na circulação (obtidas da veia safena da perna direita) idênticas às provenientes dos tumores e postulou que se estas células eram oriundas de uma estrutura tumoral existente, elas deviam ter atravessado grande parte do sistema circulatório para alcançar a parte interna da veia safena. Atualmente, teoriza-se que as chamadas CTCs tendam a metastatizar em certos órgãos, que são seletivos para determinados tumores, conforme conceito histórico de “solo e semente”, formulado por Stephen Paget (LURJE et al. 2010).

Considerando-se que CTCs e o tumor de onde provêm são considerados “estranhos” para o sistema imune hospedeiro, eles precisam escapar da resposta imune. Este escape é realizado por meio da habilidade de formar grupos de microtumores ou microêmbolos (ME), que atingem sítios distantes. Tem sido demonstrado que a formação de agregados de 3-10 CTCs escapa do sistema imune, promovendo recrutamento de fatores pró-angiogênicos a partir do microambiente local e expressão de novos marcadores de superfície (MUKAI 2005).

A circulação espontânea de células tumorais e/ou de ME determina o comportamento tumoral invasivo (PATERLINI-BRECHOT e BENALI 2007) e geralmente é indetectável por análise histopatológica convencional e por exames de imagem de alta resolução. Por isso, ensaios imunoistoquímicos e moleculares mais sensíveis têm sido desenvolvidos e vêm permitindo a detecção específica de células tumorais metastáticas em linfonodos regionais, sangue periférico e medula óssea (MO) (MULLER et al. 2006; RIETHDORF et al. 2008a; RIETHDORF et al. 2008b).

A detecção primária de CTCs pode ajudar a identificar pacientes em necessidade de terapias sistêmicas adicionais antes ou após um tratamento definitivo local, como ressecção cirúrgica ou radioterapia do tumor primário. Apesar de todas as terapias serem desenvolvidas para prevenir a recaída metastática, a seleção de pacientes baseia-se no risco estatístico de desenvolverem recorrência, sem saber se de fato eles abrigam qualquer CTC. Isto leva a super-tratamento desses pacientes com agentes tóxicos com efeitos colaterais graves (FEHM et al. 2008). Desta forma, incluir a detecção ou contagem de CTCs na análise dos pacientes tornaria o tratamento mais personalizado.

1.3 APLICAÇÃO CLÍNICA DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Existem alguns trabalhos na literatura investigando o papel de detecção, análise quantitativa e qualitativa de CTCs em carcinoma epidermóide cabeça e pescoço (CECP) localmente avançado.

PAJONK et al. (2001) relataram um dos primeiros trabalhos sobre o tema. Foram analisados 77 pacientes portadores de CECP avançado tratados com radioterapia (definitiva ou adjuvante), submetidos à técnica de amplificação de RNA (*ribonucleic acid*) por RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) para detecção de células circulantes com CK19 (*cytokeratin 19*). Neste estudo apenas 5 pacientes apresentaram detecção positiva, tendo estes pacientes apresentado pior evolução clínica, já que a presença destas células se correlacionou com uma maior chance de recidiva de doença.

Posteriormente JATANA et al. (2010) analisaram 48 pacientes portadores de CECP e submetidos a tratamento cirúrgico. A técnica utilizada foi um processo de enriquecimento através de depleção de hemácias, separação imunomagnética e imunocoloração para CK 8 18 e 19. Nesta análise, a ausência de células tumorais circulantes se correlacionou de maneira significativa com maior sobrevida livre de doença ($p=0,01$). Ainda, a presença de mais de 25 células por mililitro se correlacionou de maneira significativa com pior desfecho clínico ($p=0,04$). Resultados semelhantes foram observados por TOYOSHIMA et al. (2009) ao

analisarem 48 pacientes portadores de CEC de cavidade oral submetidos à ressecção cirúrgica. Pacientes foram avaliados para detecção de CTCs com detecção de mRNA (*messenger ribonucleic acid*) por RT-PCR 4 semanas após o procedimento, com uma taxa de detecção de 37,5%. A ausência de CTCs detectáveis se correlacionou de maneira significativa a uma melhor sobrevida livre de doença ($p=0,01$).

A técnica do *CellSearch System*® também foi estudada em CECP. NICHOLS et al. (2012) analisaram 15 pacientes portadores de CECP avançados tratados de maneira multidisciplinar. A detecção foi positiva em 6 destes pacientes (40%) e correlacionou-se com a presença de nódulos pulmonares maiores que 1 cm ($p=0,04$), sugerindo disseminação sistêmica da doença. Além disso, foi sugerido que a ausência de CTCs poderia correlacionar-se a um melhor desfecho, mas sem significância estatística ($p=0,11$). Outro estudo avaliando a mesma técnica foi relatado por BOZEC et al. (2013), que avaliaram a presença de CTCs em 49 pacientes com CEC de cavidade oral e orofaringe localmente avançados antes do tratamento. A taxa de detecção foi muito baixa, com apenas 6 pacientes com CTCs detectáveis (12%), e não houve qualquer correlação com características clínicas ou desfechos dos pacientes.

Os maiores estudos avaliando o *CellSearch System*® foram reportados por BUGLIONE et al. (2012) e GRÖBE et al. (2014). No primeiro foram incluídos 73 pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço localmente avançado, incluindo sítios primários não usuais como seios paranasais, cavidade nasal e nasofaringe. A taxa de detecção de CTCs foi de 15% e houve correlação entre taxa de resposta e ausência ou desaparecimento de CTCs durante o tratamento ($p=0,017$), porém não houve correlação significativa entre a presença de CTCs e sobrevida ou risco de recidiva (BUGLIONE et al. 2013). No segundo, foram avaliados 80 pacientes portadores de CEC de cavidade oral, com uma taxa de detecção de 12,5% (10/80). Houve correlação da presença de CTCs e menor sobrevida livre de recidiva ($p<0,001$), porém sem impacto em SG (GRÖBE et al. 2014).

TINHOFFER et al. (2012) analisaram 38 pacientes portadores de CECP submetidos a tratamento multidisciplinar (quimiorradioterapia, biorradioterapia ou quimioterapia de indução seguida de biorradioterapia) por meio da detecção de CTCs por citometria de fluxo (CD45⁻, EpCAM⁺ e CK⁺) além da pesquisa de expressão de

EGFR e de sua forma fosforilada nestas células. Demonstrou-se neste estudo a possibilidade de análise de CTCs em diferentes momentos do tratamento, denotando a utilidade desta ferramenta na avaliação precoce de desfechos, e consequente seleção de estratégias terapêuticas no decurso do tratamento, porém não foi evidenciado nenhum impacto prognóstico ou preditivo destas análises.

O maior estudo publicado até o momento avaliando CTCs em CECP incluiu de maneira prospectiva 144 pacientes portadores de tumores localmente avançados de cavidade oral, orofaringe, laringe, hipofaringe e cervical primário oculto após ressecção cirúrgica e antes do tratamento adjuvante baseado em radioterapia (TINHOFER et al. 2014). As CTCs foram detectadas por técnica de RT-PCR do mRNA do EGFR. A taxa de detecção foi de 29% (42/144) e, na população global do estudo, não houve correlação entre a presença de CTCs e SG (HR=1,0; IC95%: 0,5-2,2; p=0,91) ou SLP (HR=1,4; IC95%: 0,6-3,1; p=0,35).

A Tabela 1 sumariza os dados publicados até o momento sobre a aplicação clínica de CTCs em câncer de cabeça e pescoço localmente avançado, com número de pacientes, técnicas utilizadas e taxa de detecção, além de tempo de seguimento e se houve correlação significativa com taxa de resposta, sobrevida global (SG) ou sobrevida livre de progressão (SLP). Em suma, o que podemos observar nestes estudos, é que as pesquisas com CTCs em CECP ainda são bastante iniciais, apresentando um grande potencial para desenvolvimento e futura aplicabilidade na prática clínica. A maioria dos estudos não avaliou correlação das CTCs com os desfechos clínicos sendo que, a maioria daqueles que avaliaram, chegaram a resultados negativos.

Tabela 1 - Revisão dos estudos avaliando CTCs em câncer de cabeça e pescoço localmente avançado

Autor	n	Técnica	Taxa de detecção	Follow-up	Impacto na Resposta	Impacto em SG	Impacto em SLP
Balasubramanian et al. 2009	32	Imunomagnética CK + RT-PCR EGFR	20/32 (63%)	NR	NA	NA	NA
Bozec et al. 2013	48	<i>Cellsearch</i> [®]	8/49 (16%)	NR	NA	NA	NA
Buglione et al. 2012	73	<i>Cellsearch</i> [®]	11/73 (15%)	13,6m	Sim p=0,017	Não p=ns	Sim p=0,009
Dyavanagoudar et al. 2008	25	RT-PCR CK19	4/25 (16%)	NR	NA	NA	NA
Gröbe et al. 2014	80	<i>Cellsearch</i> [®]	10/80 (12,5%)	30,1m	NA	Não p=0,69	Sim p<0,001
Guney et al. 2007	21	Imunomagnética anti-epitelial	7/21 (33,3%)	36m	NA	NA	NA
He et al. 2013	9	<i>Cellsearch</i> [®]	3/9 (33%)	14m	NA	NA	Não p=0,15
Hristozova et al. 2011	42	Citometria fluxo (CD45-, CK+) + RT PCR EGFR	18/42 (43%)	NR	NA	NA	NA
Hsieh et al. 2015	53	ICC EpCAM	10/53 (19%)	10,5m	NA	NR	NA
Inhestern et al. 2014	40	Citometria fluxo (CD45-, EpCAM+)	32/40 (80%)	24,7m	NA	Sim p=0,049	Sim p=0,025
Jatana et al. 2010	48	Imunomagnética CK+	34/48 (70%)	19m	NA	NA	Sim p=0,01
Kawada et al. 2017	32	<i>CellSieve</i> (tamanho, EpCAM/CK+, CD45-)	29/32 (90,6%)	NR	NA	NA	NA
Kulasinghe et al. 2018	23	<i>ClearCell FX</i> (tamanho, deformabilidade, pCK+, CD45-)	11/23 (47,8%)	NR	NA	NA	Sim p=0,0063

Cont/ Tabela 1

Autor	n	Técnica	Taxa de detecção	Follow-up	Impacto na Resposta	Impacto em SG	Impacto em SLP
Nichols et al. 2011	15	<i>Cellsearch</i> [®]	6/15 (40%)	NR	NA	NA	Não p=0,11
Pajonk et al. 2001	77	RT-PCR mRNA CK19	5/77 (6,5%)	NR	NA	NA	NA
Partridge et al. 2003	36	ICC (panCK) RT-PCR (E48)	3/36 (8,3%)	36m	NA	NA	Sim p<0,001
Tinhofer et al. 2012	31	Citometria fluxo (EpCAM, EGFR+, CD45-)	9/31 (29%)	NR	NA	NA	NA
Tinhofer et al. 2014	144	Citometria fluxo (EpCAM, EGFR+, CD45-)	42/144 (29%)	34m	NA	Não	Não
Toyoshima et al. 2009	40	RT-PCR CK mRNA	15/40 (37,5%)	43,5m	NA	Não	Sim p=0,01
Yang et al. 2009	26	Imunomagnética Citometria fluxo	20/26 (77%)	NR	NA	NA	NA
Winter et al. 2009	16	Imunomagnética + RT-PCR	7/16 (44%)	NR	NA	NA	NA
Wirtschafter et al. 2002	18	ICC EpCAM	8/18 (44%)	NR	NA	NA	NA
Zhang et al. 2017a	22	<i>CellCollector</i> (EpCAM+, panCK+, CD45)	16/22 (72,7%)	NR	NA	NA	NA

NR: não reportado; NA: não avaliado; ns: não significativo;

O que se observa nos estudos de CTCs citados acima são número de pacientes em geral pequenos, baixas taxas de detecção e uso de técnicas dependentes de marcação de citoqueratinas, que são sujeitas a alguns vieses. Por exemplo, o *Cell Search System*[®] depende de captura imunomagnética de CTCs positivas para EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*), o que pode ignorar CTCs que não mais expressam citoqueratinas por terem passado pelo processo de EMT, viés este a qual estão sujeitas todas as técnicas dependentes destes marcadores. Ainda, estas técnicas muitas vezes não permitem o isolamento da CTC com integridade e função celular

preservada, o que possibilitaria a caracterização fenotípica e genotípica destas células, bem como mudanças dinâmicas ao longo do tratamento e progressão da doença. Por fim, não fica bem estabelecido o papel prognóstico da presença e, menos ainda, do valor absoluto de CTCs neste contexto e praticamente nenhum estudo avaliou o potencial papel preditor de resposta das CTCs.

Nesta patologia, como já discutido, existem diversos cenários, com implicações prognósticas e possibilidades terapêuticas diferentes. Observa-se que pacientes com o mesmo diagnóstico e frequentemente com o mesmo estadiamento, recebem, nos diversos centros de tratamento e pesquisa do câncer de cabeça e pescoço, proposta de variados regimes de tratamento, sendo frequente o uso de modalidades (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) bastante diversos de acordo com dados de literatura médica e prática preferencial de cada centro. A pesquisa de CTCs poderia contribuir para um melhor entendimento destes diferentes cenários e pacientes, e num futuro próximo, ser ferramenta importante para personalização do tratamento e melhoria dos desfechos.

1.4 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES E GENES DE RESISTÊNCIA A DROGAS EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

A principal causa de morte por câncer é indubitavelmente o aparecimento de metástases e o valor prognóstico das CTCs em diferentes malignidades epiteliais sugere que estas sejam importantes na progressão tumoral e metástase. Nesse contexto existe o potencial uso terapêutico de informações advindas da detecção de CTCs no decurso do tratamento e a possibilidade de mudança precoce na estratégia terapêutica em pacientes cujos achados sugerissem resistência ao tratamento vigente (GAZZANIGA et al. 2010). Contudo, algumas questões permanecem não resolvidas, principalmente referentes ao tipo de terapia que poderia ser adotada quando os níveis de CTCs aumentassem durante o tratamento. Dentre as possibilidades, a troca para um regime quimioterápico diferente ou a adição de novos agentes (GAZZANIGA et al. 2008) ou mesmo a indicação de abordagem cirúrgica para paciente que se julgasse resistente a terapia clínica inicial. Assim, discute-se o potencial uso da detecção das CTCs na individualização das decisões terapêuticas.

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 ERCC1 (*Excision Repair Cross-Complementation Group 1*) e BRCA1 (*BReast CAncer 1*). Alguns estudos têm mostrado uma melhor resposta para pacientes com baixos níveis de ERCC1 medidos por RT-PCR ou IHQ, 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; JUN et al. 2008; CHIU et al. 2011; BAUMAN et al. 2013). Resultado semelhante foi observado no estudo realizado por OLAUSSEN et al. (2006), que mostrou em análise retrospectiva de 761 amostras, que pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), tratados com quimioterapia baseada em cisplatina de maneira adjuvante à cirurgia, e cujos tumores expressavam baixos níveis de ERCC1 (analisados por imunoistoquímica) apresentaram melhor SG (HR=0.65; IC95%: 0.50-0.86; p=0.002), enquanto que pacientes com alta expressão de ERCC1 não derivavam qualquer benefício da quimioterapia adjuvante (HR=1,14; IC95%: 0.84-1.55; p=0.40). Além de preditiva, a expressão de ERCC1 foi prognóstica, pois nos pacientes que não receberam quimioterapia adjuvante a SG foi maior nos alto expressores (HR=0.66; IC95%: 0.49-0.90; p=0.009).

KANG et al. (2010) avaliaram o padrão de expressão de ERCC1, BRCA1, XRCC1 (*X-ray Repair Cross-Complementation Group 1*) e β -tubulina III (BT-3) por imunoistoquímica em espécimes cirúrgicos de 82 pacientes com CPNPC que fizeram tratamento neoadjuvante com quimioterápicos baseados em platina e taxanos. Os níveis de ERCC1, BRCA1, XRCC1 aumentaram proporcionalmente aos níveis de morte celular (p<0.05), já os de BT-3 não se correlacionaram com a viabilidade celular. Pela análise multivariada, estágio patológico inicial, quimioterapia adjuvante, altos níveis de expressão de ERCC1 e baixos de BT-3 foram fatores prognósticos para SG (p< 0.05).

HAYES et al. (2011) avaliaram de forma retrospectiva a expressão de ERCC1 por imunoistoquímica em tecidos de 73 pacientes com CECP que receberam quimioterapia com cisplatina e radioterapia concomitantemente, afim de avaliar se a expressão de ERCC1 seria capaz de predizer resposta ao tratamento combinado e sobrevida. Os resultados da expressão de ERCC1 foram dados em porcentagem.

Foram encontrados 50% de expressão de ERCC1 em 14% das amostras, de 50 a 75% de ERCC1 em 42% e acima de 75% de expressão desta proteína em 44% dos casos. A expressão elevada de ERCC1 (acima de 75%) não foi preditora significativa de sobrevida ou de resposta ao tratamento. A mediana de SG nos pacientes com alta expressão de ERCC1 foi de 2,9 anos *versus* 2,1 naqueles com expressão menor do que 75% das células analisadas ($p=0,44$).

Segundo revisado por LANGER (2012) e XUELEI et al (2015), de uma perspectiva prática, parece que a alta expressão de ERCC1 em amostras de tecidos de pacientes com CECp sugere uma baixa probabilidade de benefício com terapia à base de platina. Pacientes com expressão deste marcador devem ser candidatos a terapias alternativas, que não incluam platina. Contudo, uma validação com ensaios prospectivos faz-se necessária.

O mecanismo de ação dos taxanos envolve ligação destes aos polímeros de β -tubulina e inibição da depolimerização dos microtúbulos e progressão mitótica. Em modelos pré-clínicos, a expressão de níveis aberrantes da isoforma III de β -tubulina tem sido associada a resistência a paclitaxel em muitos tipos celulares (LANGER 2012). O papel da BT-3 tem sido muito investigado em CPNPC e tem sido demonstrada ligação à resistência a taxanos e como fator prognóstico em CPCNP e em câncer de ovário (YANG et al. 2014).

KOH et al. (2009) realizaram um estudo para verificar o significado de BT-3, p53 e ERCC1 em pacientes com CECp localmente avançado recebendo quimioterapia de indução. O regime de quimioterapia consistia em PF ($n=55$) ou TPF ($n=30$). O objetivo era identificar o papel de BT-3 e ERCC1 como marcadores prognósticos e preditivos em comparação com p53, um marcador já estabelecido. Foi feita uma análise retrospectiva por meio de imunoistoquímica. Os pacientes com expressão de BT-3 mostraram menores níveis de resposta ao tratamento do que aqueles sem expressão desta proteína (69% x 88%; $p=0,039$). O mesmo foi observado em relação à SLP mediana (12 x 47 meses; $p=0,001$). Foi observada menor SG mediana nos pacientes com expressão de BT-3 (30 x 59 meses; $p=0,072$), porém, sem significância estatística. O status de BT-3 influenciou a sobrevida câncer-específica (35 meses *versus* mediana não alcançada; $p=0,017$), assim como p53, que também se relacionou com pior SG. Já ERCC1 não mostrou qualquer

influência na resposta à quimioterapia, SLP, SG ou sobrevida câncer-específica nesta população estudada. Outros trabalhos sugerem portencia papel preditor de resposta de putras isoformas da β -tubulina, com a β -tubulina II (CULLEN et al. 2009).

Outra proteína associada a resistência a taxanos é a MRP-7 (*multidrug resistance associated protein 7*), com dados *in vitro* sugerindo que culturas de linhagens de células tumorais contendo a expressão desta proteína, apresentam resistência a taxanos como paclitaxel e docetaxel (HOPPER-BORGE et al. 2004). Analisando linhagens de células de CPNPC (OGURI et al. 2008) e de CECP (NARAMOTO et al. 2008), o mesmo pode ser observado, com a presença da expressão desta proteína conferindo resistência a taxanos. Numa análise de expressão *in vivo* da família de proteínas MRP, TSUZUKI et al. (1998) reportaram a presença desta expressão em 34% das amostras tumorais de 115 pacientes portadores de CECP, e não houve correlação com resistência a platina ou 5-fluorouracil, sendo que taxanos não foram testados neste trabalho. Outras proteínas transportadoras de membrana da mesma família, como a MRP-2, também podem ser importantes mecanismos de resistência a drogas, e foram pouco estudadas no cenário de câncer de cabeça e pescoço avançado (WARTA et al. 2014).

O EGFR é expresso em cerca de 80 a 100% dos tumores de cabeça e pescoço. A regulação positiva deste gene parece ser um marcador precoce de CECP (CHRISTENSEN et al. 1992; GRANDIS e TWEARDY 1993 GRANDIS et al. 1996) e o alto nível de expressão tumoral tem sido correlacionado com mau prognóstico (NICHOLSON et al. 2001; ADJEI et al. 2003). O aumento no número de cópias do EGFR é um evento somático característico que ocorre no desenvolvimento do CECP e pode, adicionalmente, ser um indicador de mau prognóstico (CHUNG et al. 2006; TEMAM et al. 2007). Desta forma, o bloqueio de EGFR tem se tornado alvo terapêutico importante em muitos tumores malignos (HEUN e HOLEN 2007), como com o uso de cetuximabe em CECP (BONNER et al. 2006; CHUNG et al. 2008; GEORGE et al. 2010).

Os mecanismos associados à sensibilidade e resistência a terapias anti-EGFR foram analisados e os estudos são contraditórios com relação ao impacto do perfil do número de cópias do gene EGFR sobre a eficácia do cetuximabe em câncer colorretal metastático (CCRm) e CPNPC. Enquanto alguns deles demonstraram associação

entre o alto número de cópias do gene EGFR e um melhor desfecho em pacientes com CCRm e CPNPC tratados com cetuximabe (LIEVRE et al. 2006; FRATTINI et al. 2007; CAPPUZZO et al. 2008; HIRSCH et al. 2008; PERSONENI et al. 2008), outros por sua vez, falharam em identificar associações similares (O'BYRNEY et al. 2009; KHAMBATA-FORD et al. 2010). Em relação ao CECP, ainda não há estudos que demonstrem associação entre o número de cópias do gene EFGR e eficácia do cetuximabe (LICITRA et al. 2011).

Outras alterações estudadas como preditores de resposta foram a presença de mutações do gene EGFR (ROSELL et al. 2009), que são incomuns em CECP, ou de mutações do domínio extracelular, como a variante III (vIIIIEGFR), observada em pacientes com glioblastoma multiforme mas com resultados inconclusivos em pacientes com CECP (SOK et al. 2006; FUKAI et al. 2008; HAMA et al. 2009; SUZUKI et al. 2010). Já para a expressão imunoistoquímica do EGFR, resultados sugerem que a alta expressão seja um fator preditivo para eficácia de Cetuximabe em CPNPC (PIRKER et al. 2012; THATCHER et al. 2015), embora não haja dados semelhantes em CECP (LICITRA et al. 2013).

A possibilidade de isolamento de CTCs íntegras sem a dependência de marcação epitelial de citoqueratinas permite a análise de marcadores de EMT, que é um processo diretamente envolvido na metastatização, sendo potencial fator prognóstico de risco de recidiva e mesmo preditor de eficácia do tratamento convencional ou possível alvo para terapias.

A via do TGF- β (*transforming growth factor β*) é uma das mais estudadas na sinalização da EMT e é reguladora importante da proliferação epitelial, função imune e angiogênese (ELLIOTT e BLOBE 2005; WHITE et al. 2010). Está envolvida no processo de carcinogênese dos carcinomas epidermóides (BENNETT et al. 2009) e de metastatização dos carcinomas de cabeça e pescoço (CHEN et al. 2001; DU et al. 2016). Estudos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço demonstram o potencial do TGF- β como preditor de resistência a radioterapia (AGOSTINI et al. 2017; POLAT et al. 2017) e preditor de resistência quimioterapia em linhagens de carcinomas epidermóides (OSHIMORI et al. 2015; BROWN et al. 2017). TGF- β possui três receptores, tipos I, II e III, e as sinalizações dependentes do receptor tipo I do TGF- β são críticas no processo de crescimento e diferenciação celular e

geralmente estão alteradas no processo de tumorigênese (WRANA et al. 1994). Além disso estudos demonstram que alterações destes receptores, como perda de função, mutações e polimorfismos são encontrados em câncer de cabeça e pescoço e podem estar envolvidos no processo de metastatização (KNOBLOCH et al. 2001; LU et al. 2016), o que torna esta via de particular interesse nos pacientes com CECp localmente avançados.

A MMP2 (*matrix metalloproteinase 2*) faz parte de uma família de proteínas chamadas gelatinases, que são capazes de quebrar a matriz extracelular (RYDLOVA et al. 2008). A degradação da matriz extracelular é um evento chave no processo de progressão, invasão e metastatização dos carcinomas de cabeça e pescoço (CHAUDHARY et al. 2010). Existem dados sugerindo que, nestes tumores, a expressão de MMP-2 pode se correlacionar com histologia pouco diferenciada, estágio T e metástase linfonodal cervical (BURDUK et al. 2014; LIU et al. 2015; LOTFI et al. 2015). Consequentemente, a expressão de MMP2 em CECp sugere um impacto prognóstico, além do potencial como alvo terapêutico neste cenário (ROSENTHAL e MATRISIAN 2006; CHIEN et al. 2013). Por fim a MMP2 também pode ser regulada pela TGF- β , e a interação entre ambos pode dar início à cascata de eventos relacionados à proliferação, sobrevivência celular e invasão neoplásica (MICALIZZI et al. 2010).

Como pode-se observar, há estudos mostrando correlação entre expressão de genes de resistência e sensibilidade às drogas e resposta à terapia, mas raríssimos mostram essa expressão nas CTCs, o que possibilitaria uma tentativa de personalização do tratamento inicial, bem como uma monitorização ao longo do tratamento, como uma técnica pouco invasiva. Além disso, outros potenciais marcadores de resistência a quimioterapia foram pouco estudados em câncer de cabeça e pescoço, como o MRP-7 ou MRP-2. Ainda mais no cenário de tratamento de CECp localmente avançado, no qual são opções terapia com platina, taxanos ou o anticorpo monoclonal anti-EGFR (cetuximabe), em diferentes combinações e sequências. Desta forma, a análise de expressão de proteínas relacionadas a potencial resistência a estas drogas, particularmente em CTCs (biópsia líquida), pode ser de fundamental importância para escolha de modalidade terapêutica.

Outro cenário que não foi explorado é a expressão de marcadores de EMT em CTCs, estratégia esta que se torna extremamente atraente ao se utilizar uma técnica que isola as células íntegras e independente da marcação de citoqueratinas, podendo servir como marcador prognóstico ou mesmo como potenciais alvos terapêuticos.

1.5 ISET E DETECÇÃO DE CTCs

Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells (ISET) constitui um método direto de enriquecimento das células epiteliais por filtração. 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 . A simplicidade do método evita a perda de células raras em múltiplos passos de isolamento. Após isoladas, as CTCs podem ser avaliadas por Giemsa, hematoxilina-eosina, ou caracterizadas por imunocitoquímica (ICC), FISH (*fluorescence in situ hybridization*), TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) ou microdissecadas para análise molecular (PATERLINI-BRECHOT e BENALI 2007).

MENG et al. (2004) relataram que o diâmetro das CTCs de pacientes com câncer de mama variou de 29,8 a 34,9 μm . As células foram isoladas pelo ISET, que conservou a morfologia das células, tornando fácil sua distinção das células não-tumorais por exame citopatológico.

FARACE et al. (2011) enumeraram CTCs em 60 pacientes com carcinomas metastáticos de mama, próstata e pulmão, usando *CellSearch System*[®] e ISET. Resultados concordantes foram obtidos em 55% das pacientes com câncer de mama (11 de 20), em 60% (12 de 20) dos pacientes com câncer de próstata e em 20% (4 de 20) dos pacientes com câncer de pulmão. Os resultados discrepantes foram explicados pelos autores pela limitação que o *CellSearch System*[®] tem de detectar as CTCs apenas pela marcação com EpCAM.

As principais vantagens do ISET sobre outras técnicas estudadas são a não dependência de marcação de citoqueratinas para identificação das células tumorais, o que possibilita que CTCs em processo de EMT e também sem essa marcação sejam

identificadas, além da possibilidade de caracterização morfológica, fenotípica e genotípica das CTCs, visto ser possível o isolamento com a integridade celular preservada.

1.6 JUSTIFICATIVA

Apesar dos relatos na literatura sobre identificação de CTCs e sua correlação com prognóstico em alguns tumores, o seu papel na prática clínica ainda está por ser determinado. Especialmente em CECP, o impacto prognóstico de CTCs antes do início do tratamento não está estabelecido até o momento. Existe grande interesse no desenvolvimento de estudos prospectivos que analisem as implicações prognósticas, correlação com estadiamento clínico e individualização terapêutica que possam ser determinados pela detecção, análise quantitativa e qualitativa de CTCs nas diversas etapas do tratamento oncológico em CECP.

A disponibilidade de uma nova ferramenta como a biopsia líquida ganha potencial de uso na prática quando discutimos o tratamento de CECP, pois trata-se de entidade de apresentação e abordagem terapêutica diversa, quando consideramos o tratamento efetuado nas diversas instituições brasileiras e internacionais. No tratamento multidisciplinar de CECP localmente avançado, várias estratégias são aceitas (cirurgia seguida de radioterapia ou quimiorradioterapia; quimioterapia de indução seguida de quimiorradioterapia ou biorradioterapia; quimiorradioterapia ou biorradioterapia como tratamento isolado) sendo, portanto, de grande valia a disponibilidade de instrumentos que possibilitem avaliar individualmente pacientes no decurso dos tratamentos propostos.

Especialmente para pacientes com doença locorregional avançada, o uso das CTCs traz interesse, não somente como fator prognóstico de resposta ao tratamento e desfecho clínico, mas como potencial fator preditor de resposta às diversas modalidades de tratamento que podem ser empregadas. Por meio da pesquisa e isolamento de CTCs poderemos identificar potenciais marcadores nas células ou correlacionar sua própria dinâmica com desfechos de cada tratamento. Por exemplo, pacientes com doença localmente avançada e CTCs em altos níveis talvez sejam melhores candidatos à realização de estratégias com quimioterapia de indução, para

eliminação de doença micrometastática; por outro lado, pacientes com ausência de CTCs ou baixos níveis poderiam ser poupados de tratamento sistêmico muito intenso, priorizando-se a estratégia em controle local com radioterapia concomitante a cisplatina ou cetuximabe.

Outro aspecto promissor do isolamento de CTCs é a possibilidade de análise de expressão de genes de resistência/sensibilidade aos tratamentos sistêmicos empregados como platina (ERCC1), cetuximabe (EGFR) e taxanos (β -tubulina III, MRP-2, MRP-7). Caso estes marcadores se mostrem bons preditores de resposta a estes tratamentos, poderemos direcionar as estratégias aos pacientes. E uma vez que a técnica do ISET não depende de marcação de citoqueratinas, traz a possibilidade de avaliação da expressão de biomarcadores de EMT (MMP2 e TGF β RI), avaliando seu papel prognóstico, preditivo ou mesmo como potencial alvo terapêutico.

Por fim, a análise de CTCs ao término do tratamento local (radioterapia) pode determinar pacientes com presença de doença residual mínima e com maiores riscos de recidiva, podendo servir, no futuro, como um indicador de necessidade de terapia sistêmica complementar, estratégia esta não comprovada como eficaz até o momento em câncer de cabeça e pescoço localmente avançado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a taxa de detecção de CTCs em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço localmente avançado antes e após o tratamento, correlacionando sua análise quantitativa com desfechos clínicos como sobrevida global, sobrevida livre de progressão e taxa de resposta ao tratamento.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 Avaliar se a presença de microêmbolos circulantes antes e após o tratamento correlaciona-se com desfechos clínicos
- 2 Avaliar se a variação dos níveis de CTCs durante o tratamento (cinética) correlaciona-se com desfechos clínicos.
- 3 Avaliar se a análise quantitativa de CTCs antes do tratamento pode ser fator preditivo de desfechos clínicos de acordo com a estratégia de tratamento empregada.
- 4 Avaliar a correlação entre a expressão de genes de resistência a drogas (ERCC1, β -tubulina III, EGFR, MRP-2 e MRP-7) e marcadores de transição epitélio mesenquima (TGF β RI e MMP-2) nas CTCs e desfechos clínicos.
- 5 Avaliar a correlação entre a expressão de genes de resistência a drogas (ERCC1, β -tubulina III, EGFR, MRP-2 e MRP-7) e marcadores de transição epitélio mesenquima (TGF β RI e MMP-2) nas CTCs e resposta as diferentes estratégias de tratamento empregadas.
- 6 Avaliar a correlação entre a expressão de genes de resistência a drogas (ERCC1, β -tubulina III, EGFR, MRP-2 e MRP-7) e marcadores de transição epitélio mesenquima (TGF β RI e MMP-2) nos microêmbolos e desfechos clínicos.

3 MATERIAL E MÉTODO

Estudo prospectivo, unicêntrico, não randomizado, com coleta de sangue total de pacientes com câncer de cabeça e pescoço localmente avançado, EC III e IV, não metastáticos, candidatos a tratamento cirúrgico ou não cirúrgico inicial, com intuito curativo, e que teve como controle negativo, sangue de indivíduos sadios e como controle positivo, este mesmo sangue *spiked* com células tumorais de faringe mantidas em cultura. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do AC Camargo Cancer Center sob o número 1777/13 em 08 de novembro de 2013 e financiado por verba FAPESP processo 2013/08125-7.

Pacientes foram convidados a participar do estudo, com esclarecimento de riscos e potenciais benefícios. Todos os pacientes tiveram suas dúvidas esclarecidas e expressaram sua intenção voluntária de participar do estudo após lerem e assinarem o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – apêndice 1). Estão contidas no TCLE questões ligadas a voluntariedade, manutenção do direito ao sigilo médico e possibilidade de retirada do consentimento a qualquer momento como medida unilateral, sem ônus para o paciente.

3.1 CRITÉRIOS GERAIS DE INCLUSÃO

Foram incluídos nesse estudo pacientes que preenchiam os seguintes critérios:

- 1 Idade igual ou superior a 18 anos;
- 2 Diagnóstico histológico confirmado de carcinoma epidermóide;
- 3 Sítio primário em cavidade oral, orofaringe, laringe, hipofaringe ou cervical de sítio primário oculto;
- 4 Pacientes portadores de doença localmente avançada (estágios clínicos III, IVA e IVB pela AJCC 7ª edição), não metastática;
- 5 Tratamento com intenção curativa;
- 6 Tratamento não cirúrgico definitivo inicial (preservação de órgão ou doença irresssecável) ou tratamento cirúrgico inicial com indicação de quimiorradioterapia adjuvante, contemplando uma das seguintes estratégias:

- a. Radioterapia combinada a quimioterapia (quimiorradioterapia) definitiva;
 - b. Radioterapia combinada a terapia alvo (biorradioterapia) definitiva;
 - c. Quimioterapia de indução seguida de quimiorradioterapia ou biorradioterapia definitiva;
 - d. Radioterapia combinada a quimioterapia (quimiorradioterapia) adjuvante à cirurgia.
- 7 Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.2 CRITÉRIOS GERAIS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos desse estudo pacientes que apresentarem as seguintes características:

- 1 Pacientes que tiverem realizado cirurgia ou procedimento cirúrgico nos últimos três dias;
- 2 Pacientes com história prévia de outra neoplasia em atividade nos últimos 5 anos.

3.3 PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Todos os participantes tiveram 8 mL de sangue coletados na primeira visita e a cada visita programada, conforme previsto no desenho do estudo.

A identificação dos pacientes foi feita por códigos para preservar sua confidencialidade.

A coleta foi realizada em diferentes momentos de acordo com o cenário de tratamento do paciente:

- 1 Pacientes portadores de doença localmente avançada não metastática com indicação de tratamento não cirúrgico com intuito curativo (preservação de órgão ou doença irresssecável):
 - a. Candidatos a quimiorradioterapia ou biorradioterapia como terapia inicial: a coleta foi realizada até 4 semanas antes do início do tratamento radioterápico e até 6 semanas após seu término;

- b. Candidatos a quimioterapia de indução seguida de quimiorradioterapia ou biorradioterapia: a coleta foi realizada até 4 semanas antes do início da quimioterapia de indução e até 6 semanas após o término da radioterapia.
- 2 Pacientes portadores de doença localmente avançada não metastática candidatos a tratamento cirúrgico inicial com intuito curativo e com indicação de tratamento adjuvante com quimiorradioterapia: a coleta foi realizada até 4 semanas antes do início da radioterapia (pelo menos duas semanas após a cirurgia) e até 6 semanas após o término da radioterapia.

3.4 AMOSTRAS DE SANGUE

3.4.1 Isolamento, purificação, contagem, caracterização e imunocitoquímica de CTCs

Para contagem e caracterização das CTCs, utilizamos o sistema ISET (*Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells*). As amostras de sangue periférico do paciente foram coletadas em tubos com EDTA e diluídas com ISET *Buffer*TM (*RareCells Diagnostics*, Paris, França) 1:10. Após 10 minutos de incubação as amostras foram transferidas para o bloco (*ISET Block*TM), contendo a membrana de polycarbonato com *spots* cilíndricos de 8 µm de diâmetro. A amostra de sangue foi então filtrada por aspiração sob vácuo e, em seguida, a membrana lavada com PBS, retirada do *ISET Block*TM e, quando seca, armazenada a -20 °C.

Para confirmar a existência de células nos *spots* e avaliá-las, foi feita imunocitoquímica com os marcadores desejados, em todos os *spots* de todas as coletas.

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) (DakoTM) e aquecido em banho-maria em microondas por três vezes de aproximadamente dois minutos cada, até a água do banho-maria atingir fervura. Após o terceiro aquecimento, a placa ficou em temperatura ambiente (20 minutos). Cada *spot* foi hidratado com 160µl de TBS (20 minutos). As células foram então permeabilizadas com 160µl de TBS 0,2%

Triton X-100 por 5 min à temperatura ambiente. Após uma nova lavagem com TBS, as membranas foram incubadas por 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, com uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio, e lavadas novamente com TBS. Em seguida o anticorpo escolhido foi aplicado aos *spots* e incubado por duas horas (ver tabela 2 com a descrição dos anticorpos). Para o controle negativo, o anticorpo primário foi omitido. Como controle positivo, células sabidamente positivas para as proteínas testadas foram mantidas em cultura e filtradas na membrana ISET e depois submetidas à reação de imunocitoquímica.

Tabela 2 - Descrição detalhada dos anticorpos testados nas CTCs

Anticorpo	Diluição	Clone	Código	Fabricante	Linhagem para Controle positivo CTC
TGFβRI	1/100	Policlonal	CSB-PA061850	Cusabio	A549
CD45	1/100	Policlonal	CSB-PA010546	Cusabio	Leucócitos
ERCC1	1/100	Policlonal	CSB-PA007769GA01HU	Cusabio	A549
MRP2	1/50	Policlonal	CSB-PA073204	Cusabio	MCF7
MMP2	1/100	Policlonal	CSB-PA014666GA01HU	Cusabio	PC3
MRP7 (ABCC10)	1/50	Policlonal	CSB-PA073204	Cusabio	MCF7
EGFR	1/200	Policlonal	CSB-PA007479GA01HU	Cusabio	FaDu
β-Tubulina III	1/100	Policlonal	CSB-PA03874A0Rb	Cusabio	LN18

Após incubação com anticorpo, os *spots* foram lavados novamente com TBS, incubados por 30 minutos em *Dual Long System* HRP (DakoTM) e revelados pelo cromógeno DAB (DakoTM) (5 min). Para leitura, os *spots* foram corados com hematoxilina por um minuto e aderidos às lâminas com meio de montagem aquoso.

Para a realização da dupla marcação imunocitoquímica, o mesmo protocolo descrito acima foi realizado. No entanto, após a utilização do DAB, realizamos uma incubação de uma hora com o segundo anticorpo primário, seguida por outra incubação de 20 minutos com o *Rabbit/Mouse* (LINK) (*Kit EnvisionTM G/2*

System/AP). Após lavagem com TBS, o *spot* foi incubado por 30 minutos com *AP Enzyme* (Enhancer). O segundo anticorpo foi revelado por *Permanent Red*.

As lâminas foram examinadas no microscópio de luz branca, BX61 – Olympus, (Tóquio, Japão) acoplado a câmera digital de alta resolução SC100 – Olympus, (Tóquio, Japão). As CTCs foram caracterizadas de acordo com os seguintes critérios, publicados por KREBS et al. (2012): tamanho nuclear igual ou maior que 16µm, irregularidade do contorno nuclear, presença de citoplasma visível, alta proporção núcleo-citoplasma ($>0,8$). A estes critérios, acrescentamos também a negatividade para expressão de CD45 (marcador leucocitário).

Quando faltavam qualquer dos critérios descritos, as células eram classificadas como atípicas. Os resultados foram dados 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.

Analizamos também, os pacientes com presença e ausência de microêmbolos tumorais circulantes (ME), classificados como grupos de CTCs contendo três ou mais células (KREBS et al. 2012).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis quantitativas foram consideradas as medidas resumo de posição e dispersão, como média, mediana, desvio padrão e valores mínimo e máximo. Já para as variáveis qualitativas, as frequências absoluta e relativa (%) são apresentadas.

Para avaliar uma possível associação entre duas variáveis qualitativas, foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher, quando apropriado. Para a comparação de dois grupos ou mais em relação as variáveis quantitativas, foi considerado o teste paramétrico t de Student ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney (dois grupos independentes) ou o teste de Kruskal-Wallis (3 ou mais grupos independentes) seguido de uma comparação múltipla com correção de Bonferroni, a depender da distribuição da variável quantitativa de interesse e do número de pacientes em cada grupo.

As funções de sobrevida global e livre de progressão foram estimadas por meio do estimador de Kaplan-Meier, bem como a comparação entre as curvas pelo teste log-rank. Com o objetivo de determinar um ponto de corte para a contagem de CTCs/ml em relação aos desfechos de sobrevida global e livre de progressão, a técnica proposta por LAUSEN e SCHUMACHER (1992) foi aplicada. Essa proposta visa obter o "melhor" valor de ponto de corte (*cut-off*) com o objetivo de “discriminar” as curvas de sobrevivência. A estimativa do *cut-off* é obtida por meio da maximização da estatística log-rank padronizada. Além disso, o modelo de riscos proporcionais de COX (1972) foi ajustado aos dados para descrever a relação entre as variáveis independentes e o tempo até o óbito/recidiva. Todas as variáveis com valor de p inferior a 0,10 no modelo de Cox simples foram consideradas no modelo de Cox múltiplo, sendo que outras variáveis poderiam ser incluídas de acordo com a relevância clínica. As variáveis do modelo de regressão de Cox múltiplo foram selecionadas a partir do método de *stepwise backward* com p de entrada de 0,10, obtendo assim o modelo final. Em todos os modelos foi avaliada a suposição de proporcionalidade por meio dos resíduos de SCHOENFELD e RICHTER (1982), GRAMBSCH e THERNEAU (1994). Em todos os casos temos evidências de que o efeito das covariáveis são constantes ao longo do tempo, justificando assim o uso do modelo de Cox.

A sobrevida global (SG) foi calculada da data do diagnóstico até o óbito. A sobrevida livre de progressão (SLP) foi calculada da data do diagnóstico até progressão ou recidiva de doença. A resposta ao tratamento foi avaliada de acordo com os critérios de RECIST 1.1 (EINSENHAUER et al. 2009), sendo as imagens realizadas 8 semanas após o término da radioterapia.

Um ponto de corte para a contagem de CTCs/mL e a resposta completa ao tratamento foi obtido por meio da curva ROC, em que o ponto foi escolhido com base em uma otimização de especificidade e sensibilidade.

Em todos os testes de hipóteses o nível de significância foi fixado em 5%. Assim, resultados cujos valores p foram menores que 0,05 foram considerados como significativos. A análise dos dados foi realizada por meio do software IBM SPSS versão 24 e no software R, versão 3.5 (R Core Team 2018).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Foram incluídos 83 pacientes entre janeiro de 2014 e novembro de 2017, com idade média de 60 anos (25-83), maioria homens (69/83; 83%) e com sítio primário em orofaringe (42/83; 50,6%). Dos 42 pacientes portadores de tumores de orofaringe, a pesquisa de p16 foi realizada em 25 pacientes (maioria p16 positiva; 22/25), sendo o *status* de p16 desconhecido no restante dos pacientes. História de tabagismo, considerada como carga tabágica maior ou igual a 10 anos/maço, estava presente em cerca de 70% dos pacientes. A maioria dos pacientes apresentava doença bastante avançada com tumores T3 e T4 em cerca de 70% e acometimento linfonodal $\geq$ N2b em 67,5% dos pacientes (utilizando estadiamento de acordo com a 7ª edição do AJCC – *American Joint Committee on Cancer*).

Em relação a estratégia de tratamento, 80% dos pacientes foram tratados de maneira não cirúrgica (67/83), sendo a quimioterapia de indução utilizada em quase metade (33/67) e estratégias de radioterapia *upfront* concomitante a cisplatina ou cetuximabe na metade restante dos pacientes (19 pacientes receberam cisplatina e 15 cetuximabe). Cerca de 20% da amostra (n=16) foi composta de pacientes tratados com cirurgia inicial, sendo que todos estes receberam radioterapia concomitante a cisplatina como tratamento adjuvante. As características demográficas dos pacientes podem ser visualizadas na tabela 3.

Tabela 3 - Características demográficas da população do estudo.

Característica		n	%
Idade			
	Mediana	60	-
	Variação	25-83	-
Gênero			
	Masculino	69	83
	Feminino	14	17
Sítio Primário			
	Orofaringe	42	50,6
	Cavidade Oral	14	16,9
	Laringe	13	15,7
	Hipofaringe	10	12
	Primário Oculto	4	4,8
p16 (apenas orofaringe)		42	
	Positivo	22	52,3
	Negativo	3	7,1
	Desconhecido	17	40,4
Tabagismo			
	< 10 anos/maço	25	30,1
	≥ 10 anos/maço	58	69,9
T			
	T0	8	9,6
	T1	4	4,8
	T2	13	15,7
	T3	25	30,1
	T4	33	39,7
N			
	N0	15	18,1
	N1	8	9,6
	N2a	4	4,8
	N2b	20	24,1
	N2c	19	22,9
	N3	17	20,5
AJCC			
	III	16	19,3
	IVA	46	55,4
	IVB	21	25,3
Tratamento definitivo		67	80,7
	Quimioterapia de indução	33	49,2
	Radioterapia + cisplatina	19	28,3
	Radioterapia + cetuximabe	15	22,3
Tratamento adjuvante		16	19,3
	Radioterapia + Cisplatina	16	100

4.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E IMPACTO EM SOBREVIDA

Em relação às características demográficas e sobrevida, os tumores primários de orofaringe apresentaram melhor sobrevida global (SG) em relação aos sítios primários não-orofaringe ($p=0,021$), assim como *status* p16 positivo *versus* negativo ou desconhecido ($p=0,007$), porém não houve diferença estatística entre estas características e sobrevida livre progressão (SLP), apesar da diferença numérica em SLP em dois anos ($p=0,058$ e $p=0,327$ respectivamente). Idade maior ou igual a 70 anos e histórico de tabagismo se correlacionaram com pior SG ($p=0,006$ e $p=0,016$ respectivamente), porém a diferença em SLP não foi significativa ($p=0,460$ e $p=0,116$). O estágio T se correlacionou de maneira significativa com a SG e SLP ($p=0,016$ e $p=0,021$ respectivamente), enquanto estágio N, sexo e estágio pela AJCC não apresentaram correlação com SG ou SLP. Tabelas com a relação entre as características clínicas e desfechos de SG e SLP, além de curvas de sobrevida para idade, sítio primário, *status* p16, tabagismo e estágio T podem ser observados no Apêndice 2.

4.3 TAXA DE DETECÇÃO DE CTCs E CORRELAÇÃO DA CONTAGEM DE CTCs *BASELINE* COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Utilizando o sistema *ISET* foram detectadas CTCs antes do tratamento em 78 dos 83 pacientes do estudo, perfazendo uma taxa de detecção de 94%, com uma mediana quantitativa de CTCs de 3,5 por mL (desvio padrão: 3,2), variando de 0 a 19. Analisando separadamente, o subgrupo de pacientes em tratamento adjuvante, ou seja, sem doença *in loco* no momento da coleta e início de tratamento, CTCs foram detectadas em 15 dos 16 pacientes (taxa de detecção de 93,7%). Já o subgrupo de pacientes em tratamento definitivo teve CTCs detectadas antes do tratamento em 63 das 67 amostras, com uma taxa de detecção de 94% neste cenário.

Analisando a correlação entre contagens de CTCs *baseline* e características clínicas dos pacientes, não houve relação entre o valor médio quantitativo de CTCs

antes do tratamento e gênero, sítio primário (orofaringe x não orofaringe), *status* do p16, idade, histórico de tabagismo ou estágio T. Houve relação com estágio N, com pacientes com doença N2 e N3 apresentando significativamente média de CTCs *baseline* maior em comparação com doença N0 ou N1 ($p=0,024$), entretanto quando analisamos os pacientes com estágio N2c e N3, não houve diferença em comparação com estágios $\leq$ N2b ($p=0,123$), conforme podemos observar na Figura 1.

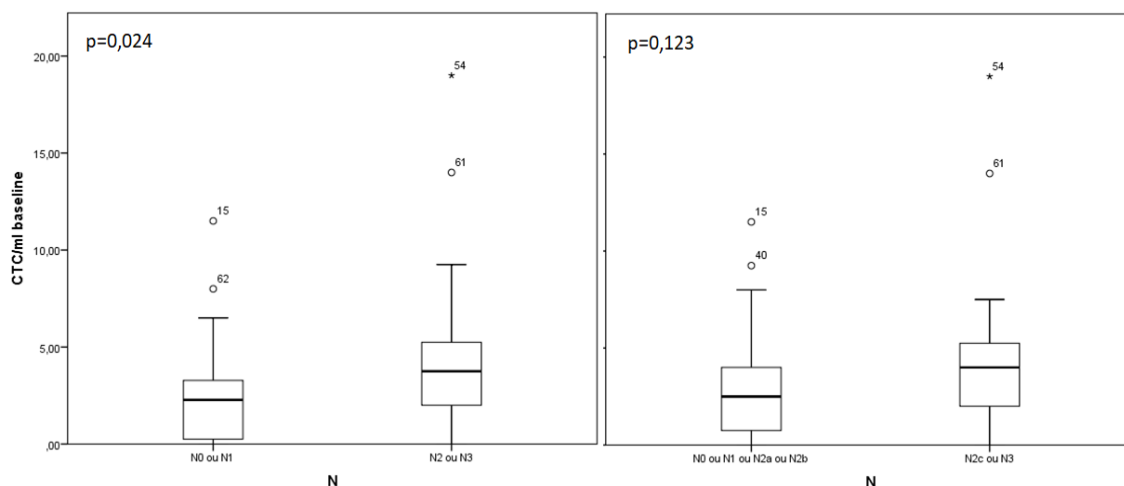


Figura 1 - *Box-plot* demonstrando a relação entre contagens de CTCs *baseline* e estágio N.

Também houve relação entre a contagem média de CTCs *baseline* o estágio pela AJCC, com pacientes em estágio IVB apresentando médias significativamente maiores em relação a estágio III ($p=0,03$), porém sem diferença significativa quando comparamos estágio III *versus* IVA ($p=1,0$) ou IVA *versus* IVB ($p=0,086$), conforme demonstrado na figura 2. A análise da correlação de contagens de CTCs *baseline* e características clínicas pode ser observada na Tabela 4.

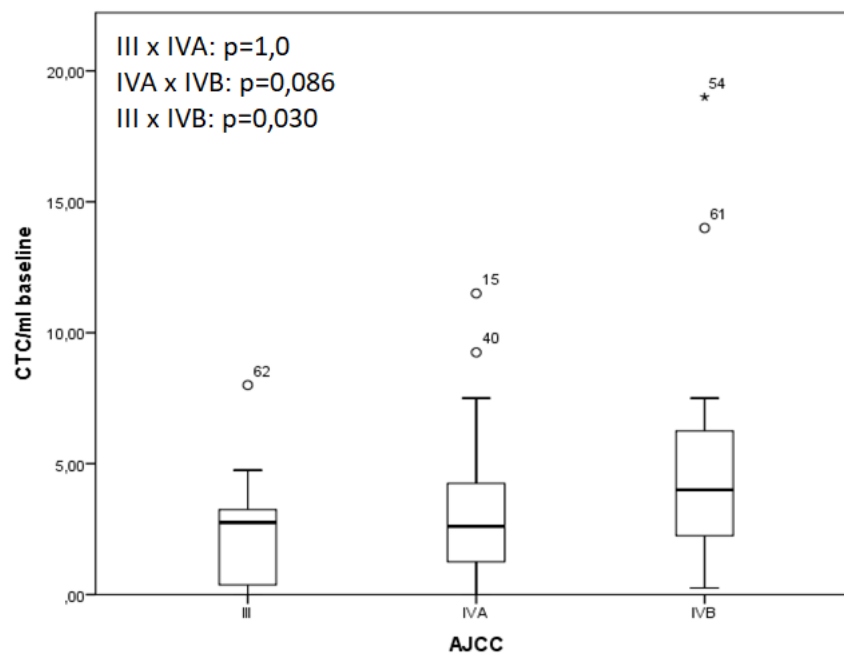


Figura 2 - *Box-plot* demonstrando a relação entre contagens de CTCs *baseline* e estágio pela AJCC.

Tabela 4 - Relação entre médias de contagens de CTCs *baseline* e características clínicas dos pacientes.

Característica	Média de CTCs/mL <i>Baseline</i> (DP)	Variação	p
Idade			
> 70 anos	3,6 (2,6)	0-9,2	0,461
≤ 70 anos	3,4 (3,3)	0-19	
Gênero			
Masculino	3,7 (3,4)	0-19	0,212
Feminino	2,4 (1,8)	0-5,7	
Sítio Primário			
Orofaringe	3,2 (2,1)	0-7,5	0,458
Não orofaringe	3,7 (4,0)	0-19	
Status p16			
Positivo	3,2 (1,9)	0-7,5	0,570
Negativo / Desconhecido	3,0 (2,3)	0,1-7,2	
Tabagismo			
≥ 10 nos/maço	3,7 (3,5)	0-19	0,551
< 10 anos/maço	2,9 (2,1)	0-7,5	
Estágio T			
T0, T1 ou T2	3,2 (1,8)	0-7,5	0,619
T3 ou T4	3,5 (3,6)	0-19	
Estágio N			
N0 ou N1	2,5 (2,7)	0-11,5	0,024
N2 ou N3	3,9 (3,3)	0-19	
Estágio N			
N0, N1, N2a ou N2b	3,0 (2,7)	0-11,5	0,123
N2c ou N3	4,1 (3,6)	0-19	
AJCC			
III	2,3 (2,4)	0-8	1,0*
IVA	3,1 (2,6)	0-11,5	0,084**
IVB	5,2 (4,3)	0,2-19	0,030***

*comparação entre estágio III x IVA; **comparação entre estágio IVA x IVB; ***comparação entre estágio III x IVB.

4.4 IMPACTO PROGNÓSTICO DA CONTAGEM DE CTCs ANTES DO TRATAMENTO (*BASELINE*)

Com um tempo de seguimento mediano de 27,6 meses, houve correlação significativa entre a contagem de CTCs *baseline* e SG. Como variável contínua, para cada aumento de 1 CTC antes do tratamento houve um aumento significativo do risco de óbito de 18% (HR=1,18; IC95%: 1,06-1,31; p<0,001). A figura 3 representa de maneira gráfica a correlação entre aumento de CTCs *baseline* e aumento do risco de óbito, partindo de ausência de CTCs como HR=1,0 e a tabela 5 demonstra de

maneira numérica o incremento do risco de óbito de acordo com o aumento de CTCs *baseline*, considerando novamente ausência de CTCs como HR=1,0.

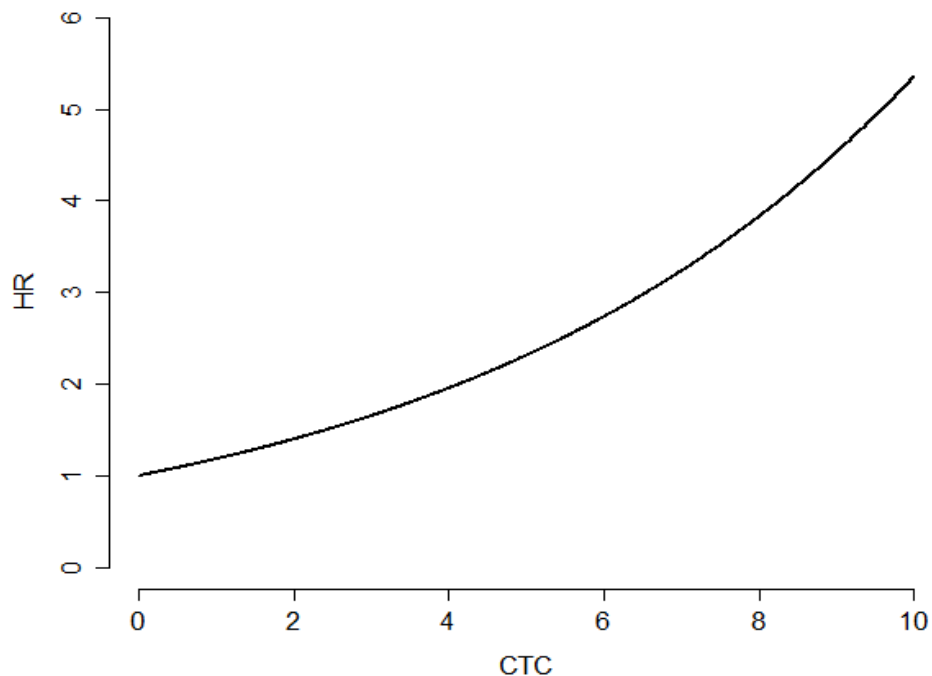


Figura 3 - Correlação entre contagem de CTCs *baseline* (eixo x) e risco de óbito (HR; eixo y) considerando HR=1,00 para ausências de CTCs.

Tabela 5 - Correlação entre incremento do número de CTCs *baseline* e aumento do risco de óbito (HR), considerando ausência de CTCs como HR=1,0.

CTCs <i>Baseline</i> (n/ml)	Hazard Ratio (HR)
1	1,18
2	1,39
3	1,65
4	1,95
5	2,31
6	2,74
7	3,24
8	3,83
9	4,53
10	5,36

Também houve correlação significativa entre contagem de CTCs *baseline* e SLP. Como variável contínua, para cada aumento de 1 CTC antes do tratamento, houve um aumento significativo de 16% no risco de progressão (HR=1,16; IC95%: 1,04-1,28; $p=0,004$). A figura 4 representa de maneira gráfica a correlação entre aumento de CTCs *baseline* e aumento do risco de progressão, partindo de ausência de CTCs como HR=1,0 e a tabela 6 demonstra de maneira numérica o incremento do risco de progressão de acordo com o aumento de CTCs *baseline*.

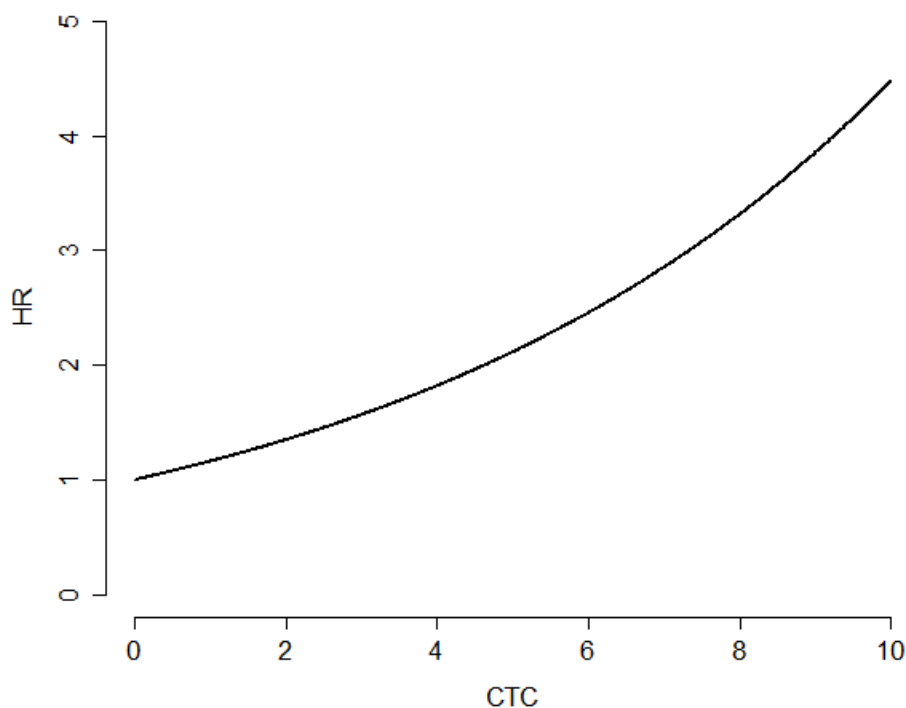


Figura 4 - Correlação entre contagem de CTCs *baseline* (eixo x) e risco de progressão de doença (HR; eixo y) considerando HR=1.0 para ausências de CTCs.

Tabela 6 - Correlação entre incremento do número de CTCs *baseline* e aumento do risco de progressão, considerando ausência de CTCs como HR=1.0.

CTCs <i>Baseline</i> (n/ml)	Hazard Ratio (HR)
1	1,16
2	1,34
3	1,56
4	1,82
5	2,11
6	2,45
7	2,85
8	3,32
9	3,85
10	4,48

Para estabelecer um ponto de corte de CTCs *baseline* correlacionado com desfechos clínicos foi utilizado o teste de Lausen e Schumacher, que analisa diversos pontos de corte de CTCs antes do tratamento e sua correlação com o risco do desfecho, ou seja, risco de óbito para SG ou risco de progressão para SLP.

Analizando o teste de Lausen e Schumacher para SG, evidenciou-se o ponto de corte de CTCs acima de 6,5 como associado a maior risco de óbito, conforme pode ser observado na Figura 5.

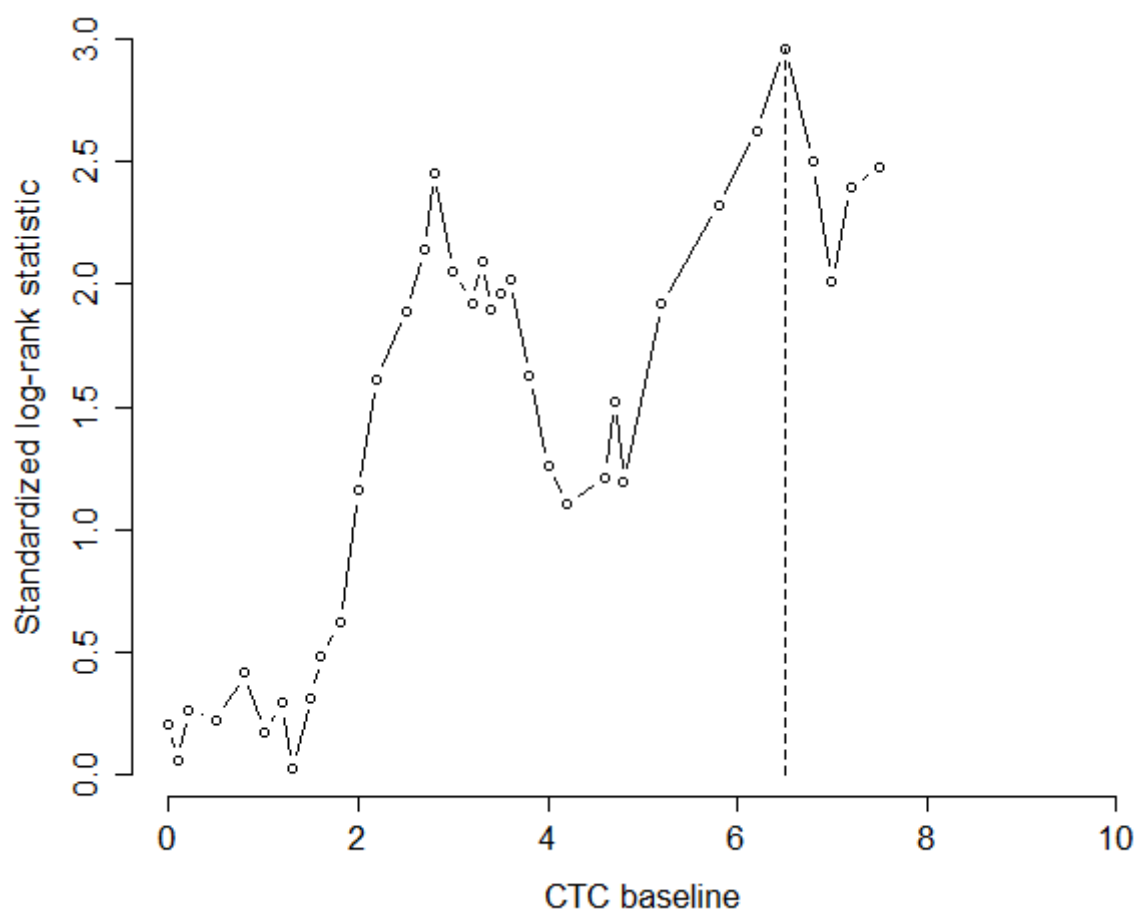


Figura 5 - Análise de pontos de corte de CTCs *baseline* e risco de óbito, demonstrando CTCs acima de 6,5/mL como ponto de corte ideal.

Analisando este ponto de corte, foi demonstrado impacto significativo da contagem de CTCs *baseline* e SG, com estimativa de sobrevida em dois anos de 85,6% para pacientes com contagem de CTCs *baseline* menor que 6,5 e apenas 22,9% para pacientes com contagens maiores ou iguais a 6,5, com SG mediana não atingida *versus* 14,5 meses respectivamente (HR=0,18; IC95%: 0,06-0,49; $p<0,001$), conforme demonstrado na Figura 6.

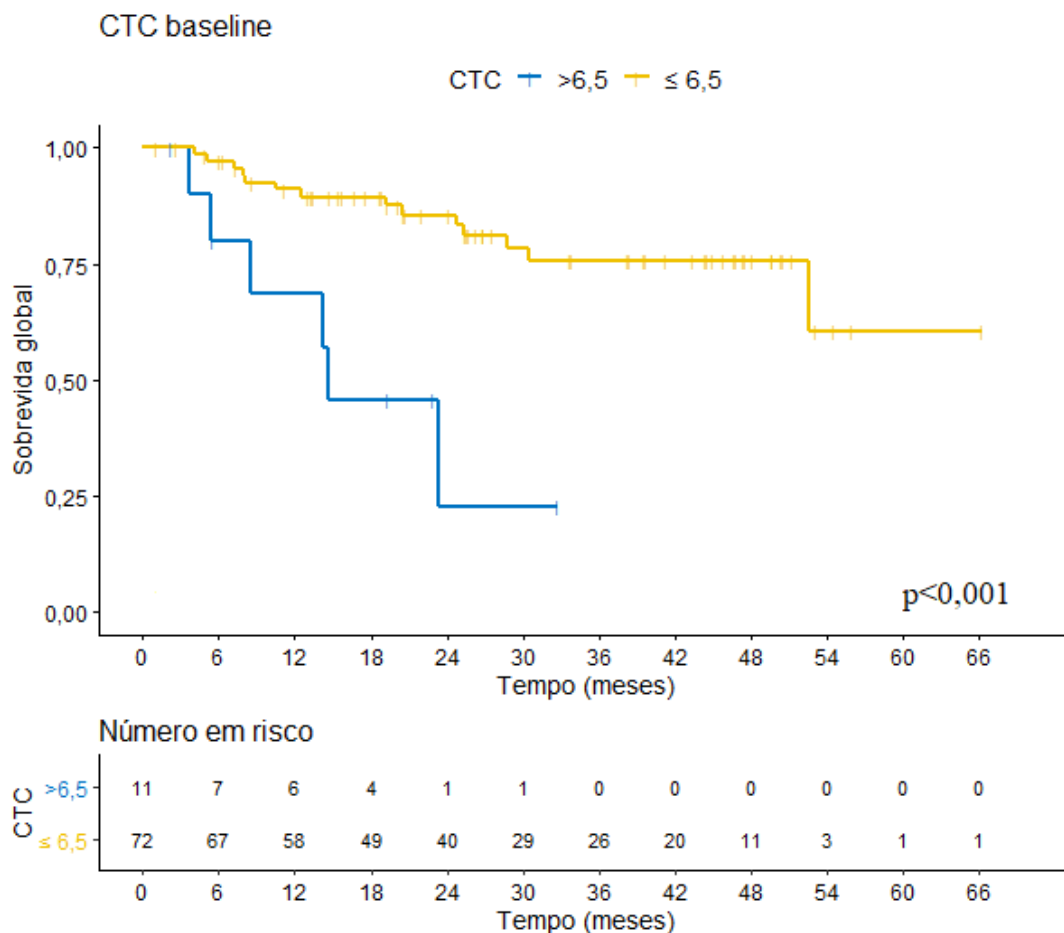


Figura 6 - Curvas de Kaplan Meier correlacionando CTCs *baseline* ($<$ ou $\geq 6.5/\text{mL}$) e sobrevida global.

Apesar do impacto bastante significativo em SG utilizando-se o ponto de corte de 6,5, apenas 11 pacientes de nossa amostra (13%) se situavam acima desta contagem, o que limita a aplicabilidade clínica do teste. Por este motivo, foi realizada uma nova análise excluindo o extremo superior de contagem de CTCs *baseline*, selecionando o segundo melhor ponto de corte em relação ao impacto no desfecho de SG, chegando ao valor de 2,8 CTCs/mL, conforme demonstrado na Figura 7.

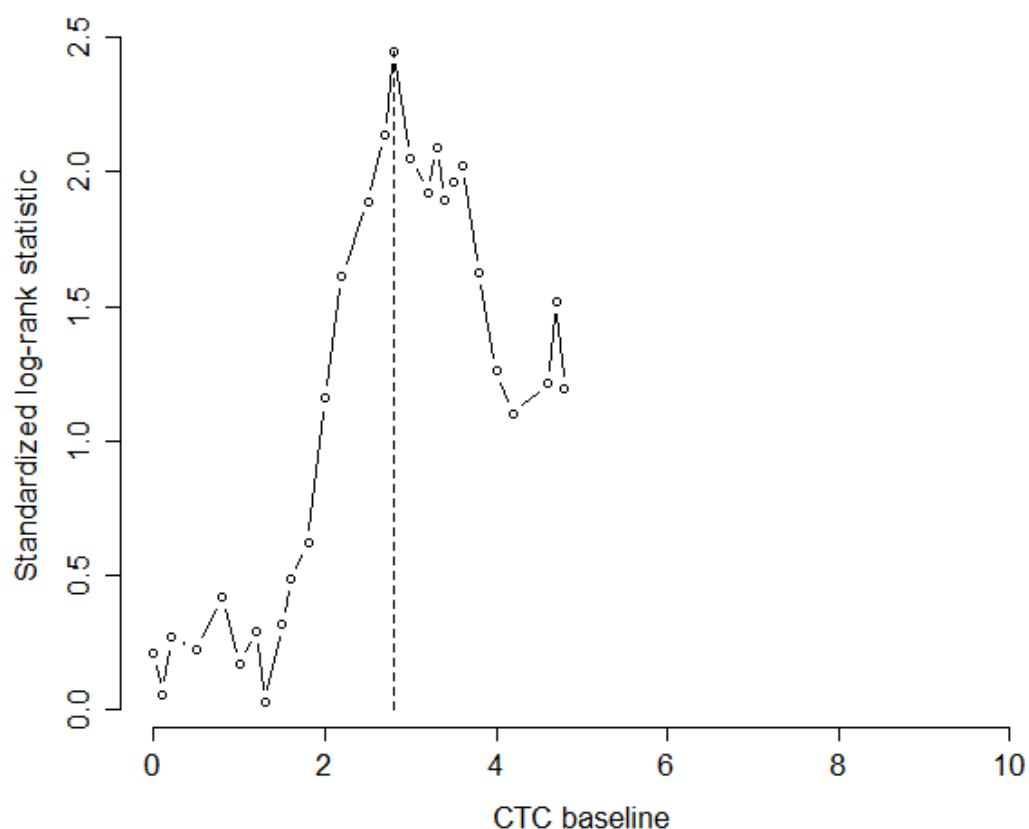


Figura 7 - Análise de pontos de corte de CTCs *baseline* e risco de óbito, excluindo o extremo superior de contagem de CTCs, demonstrando CTCs acima de 2,8 como segundo ponto de corte ideal.

Analisando o ponto de corte de 2,8 CTCs/mL, também houve impacto significativo em SG, com estimativa em dois anos de 88% para pacientes com CTCs *baseline* menor ou igual a 2,8 e de 70.3% para aqueles com CTCs acima de 2,8, com SG mediana não atingida versus 52 meses, respectivamente (HR=0.30; IC95%: 0.11-0.83; p=0.015), conforme demonstrado na Figura 8.

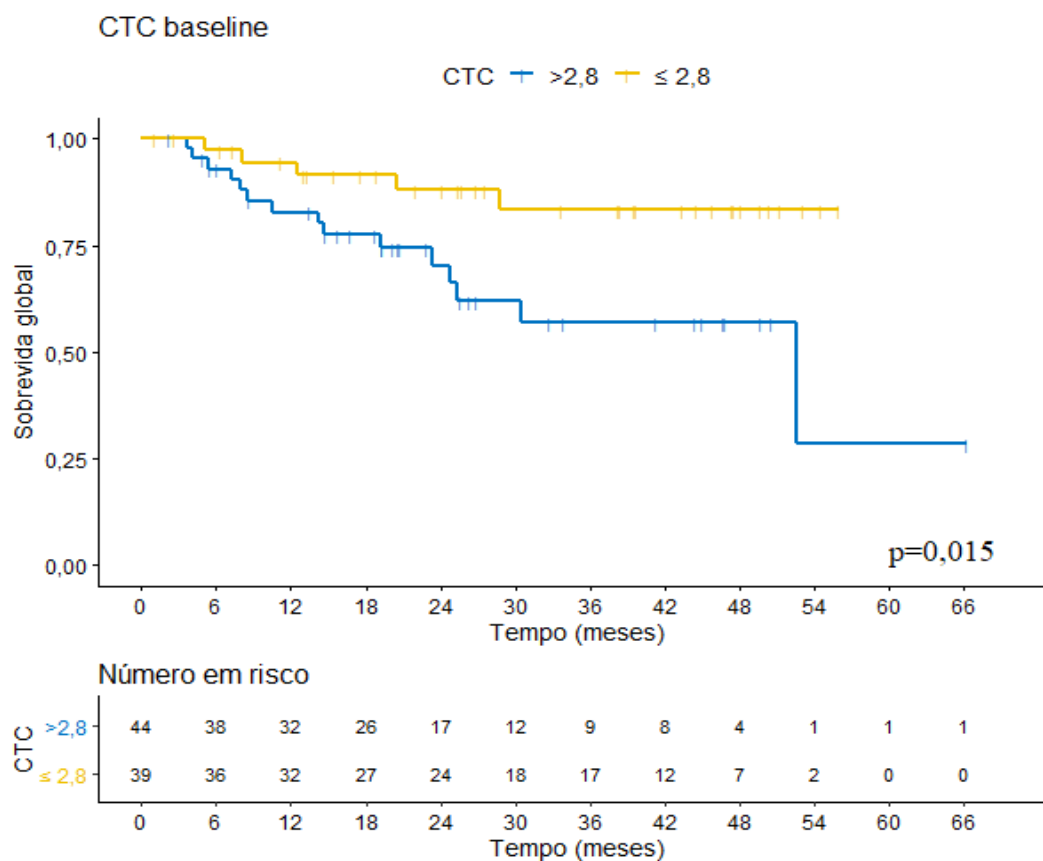


Figura 8 - Curvas de Kaplan Meier correlacionando CTCs *baseline* ($\leq$ ou $> 2.8/\text{mL}$) e sobrevida global.

Utilizando a mesma metodologia foi estabelecido o ponto de corte de CTCs *baseline* que melhor se correlacionava com o desfecho de SLP, chegando ao valor de 3,8 CTCs/mL, conforme figura 9.

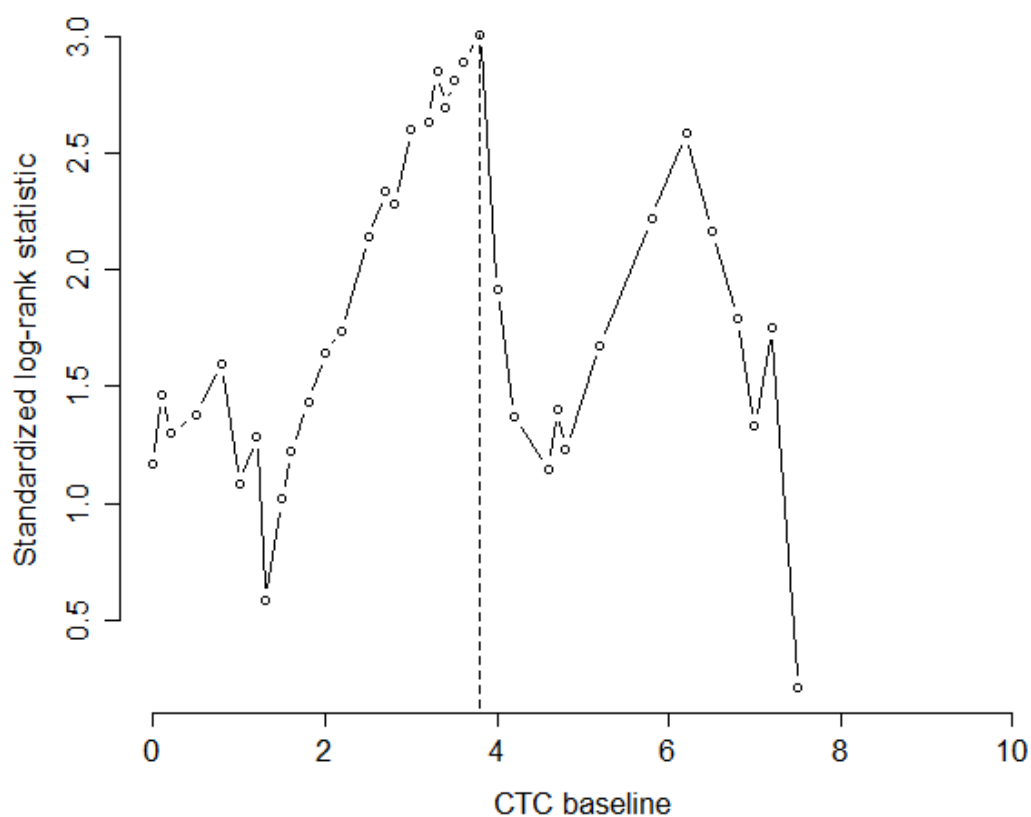


Figura 9 - Análise de pontos de corte de CTCs *baseline* e risco de progressão, demonstrando CTCs acima de 3,8 como ponto de corte ideal.

Analisando este ponto de corte, houve impacto significativo da contagem de CTCs antes do tratamento e SLP, com estimativa em dois anos de 71,8% para pacientes com CTCs menor ou igual a 3,8 e de 37% para pacientes com CTCs acima de 3,8, com SLP mediana não atingida *versus* 17,4 meses (HR=0,32; IC95%: 0,15-0,67; p=0,001), conforme demonstrado na Figura 10.

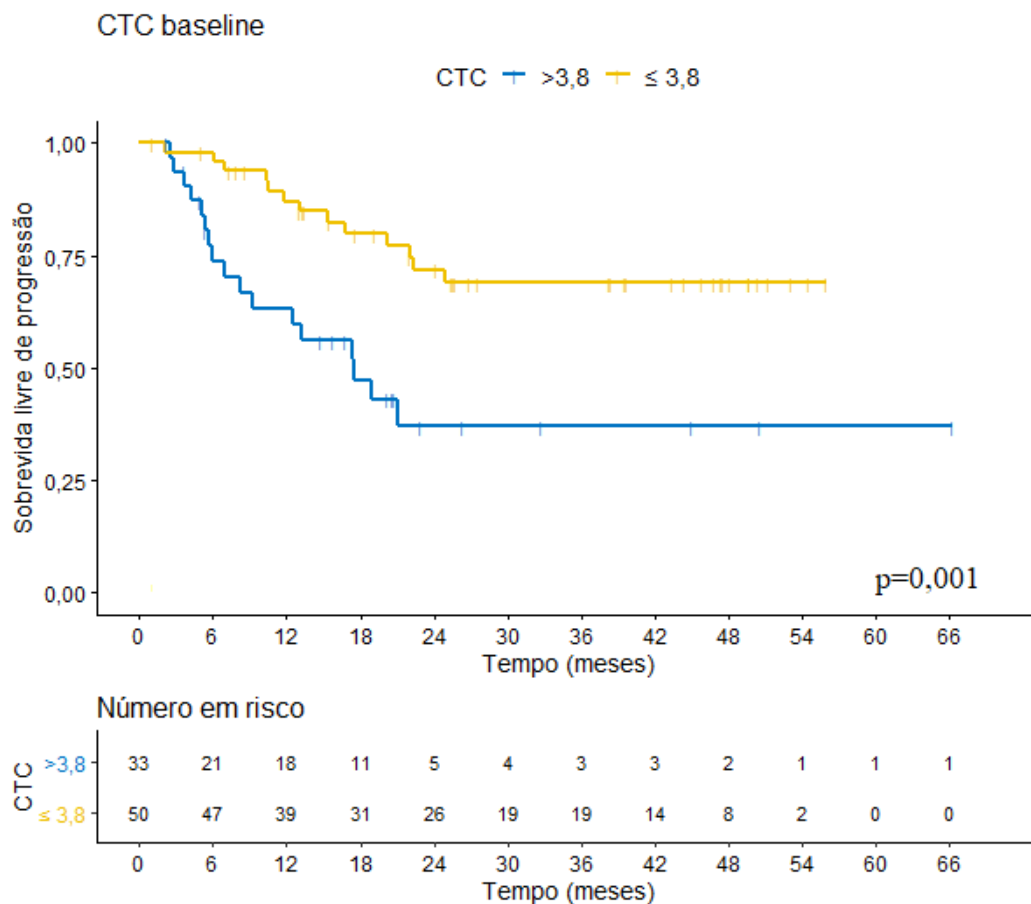


Figura 10 - Curvas de Kaplan Meier correlacionando CTCs *baseline* ($\leq$ ou $>$ 3.8/mL) e sobrevida livre de progressão.

Como análise exploratória, apenas 5 dos 83 pacientes não apresentavam CTCs detectáveis antes do início do tratamento (6%). Entre estes, nenhum apresentou recidiva ou progressão e apenas 1 evoluiu a óbito, por causa não relacionada diretamente ao câncer (complicações do tratamento).

Para análise multivariada de SG foi construído um modelo levando em consideração os fatores clínicos com impacto significativo, ou seja, idade em anos e tabagismo em anos/maço (como variáveis contínuas), sítio primário (orofaringe x não orofaringe) e estágio T (T0, T1 e T2 x T3 e T4). O *status* p16 não foi considerado pelo número limitado de pacientes nesta categoria (subgrupo dos tumores de orofaringe) e pelo fato de não ter ocorrido nenhum evento no grupo p16 positivo, o que impossibilita esta análise. Ajustado para estes fatores, a contagem de CTCs *baseline* se mostrou um fator prognóstico significativo independente (HR=1,15; IC95%: 1,03-1,29; p=0,009), conforme pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Análise multivariada de sobrevida global para contagem de CTCs *baseline* na população total do estudo (n=83).

Variável	HR (IC95%)	p
Idade	1,05 (0,99-1,11)	0,062
Sítio Primário	0,78 (0,27-2,24)	0,645
Tabagismo	3,98 (0,41-38,36)	0,231
Estágio T	10,25 (1,25-83,69)	0,030
CTCs <i>baseline</i>	1,15 (1,03-1,29)	0,009

A contagem de CTCs *baseline* se manteve como fator prognóstico independente mesmo após a seleção de variáveis obtida por meio da técnica *stepwise (backward)* destes fatores (HR=1,17; IC95%: 1,05-1,31; p=0,005).

Para análise multivariada da SLP o modelo levou em consideração a característica clínica com impacto significativo, ou seja, estágio T (T0,T1 e T2 x T3 e T4), e aquelas com p<0,2, que foram sítio primário (orofaringe x não orofaringe) e tabagismo (como variável contínua), além da idade (como variável contínua), por sua importância como fator prognóstico, apesar do impacto não significativo em SLP. Mais uma vez o *status* p16 não foi considerado pelo número limitado de pacientes com esta análise. Ajustado para estes fatores, a contagem de CTCs *baseline* foi um fator prognóstico significativo independente (HR=1,14; IC95%: 1,03-1,26; p=0,011), conforme Tabela 8.

Tabela 8 - Análise multivariada de sobrevida livre de progressão para contagem de CTCs *baseline* na população total do estudo (n=83).

Variável	HR (IC95%)	p
Idade	1,01 (0,97-1,06)	0,516
Sítio Primário	0,71 (0,32-1,57)	0,404
Tabagismo	0,99 (0,98-1,01)	0,871
Estágio T	3,44 (1,17-10,12)	0,024
CTCs <i>baseline</i>	1,14 (1,03-1,26)	0,011

Após a seleção de variáveis pela técnica *stepwise (backward)*, a contagem de CTCs *baseline* manteve-se como um fator prognóstico independente (HR=1,14; IC95%: 1,03-1,26; p=0,007).

Este tipo de análise multivariada, levando em consideração os fatores clínicos descritos para cada desfecho (sobrevida global e livre de progressão), associados à variável de interesse foi utilizada ao longo do estudo sempre com essa mesma metodologia. Um modelo inicial considerando todos os fatores e um modelo final, ajustado através da seleção de variáveis obtido pela técnica *stepwise (backward)*, e estarão descritos ao longo do texto apenas como modelo inicial e modelo final. Ressaltando que variáveis sem significância no modelo inicial, usualmente não são selecionadas para o modelo final, e consequentemente não tem estes resultados descritos.

Na análise multivariada para os pontos de corte em relação a SG, o valor de 6,5 CTCs/mL foi um fator prognóstico independente tanto no modelo inicial (HR=0,28; IC95%: 0,09-0,86; p=0,027) quanto no modelo final (HR=0,26; IC95%: 0,09-0,74; p=0,012). Já levando em consideração o valor de 2,8 CTCs/mL, não houve significância estatística no modelo inicial (HR=0,39; IC95%: 0,14-1,10; p=0,077).

Avaliando o ponto de corte de 3,8 CTCs/mL e SLP, a análise multivariada demonstrou este ponto como um fator prognóstico independente para SLP, tanto no modelo inicial (HR=0,27; IC95%: 0,12-0,56; p=0,001) quanto no modelo final (HR=0,28; IC95%: 0,13-0,59; p=0,001).

4.5 IMPACTO PROGNÓSTICO DA PRESENÇA DE MICROÊMBOLOS ANTES DO TRATAMENTO (BASELINE)

Microêmbolos, definidos como 3 ou mais CTCs agrupadas e coesas, foram detectados antes do tratamento em 23 dos 83 pacientes, perfazendo uma prevalência de 27,7%, e houve correlação significativa da presença de ME e contagem de CTCs mais altas (p<0,001). A presença de ME não se correlacionou de maneira significativa com a SG, apesar da diferença numérica na estimativa em dois anos, que foi de 62.8% para pacientes com ME e de 84.3% nos pacientes sem ME

detectáveis antes do tratamento (HR=2,32; IC95%: 0,95-5,66; p=0,064), como demonstrado na figura 11.

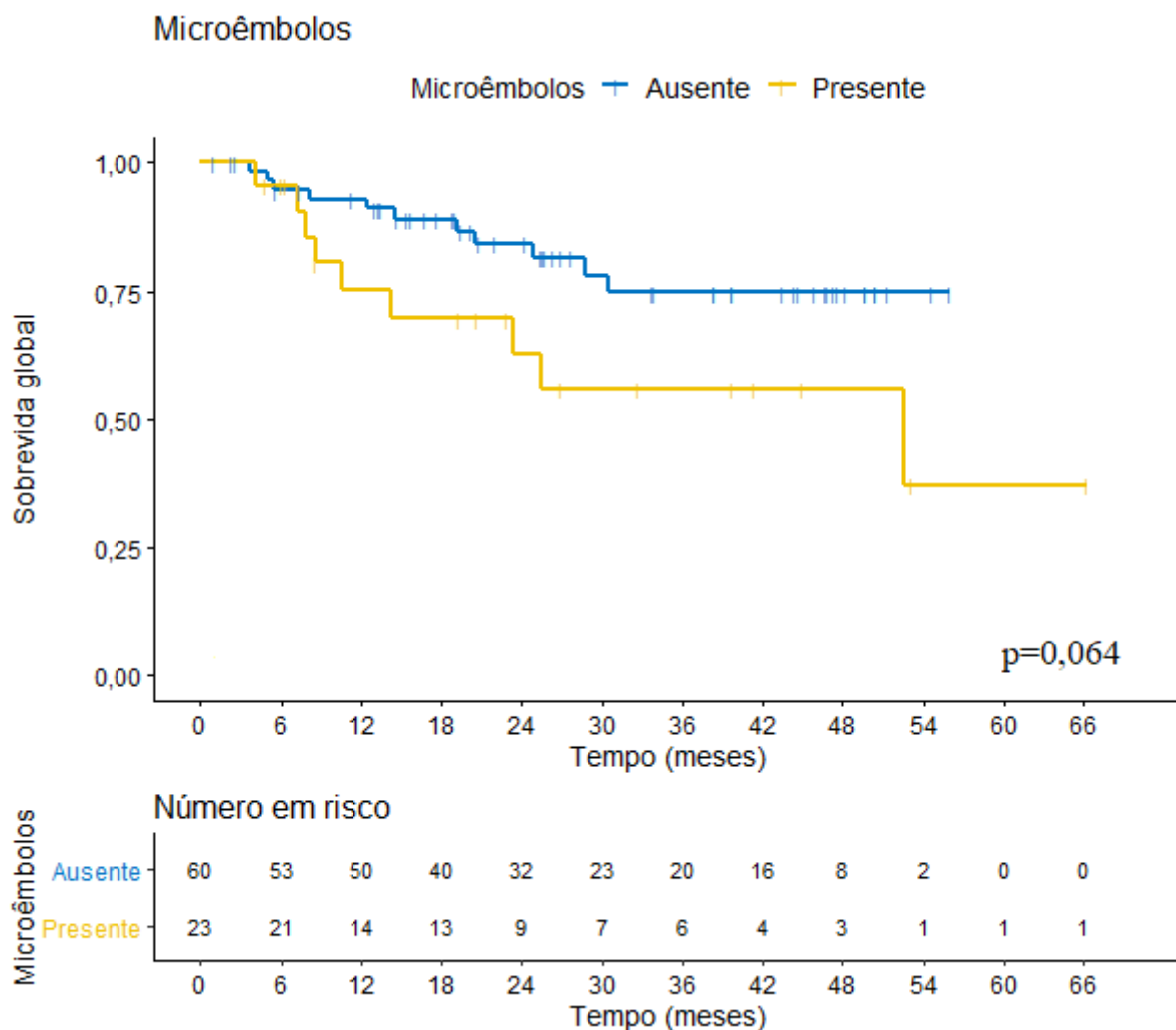


Figura 11 - Curvas de Kaplan Meier correlacionando presença de microêmbolos antes do tratamento e sobrevida global.

Em relação a SLP, houve impacto significativo da presença de ME *baseline*. A estimativa em dois anos foi de 43% para os pacientes com ME detectáveis *versus* 65,3% para os pacientes sem ME antes do tratamento, com uma mediana de SLP de 16,7 meses *versus* mediana não atingida, respectivamente para ME positivo e negativo (HR=2,70; IC95%: 1,30-5,58; p=0,007), conforme demonstrado na Figura 12.

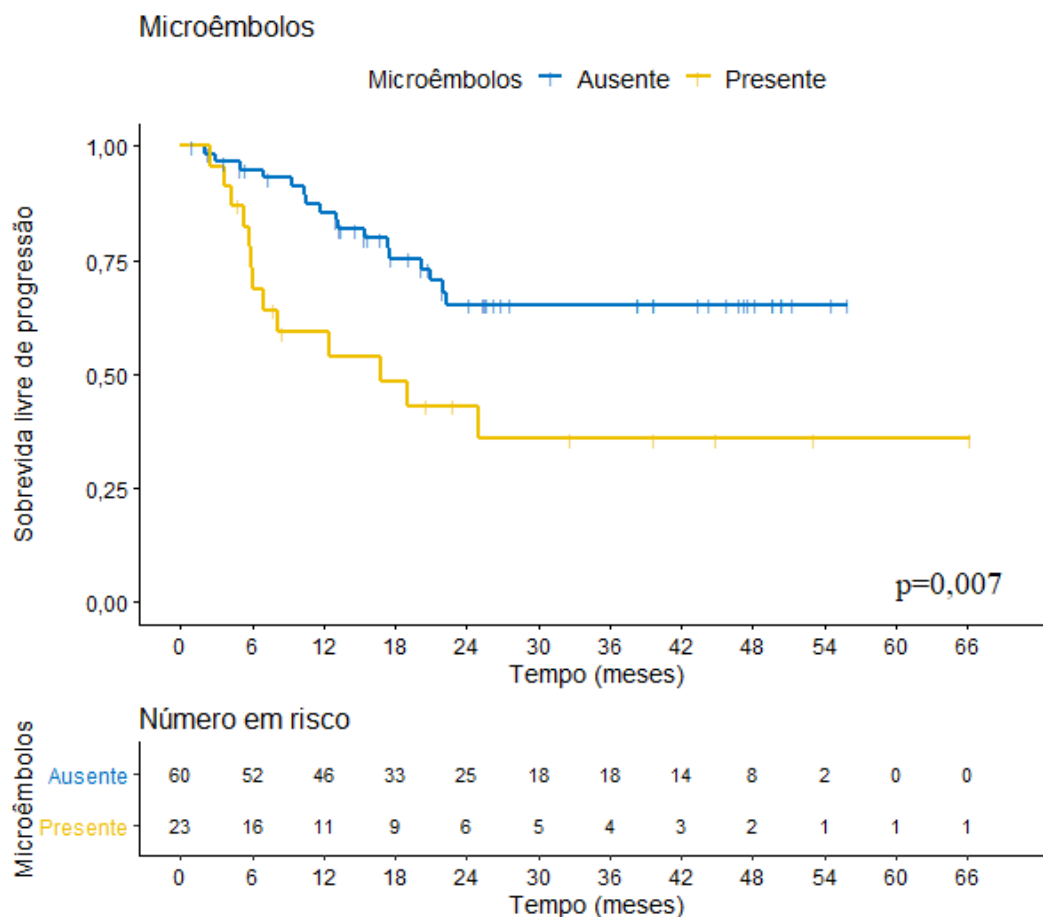


Figura 12 - Curvas de sobrevida de Kaplan Meier correlacionando presença de microêmbolos antes do tratamento e sobrevida livre de progressão.

Na análise multivariada, em relação a SG, a presença de ME permaneceu sem significância estatística no modelo inicial (HR=1,84; IC95%: 0,72-4,67; $p=0,196$). Na análise de SLP, a presença de ME foi um fator prognóstico independente, no modelo inicial (HR=2,69; IC95%: 1,27-5,68; $p=0,009$) e no modelo final (HR=2,58; IC95%: 1,24-5,35; $p=0,010$).

4.6 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES POR IMUNOCITOQUÍMICA NAS CTCS ANTES DO TRATAMENTO (BASELINE)

Foi analisada a expressão por imunocitoquímica de biomarcadores de resistência ao tratamento e de EMT nas CTCs antes do tratamento e sua correlação

com desfechos de sobrevida. Exemplos de CTCs e ICC dos biomarcadores podem ser observados nas Figuras 13 e 14.

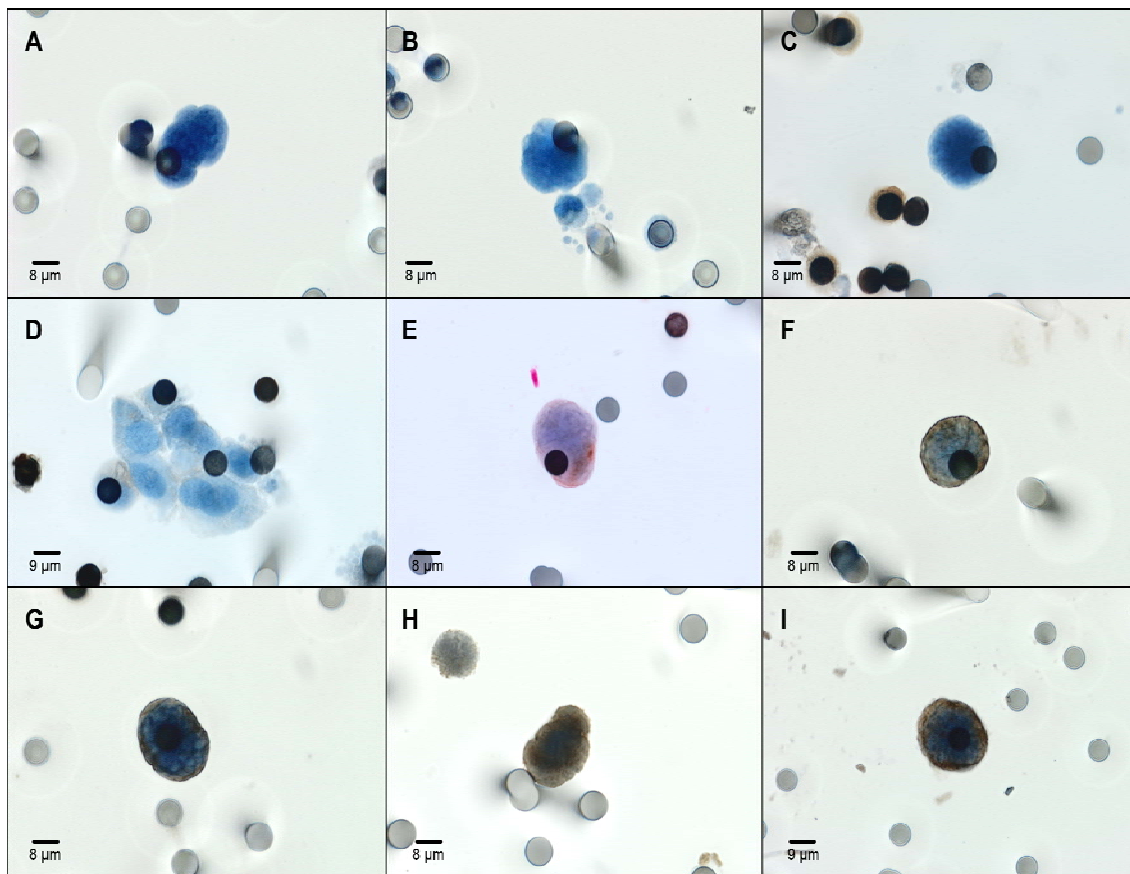


Figura 13 - Fotomicrografias de Células Tumorais Circulantes (CTCs) isoladas do sangue de pacientes com câncer de cabeça e pescoço localmente avançado. Pode-se observar as CTCs e os poros da membrana de policarbonato de 8µm de diâmetro. **A)** CTC negativa visualizada com hematoxilina e eosina (HE). **B)** CTC negativa. **C)** CTC negativa. **D)** ME negativo. **E)** CTC duplo positivo para EGFR e ERCC1 (em marrom, coloração com DAB e em rosa, contra-coloração com *permanent red*). **F)** CTC positiva para MRP-7. **G)** CTC positiva para TGFβRI. **H)** CTC positiva para MMP-2. **I)** CTC positiva para MRP-2. Todas as fotomicrografias foram tiradas em microscópio óptico, luz branca, aumento de 40x.

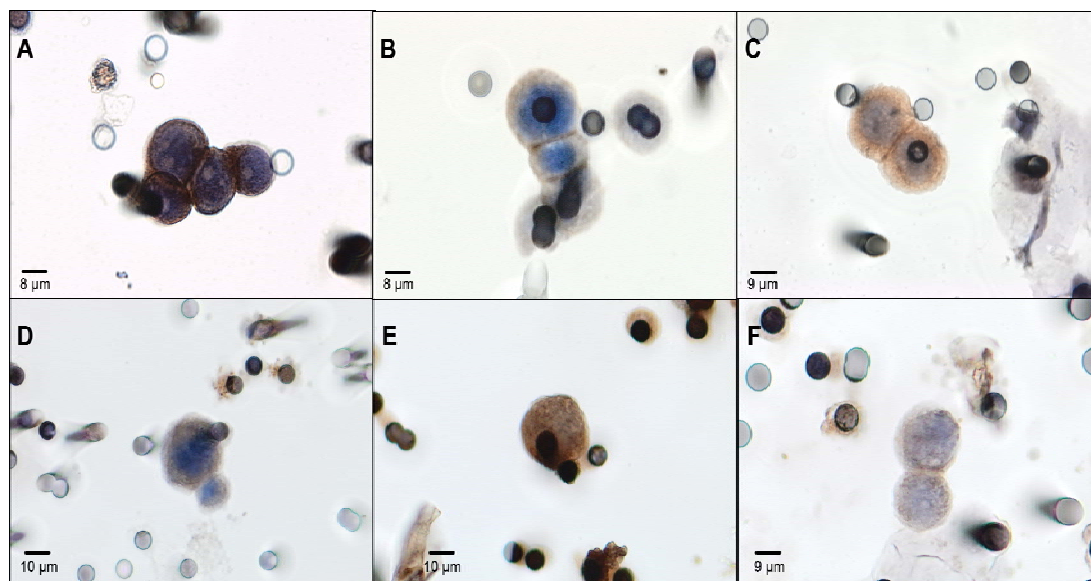


Figura 14 - Fotomicrografias de Células Tumorais Circulantes (CTCs) isoladas do sangue de pacientes com câncer de cabeça e pescoço localmente avançado. Pode-se observar as CTCs marcadas para diversos biomarcadores e os poros da membrana de polycarbonato de 8μm de diâmetro. **A)** MRP-7. **B)** MRP-2. **C)** EGFR. **D)** ERCC1. **E)** MMP-2. **F)** TGFβRI.

A Tabela 9 sumariza os achados em relação a SG, mostrando quantos pacientes tiveram as CTCs testadas para cada um destes biomarcadores, a taxa de positividade de cada um deles e sua correlação com a SG. Nem todos os pacientes que apresentavam CTCs detectáveis antes do tratamento foram testados para todos os biomarcadores, pois é necessário um número suficiente de CTCs para realização de todos os testes e de *spots* para leitura de CTCs, por este motivo o número de pacientes testados variou de 51 a 66. Não houve impacto da expressão de EGFR, ERCC1, β-tubulina III, MRP-2, MRP-7, TGFβRI ou MMP2 nas CTCs *baseline* em SG.

Tabela 9 - Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em CTCs antes do tratamento (*baseline*) e sobrevida global

Biomarcador	n Testado	n (%)	SG Mediana (meses)	SG 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
EGFR	66					
Positivo		49 (74)	52,5	73,7	2,88 (0,64-12,95)	0,168
Negativo		17 (26)	NA	92,3		
ERCC1	55					
Positivo		10 (18)	NA	100	0,34 (0,04-2,67)	0,307
Negativo		45 (82)	NA	77,6		
β-tubulina III	58					
Positivo		26 (45)	52,5	67,3	2,85 (0,87-9,27)	0,081
Negativo		32 (55)	NA	85,6		
MRP-2	54					
Positivo		26 (48)	NA	82,8	0,79 (0,27-2,31)	0,680
Negativo		28 (52)	NA	74,7		
MRP-7	51					
Positivo		27 (53)	NA	79,5	1,07 (0,33-3,43)	0,898
Negativo		24 (47)	NA	78,9		
TGFβRI	52					
Positivo		6 (12)	NA	100	*	0,192
Negativo		46 (88)	NA	75,4		
MMP2	58					
Positivo		43 (74)	52,5	72,2	1,34 (0,43-4,14)	0,603
Negativo		15 (26)	NA	85,6		

* Regressão de Cox não é factível pois não ocorreu nenhum evento no braço TGF β RI positivo.

NA: não alcançada

Os dois biomarcadores que apresentam diferenças numéricas em estimativa de SG em dois anos, porém sem diferença estatística, foram o EGFR, com estimativa em dois anos de 73,7% para EGFR positivo *versus* 92,3% para negativo (HR=2,88; IC95%: 0,64-12,95; p=0,198), e a β -tubulina III, com estimativa em dois anos de 67,3% para CTCs positivas *versus* 85,6% para negativas (HR=2,85; IC95%: 0,87-9,27; p=0,081). As curvas de Kaplan Meier para SG destes dois biomarcadores podem ser visualizadas na Figura 15.

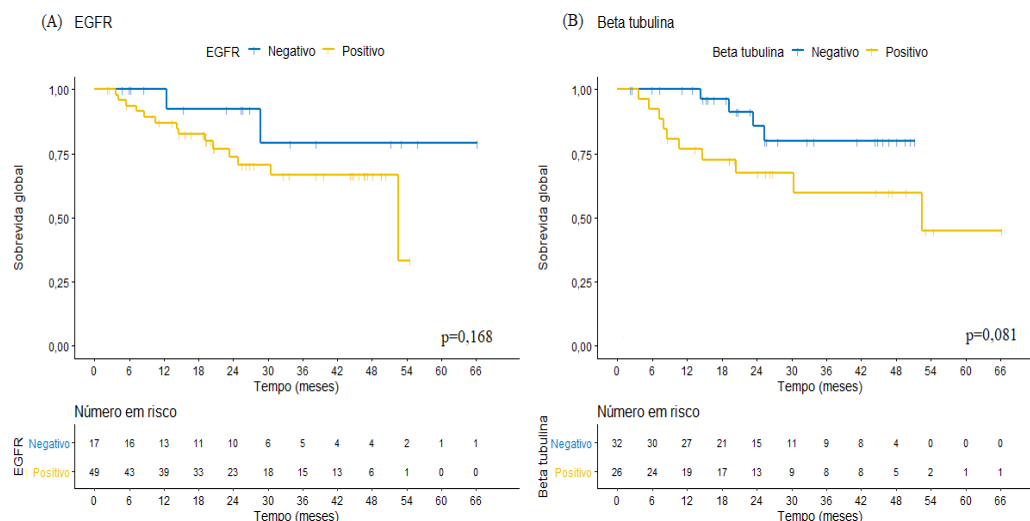


Figura 15 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global de acordo com expressão de EGFR (A) e Beta-tubulina 3 (B) em CTCs antes do tratamento.

Na análise multivariada, o EGFR permaneceu sem significância estatística para SG (HR=1,15; IC95%: 0,22-5,80; p=0,864) no modelo inicial, enquanto a β -tubulina III atingiu significância estatística no modelo inicial (HR=5,14; IC95%: 1,07-24,69; p=0,040), mas não foi selecionada após ajuste para o modelo final.

Não houve correlação entre a expressão dos biomarcadores em CTCs *baseline* e SLP, conforme sumarizado na Tabela 10.

Tabela 10 - Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em CTCs antes do tratamento (*baseline*) e sobrevida livre de progressão.

Biomarcador	SLP Mediana (meses)	SLP 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
EGFR				
Positivo	24,9	51,4	1,69 (0,64-4,47)	0,288
Negativo	NA	66,6		
ERCC1				
Positivo	NA	77,8	0,42 (0,09-1,84)	0,254
Negativo	NA	51,8		
β-tubulina III				
Positivo	52,5	59,0	1,21 (0,50-2,92)	0,661
Negativo	NA	62,7		
MRP-2				
Positivo	24,9	54,6	1,40 (0,59-3,34)	0,443
Negativo	NA	59,6		
MRP-7				
Positivo	NA	62,4	0,96 (0,37-2,51)	0,898
Negativo	NA	57,4		
TGFβRI				
Positivo	NA	62,5	1,01 (0,23-4,42)	0,989
Negativo	NA	61,9		
MMP2				
Positivo	24,9	52,1	1,34 (0,43-4,14)	0,603
Negativo	NA	57,8		

NA: não alcançada

4.7 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES POR IMUNOCITOQUÍMICA EM MICROÊMBOS ANTES DO TRATAMENTO (BASELINE)

Foi analisado também a presença de expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em ME antes do tratamento. Nessa análise foram considerados expressores aqueles que possuíam ME com expressão positiva e negativos os que apresentavam ME sem expressão dos biomarcadores (negativos) e aqueles que não apresentavam ME. Foram excluídos desta análise pacientes que não possuíam *spots* para esta análise, sendo incluídos amostras variando de 76 a 83 pacientes. Não são

descritos resultados para MRP-2 pois nenhuma amostra foi positiva para este biomarcador em ME. Estas análises ficam limitadas devido ao número pequeno de pacientes com presença de ME *baseline* (n=23) e, consequentemente, de uma amostra pequena de pacientes com positividade para os biomarcadores. Por este motivo optou-se por não realizar uma análise limitada a população com ME presentes antes do tratamento, comparando expressores *versus* não expressores.

Analisando o desfecho de SG, a expressão dos biomarcadores de resistência à quimioterapia β -tubulina III e MRP-7 em microêmbolos antes do tratamento, se correlacionaram significativamente com pior SG (p=0,046 e p=0,047 respectivamente). Em relação a SLP, houve correlação significativa entre a expressão de EGFR em ME (p=0,050) e novamente de MRP-7 (p=0,037). As Tabelas 11 e 12 resumizam os achados em relação a expressão dos biomarcadores em ME e desfecho de SG e SLP.

Tabela 11 - Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em ME antes do tratamento (*baseline*) e sobrevida global.

Biomarcador	n Avaliado	n (%)	SG Mediana (meses)	SG 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
EGFR	83				2,63 (0,76-9,09)	0,125
Positivo		6 (7)	23,3	44,4		
Negativo		77 (93)	NA	81,7		
ERCC1	77				*	0,770
Positivo		1 (1.3)	NA	100		
Negativo		76 (98.7)	NA	80,2		
β-tubulina III	82				4,74 (1,02-21,94)	0,046
Positivo		4 (5)	8,5	50		
Negativo		78 (95)	NA	80,5		
MRP-7	80				3,49 (1,01-12,04)	0,047
Positivo		5 (6)	10,5	40		
Negativo		75 (93)	NA	80,7		
TGFβRI	76				1,67 (0,19-14,17)	0,636
Positivo		3 (4)	52,5	100		
Negativo		73 (96)	NA	80		
MMP2	79				2,46 (0,56-10,64)	0,228
Positivo		4 (5)	14,2	50		
Negativo		75 (95)	NA	79,6		

* Regressão de Cox não é factível pois não ocorreu nenhum evento no braço ERCC1 positivo.

NA: não alcançada

Tabela 12 - Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em ME antes do tratamento (*baseline*) e sobrevida livre de progressão.

Biomarcador	SLP Mediana (meses)	SLP 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
EGFR				
Positivo	5,9	33,3	2,88 (1,00-8,30)	0,050
Negativo	NA	61,1		
ERCC1				
Positivo	NA	100	*	0,643
Negativo	NA	61,2		
β-tubulina III				
Positivo	18,9	0	2,77 (0,64-11,90)	0,171
Negativo	NA	61,3		
MRP-7				
Positivo	6,9	40	3,62 (1,08-12,13)	0,037
Negativo	NA	62,1		
TGFβRI				
Positivo	6,1	50	3,23 (0,75-13,80)	0,112
Negativo	NA	62,9		
MMP2				
Positivo	8,1	50	1,58 (0,37-6,68)	0,532
Negativo	NA	59,6		

* Regressão de Cox não é factível pois não ocorreu nenhum evento no braço ERCC1 positivo.

NA: não alcançada

Conforme demonstrado, o único biomarcador que foi prognóstico tanto para SG quanto para SLP foi o MRP-7, cuja expressão em ME *baseline* se correlacionou com pior SG (estimativa em dois anos de 40% x 80,7%; HR=3,49; IC95%: 1,01-12,04; p=0,047) e pior SLP (estimativa em dois anos de 40% x 62,1%; HR=3,62; IC95%: 1,08-12,13; p=0,037), conforme pode ser observado na Figura 16.

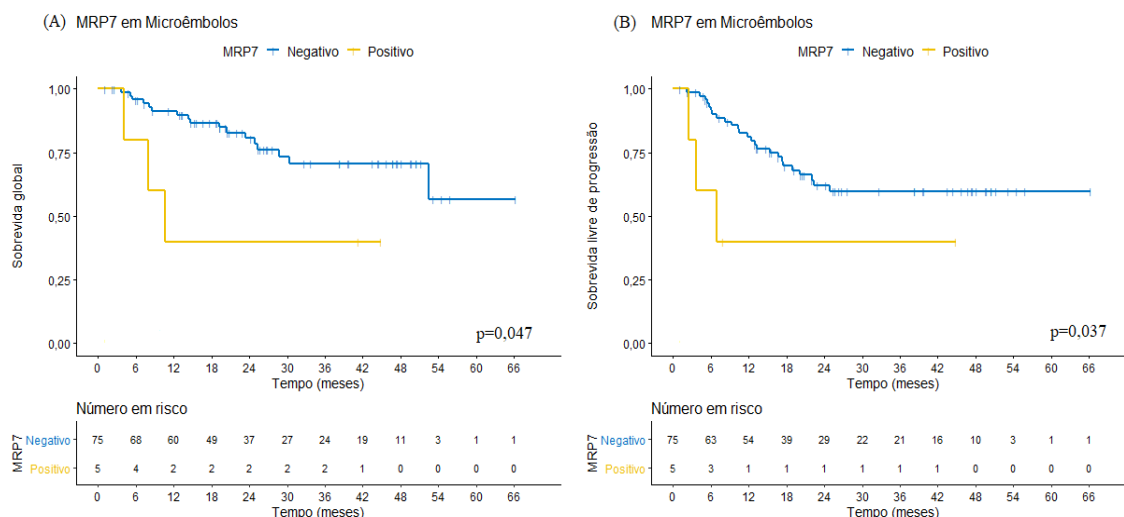


Figura 16 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e sobrevida livre de progressão (B), de acordo com a expressão de MRP-7 em microêmbolos antes do tratamento.

Na Figura 17 podem ser observados as curvas de Kaplan Meier demonstrando o impacto da expressão de β -tubulina III em ME na SG (HR= HR=4,74; IC95%: 1,02-21,94; p=0,046) e da expressão de EGFR em ME na SLP (HR=2,88; IC95%: 1,00-8,30; p=0,050).

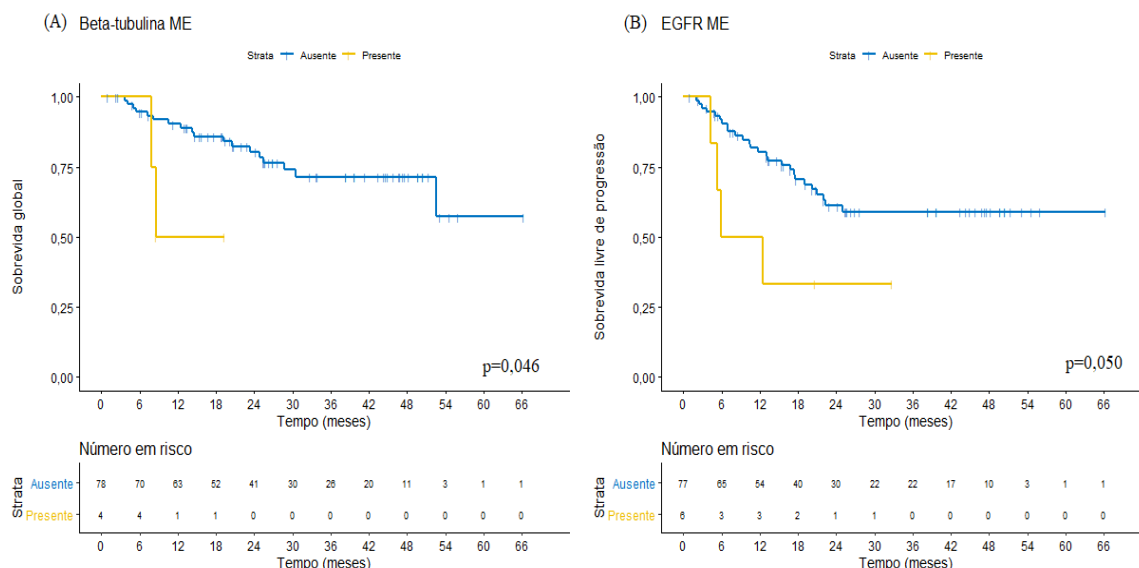


Figura 17 - Curvas de Kaplan Meier para expressão de β -tubulina III em ME e sobrevida global (A) e para expressão de EGFR em ME e sobrevida livre de progressão (B).

Na análise multivariada para SG, a expressão de MRP-7 em ME perdeu a significância no modelo inicial (HR=3,07; IC95%: 0,86-10,92; p=0,082), assim como a expressão de β -tubulina III em ME (HR=3,24; IC95%: 0,64-16,29; p=0,152). Na análise multivariada para SLP, a expressão de MRP-7 em ME foi um fator prognóstico independente significativo, tanto no modelo inicial (HR=5,70; IC95%: 1,55-20,93; p=0,009), quanto no modelo final (HR=5,59; IC95%: 1,55-20,17; p=0,008) enquanto a expressão de EGFR em ME foi um fator prognóstico independente significativo no modelo inicial (HR=3,96; IC95%: 1,27-12,35; p=0,017) entretanto, embora selecionado para o modelo final, não manteve a significância nesta análise (HR=2,80; IC95%: 0,97-8,06; p=0,056).

4.8 POTENCIAL PAPEL PREDITOR DE RESPOSTA AO TRATAMENTO DE CTCS E ME ANTES DO TRATAMENTO (BASELINE)

Para análise do papel preditivo das CTCs e ME *baseline*, limitamos a avaliação a população de pacientes submetidos a tratamento definitivo (n=67). Nesse contexto, devido a presença da doença macroscópica, temos a possibilidade de avaliar a resposta ao tratamento de acordo com os critérios de RECIST e, além disso, podemos avaliar a correlação entre as contagens de CTCs e presença de ME com desfechos, de acordo com a estratégia de tratamento empregada, visto haver mais de uma opção de tratamento neste cenário.

Analizando este subgrupo de pacientes, a contagem de CTCs *baseline* mantém sua correlação significativa com desfechos de sobrevida. Para cada incremento de 1 CTC/ml antes do tratamento, há um aumento significativo no risco de óbito de 20% (HR=1,20; IC95%: 1,08-1,33; p<0,001) e um aumento significativo no risco de progressão de 23% (HR=1,23; IC95%: 1,08-1,40; p=0,004). A representação gráfica destas análises pode ser observada na figura 18 e na tabela 13 a demonstração de maneira numérica do incremento do risco de óbito e de progressão de acordo com o aumento de CTCs *baseline*, considerando ausência de CTCs como HR=1,0.

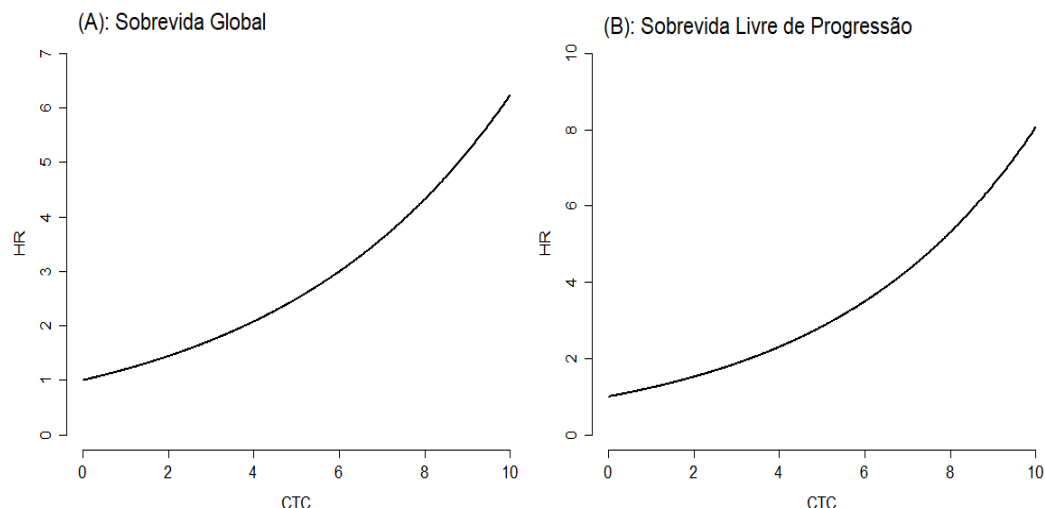


Figura 18 - Correlação entre contagem de CTCs *baseline* (eixo x) e risco (HR; eixo y) de óbito (A) e progressão de doença (B) considerando HR=1.0 para ausências de CTCs. Análise da população submetida a tratamento definitivo (n=67)

Tabela 13 - Correlação entre incremento do número de CTCs *baseline* e aumento do risco de óbito ou progressão, considerando ausência de CTCs como HR=1.0, na população submetida a tratamento definitivo (n=67).

Sobrevida Global		Sobrevida Livre de Progressão	
CTCs baseline (n/ml)	Hazard Ratio (HR)	CTCs baseline (n/ml)	Hazard Ratio (HR)
1	1,20	1	1,23
2	1,44	2	1,51
3	1,73	3	1,87
4	2,07	4	2,30
5	2,49	5	2,84
6	2,99	6	3,49
7	3,60	7	4,31
8	4,32	8	5,31
9	5,19	9	6,54
10	6,23	10	8,06

Para construção do modelo de análise multivariada neste subgrupo de pacientes submetidos a tratamento definitivo não cirúrgico, foi analisado o impacto prognóstico das variáveis demográficas e clínicas nesta população específica, incluindo fatores que são limitados a esta população, como o uso de quimioterapia de indução ou não. O resumo desta análise pode ser observado no Apêndice 3.

Para o modelo de SG foram considerados os fatores com impacto significativo em SG, idade em anos e tabagismo em anos/maço, como variáveis contínuas, além do sítio primário (orofaringe x não orofaringe). Não foi considerado estágio T por não haver nenhum evento no grupo T0, T1 e T2, o que prejudicaria esta análise e, mais uma vez, não foi considerado *status* p16 por não haver nenhum evento na população p16 positiva e pelo número limitado de pacientes que possuía esta análise. Analisando este subgrupo de pacientes, a contagem de CTCs *baseline* mostrou-se um fator prognóstico independente significativo para SG no modelo inicial (HR=1,21; IC95%: 1,07-1,36; p=0,002), como pode ser observado na Tabela 14.

Tabela 14 - Análise multivariada de sobrevida global para contagem de CTCs *baseline* na população submetida a tratamento definitivo (n=67).

Variável	HR (IC95%)	p
Idade	1,07 (1,01-1,13)	0,018
Sítio Primário	0,46 (0,16-1,33)	0,155
Tabagismo	1,06 (0,99-1,23)	0,468
CTCs <i>baseline</i>	1,21 (1,07-1,36)	0,002

Novamente, todas as análises multivariadas realizadas nesta população foram ajustadas por uma seleção de variáveis pela técnica *stepwise (backward)*, chegando a um modelo final de ajuste. A contagem de CTCs *baseline* se manteve como fator prognóstico independente significativo (HR=1,23; IC95%: 1,09-1,39; p<0,001) para SG, mesmo após o ajuste do modelo final de análise.

Para o modelo de análise multivaria de SLP, foi considerada a variável com impacto significativo neste desfecho nesta população, ou seja, estágio T (T0, T1 e T2 x T3 e T4), além daquelas com p<0,2, que foram sítio primário (orofaringe x não orofaringe), idade em anos e tabagismo em anos/maço (como variáveis contínuas). Após ajuste segundo este modelo inicial a contagem de CTCs *baseline* foi um fator prognóstico independente (HR=1,22; IC95%: 1,08-1,39; p=0,002) para SLP nesta população, conforme tabela 15.

Tabela 15 - Análise multivariada de sobrevida livre de progressão para contagem de CTCs *baseline* na população submetida a tratamento definitivo (n=67).

Variável	HR (IC95%)	p
Idade	1,02 (0,96-1,08)	0,391
Sítio Primário	0,88 (0,36-2,13)	0,786
Tabagismo	1,00 (0,96-1,15)	0,954
Estágio T	5,59 (1,26-24,83)	0,024
CTCs <i>baseline</i>	1,22 (1,08-1,30)	0,002

Mesmo após o ajuste para o modelo final de análise multivariada, a contagem de CTCs *baseline* permaneceu como fator prognóstico independente significativo (HR=1,22; IC95%: 1,08-1,37; p=0,001).

Em relação aos pontos de cortes, a população submetida a tratamento definitivo apresentou valores semelhantes aos observados na população global do estudo, conforme podemos observar na figura 19, com melhor ponto de corte de 6,5 CTCs/mL para SG e 3,8 CTCs/mL para SLP. Novamente, pela limitação de aplicabilidade clínica do valor de 6,5 CTCs/mL, avaliamos o gráfico gerado pelo método de Lausen e Schumacher, e observamos que tanto o ponto de 2,8 CTCs/ml, quanto o de 3,8 CTCs/ml foram bons preditores do desfecho de SG (figura 19A). Pelo exposto, limitamos as análises de predição de resposta ao tratamento utilizando como pontos de corte os valores de 2,8 CTCs/ml e 3,8 CTCs/mL, que já haviam se mostrado adequados na população global do estudo, e que pela avaliação dos gráficos e curvas de sobrevida são bons pontos de corte também nesta população submetida a tratamento definitivo, conforme pode-se observar nas figuras 19, 20 e 21. Para SG, considerando o ponto de corte de 6,5 CTCs/mL, observamos estimativa em dois anos de 84,2% para pacientes com CTCs > 6,5/mL versus 18,8% para CTCs ≤ 6,5/mL (HR=0,14; IC95%: 0,05-0,42; p<0,001), enquanto que utilizando o ponto de corte de 2,8 CTCs/mL observamos estimativa em dois anos de 85,7% para CTCs ≤ 2,8/mL versus 65,9% para CTCs > 2,8/mL (HR=0,33; IC95%: 0,10-1,05; p=0,051), conforme demonstrado na figura 20. E para SLP, considerando o ponto de corte de 3,8, observamos estimativa em dois anos de 83,2% para CTCs ≤ 3,8/ml versus 62,3% para CTCs > 3,8/ml (HR=0,28; IC95%: 0,11-0,67; p=0,004), conforme demonstrado na Figura 21.

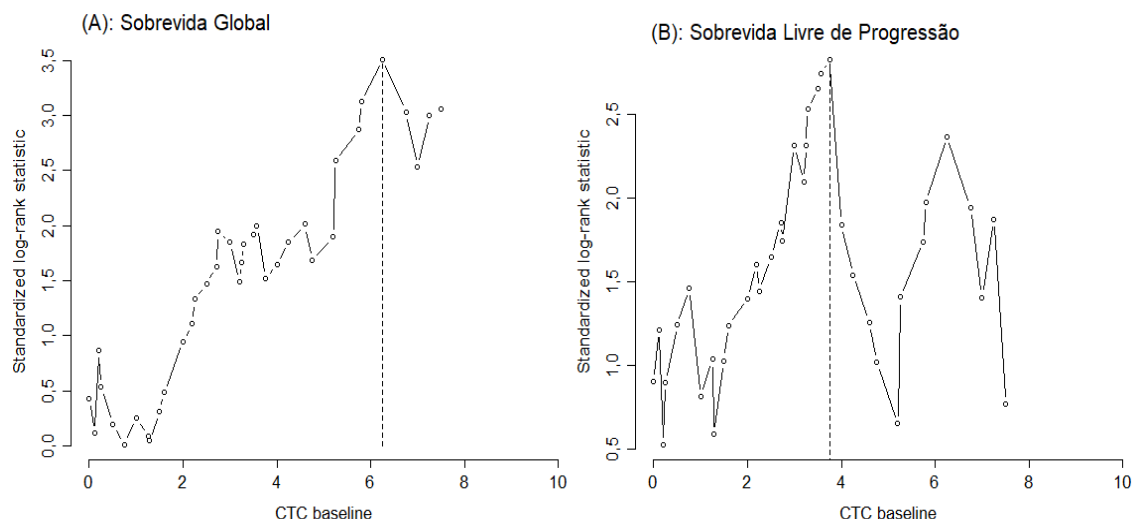


Figura 19 - Análise de pontos de corte de CTCs *baseline* e risco de óbito (A) e progressão (B), na população submetida a tratamento definitivo (n=67). Pontos de corte ideais de 6,5 CTCs/mL para SG e 3,8 CTCs/mL para SLP.

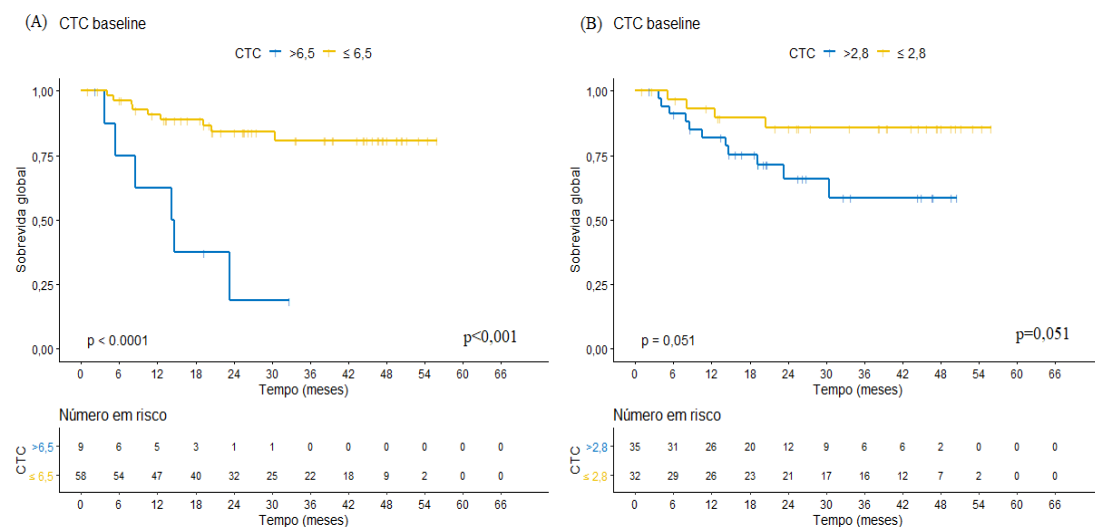


Figura 20 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global, considerando ponto de corte de 6,5 CTCs/mL (A) e de 2,8 CTCs/mL (B), apenas na população submetida a tratamento definitivo (n=67).

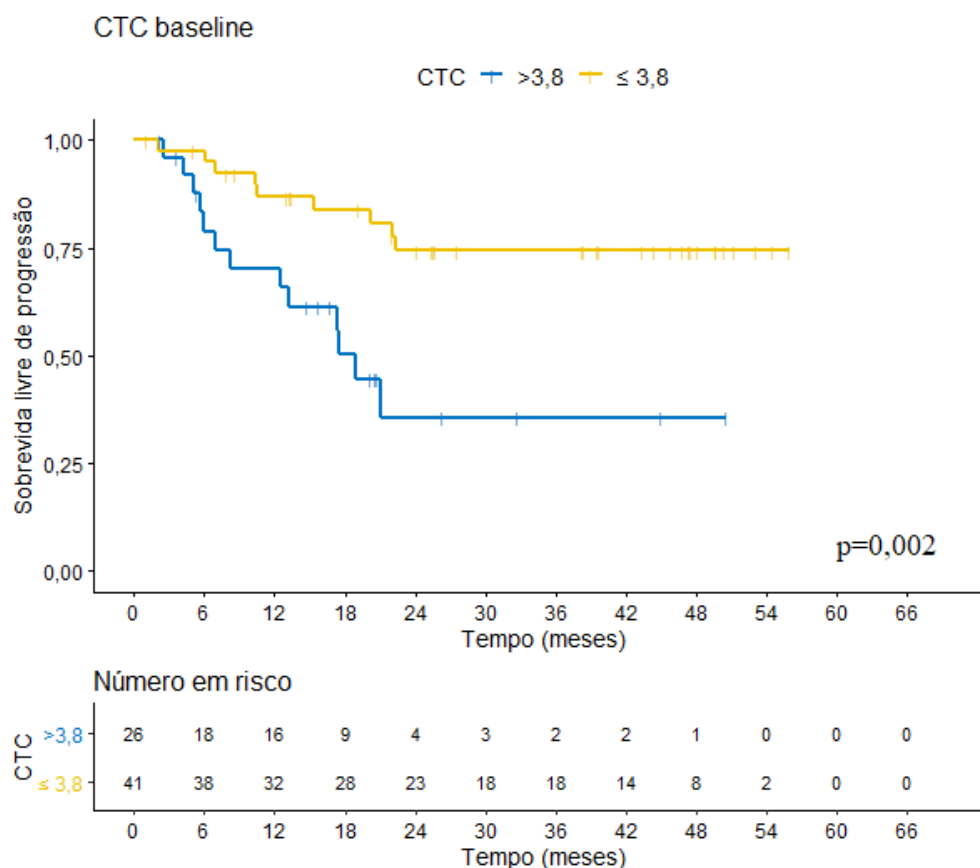


Figura 21 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida livre de progressão, considerando ponto de corte de 3,8 CTCs/mL, apenas na população submetida a tratamento definitivo (n=67).

Na análise multivariada de SG, o ponto de corte de 6,5 CTCs/mL se mostrou um fator prognóstico independente significativo tanto no modelo inicial (HR=0,19; IC95%: 0,05-0,68; p=0,011) quanto no modelo final (HR=0,12; IC95%: 0,04-0,36; p<0,001). Analisando o ponto de corte de 2,8 CTCs/mL para SG, não houve significância estatística no modelo inicial da análise multivariada (HR=0,39; IC95%: 0,12-1,31; p=0,132) e, embora tenha sido uma variável selecionada para o modelo final, se manteve sem significância estatística nesta análise (HR=0,33; IC95%: 0,10-1,09; p=0,071). Analisando a SLP, o ponto de corte de 3,8 CTCs/mL foi um fator prognóstico independente significativo no modelo inicial (HR=0,21; IC95%: 0,08-0,53; p=0,001) e no modelo final (HR=0,23; IC95%: 0,09-0,55; p=0,001).

A prevalência de microêmbolos antes do tratamento nesta população submetida a tratamento definitivo foi de 22,3% (15 de 67), semelhante à população

global do estudo, e novamente houve correlação significativa entre a presença de ME e contagens de CTCs mais altas ($p=0,002$). A presença de ME antes do tratamento correlacionou-se significativamente a piores desfechos de sobrevida global e livre de progressão, nesta população. A estimativa de SG em dois anos foi de 82,3% para ME ausente *versus* 48,4% para ME presente (HR=3,01; IC95%: 1,06-8,52; $p=0,029$), com SG mediana não atingida *versus* 23,3 meses respectivamente, e a estimativa de SLP em dois anos foi de 69,1% para ME ausente *versus* 35% para ME presente (HR=3,84; IC95%: 1,62-9,11; $p<0,001$), com SLP mediana não atingida *versus* 12,4 meses respectivamente (Figura 22).

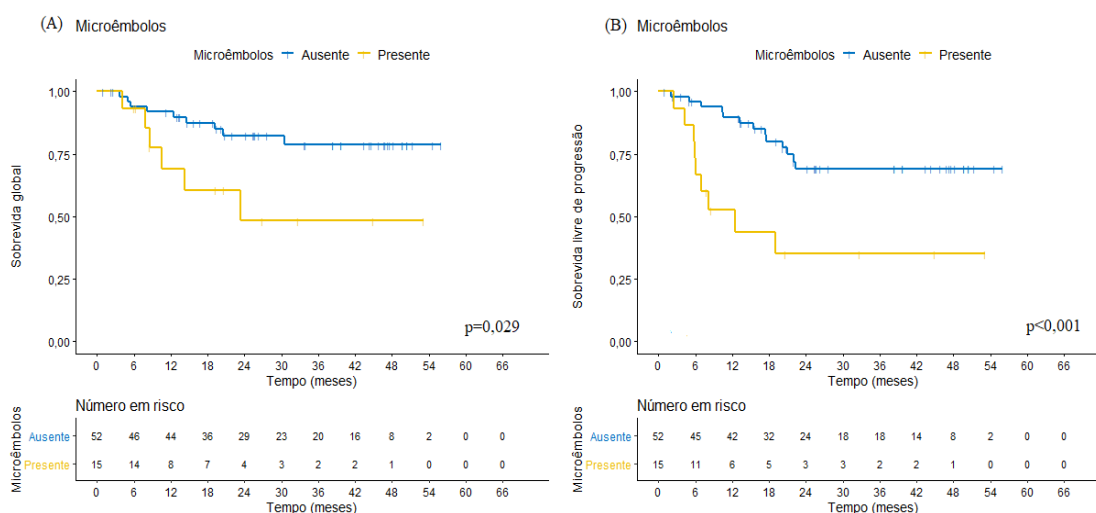


Figura 22 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e livre de progressão (B) de acordo com a presença de microêmbolos antes do tratamento (*baseline*)

Na análise multivariada a presença de ME não correlacionou-se de maneira significativa com a SG no modelo inicial (HR=2,54; IC95%: 0,79-8,15; $p=0,115$), em contrapartida, a presença de ME foi um fator prognóstico independente significativo para SLP, no modelo inicial (HR=4,00; IC95%: 1,58-10,12; $p=0,003$) e no modelo final (HR=3,34; IC95%: 1,40-7,99; $p=0,007$).

Para avaliar o papel preditivo da contagem de CTCs *baseline* em relação a taxa de resposta foram avaliados apenas os pacientes submetidos a tratamento definitivo e que tiveram resposta avaliada ao término da radioterapia (61 pacientes com resposta avaliada dos 67 submetidos a tratamento definitivo). Os motivos para não avaliação de resposta em um subgrupo destes pacientes foram perda de

seguimento (n=3) e interrupção da radioterapia por complicações ou óbito (n=3). Uma vez que estes pacientes foram tratados com uma estratégia não cirúrgica com intuito curativo, foi avaliado a taxa de resposta completa ao tratamento (de acordo com os critérios de RECIST 1.1), que é a resposta desejável nesse contexto, e a contagem de CTCs antes do tratamento. A contagem de CTCs *baseline* correlacionou-se significativamente com resposta completa ao tratamento, com o incremento de 1 CTC antes do tratamento trazendo uma redução relativa da chance de resposta completa de 26% (OR=0.74; IC95%: 0.58-0.95; p=0.022).

Na tentativa de se estabelecer um ponto de corte de contagem de CTCs *baseline* como melhor preditor de resposta completa foi construída uma curva ROC correlacionando as contagens de CTCs e este desfecho (figura 23), com uma área sob a curva (AUC) de 0,675 (IC95%: 0,511-0,837). Analisando a curva ROC chegou-se a um ponto de corte otimizando sensibilidade e especificidade de 3,1 CTCs/mL, porém este ponto não foi um preditor de resposta completa de maneira significativa, com OR=0.48 (IC95%: 0.15-1.15; p=0.212).

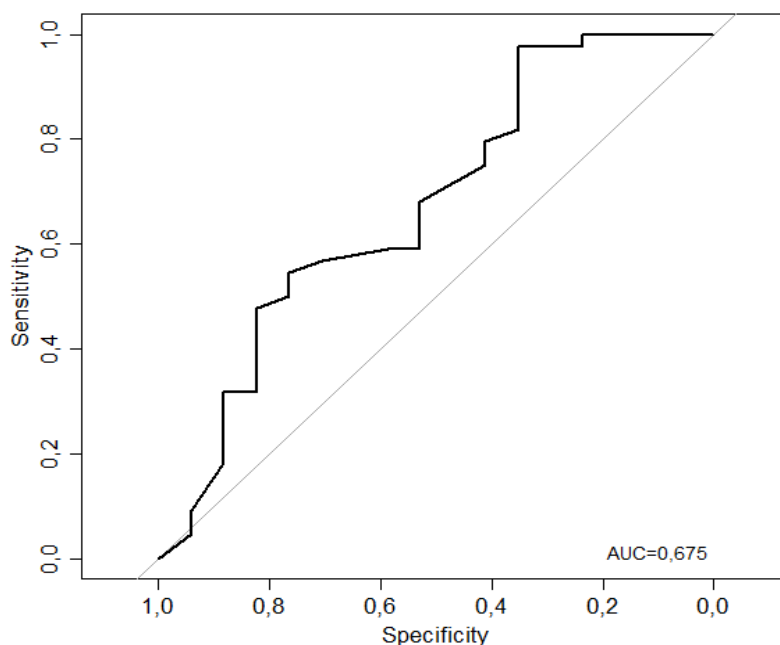


Figura 23 - Curva ROC avaliando sensibilidade e especificidade da contagem de CTCs como preditor de resposta completa ao tratamento. Análise limitada aos pacientes submetidos a tratamento definitivo e com dados de avaliação de resposta disponíveis (n=61).

Para analisar o papel preditor de resposta das CTCs e ME de acordo com a estratégia de tratamento utilizada foram avaliados os pacientes submetidos a quimioterapia de indução seguido de radioterapia, associada a quimioterapia ou cetuximabe (grupo QT indução) *versus* os pacientes que foram tratados inicialmente com radioterapia combinada a quimioterapia ou cetuximabe (grupo RT inicial). Optamos por esta análise tendo em vista o número de pacientes a serem avaliados (33 no braço QT de indução x 34 no braço RT inicial), número este mais adequado do que uma análise de cada subgrupo de tratamento utilizado nos pacientes do estudo.

Comparando as características clínicas e demográficas dos pacientes submetidos a QT indução seguido de RT *versus* aqueles tratados com RT inicial, pode-se observar que os pacientes tratados com indução eram mais jovens (média de idade de 56,2 *versus* 64,8; $p=0,001$), tinham menor carga tabágica em anos/maço (média de 26,1 *versus* 43,2; $p=0,033$), apresentavam doença linfonodal mais avançada ($p<0,001$), especialmente com maior proporção de pacientes com doença N2c e N3 *versus* $\leq$ N2b ($p<0,001$) e tinham estadiamento pela AJCC mais avançado ($p<0,001$). Não houve diferença entre as populações em relação ao sexo, sítio primário, *status* de p16 ou estágio T. Tabelas detalhando a relação entre as características clínicas e demográficas e o uso ou não de quimioterapia de indução podem ser observadas no Apêndice 4.

Apesar das diferenças entre algumas características clínicas entre os grupos, não houve diferença significativa em SG, com estimativa em dois anos de 83,6% *versus* 68,6% para QT indução ou RT inicial respectivamente (HR=0,50; IC95%: 0,17-1,47; $p=0,204$), ou em SLP, com estimativa em dois anos de 59% *versus* 62,7% para QT indução ou RT inicial respectivamente (HR=1,21; IC95%: 0,52-2,80; $p=0,655$), conforme pode ser observado na figura 24. Na análise multivariada persiste a ausência de diferença significativa em SG (HR=1,68; IC95%: 0,42-6,76; $p=0,460$) ou SLP (HR=2,05; IC95%: 0,75-5,56; $p=0,158$) no modelo inicial, entre os pacientes que receberam ou não QT de indução.

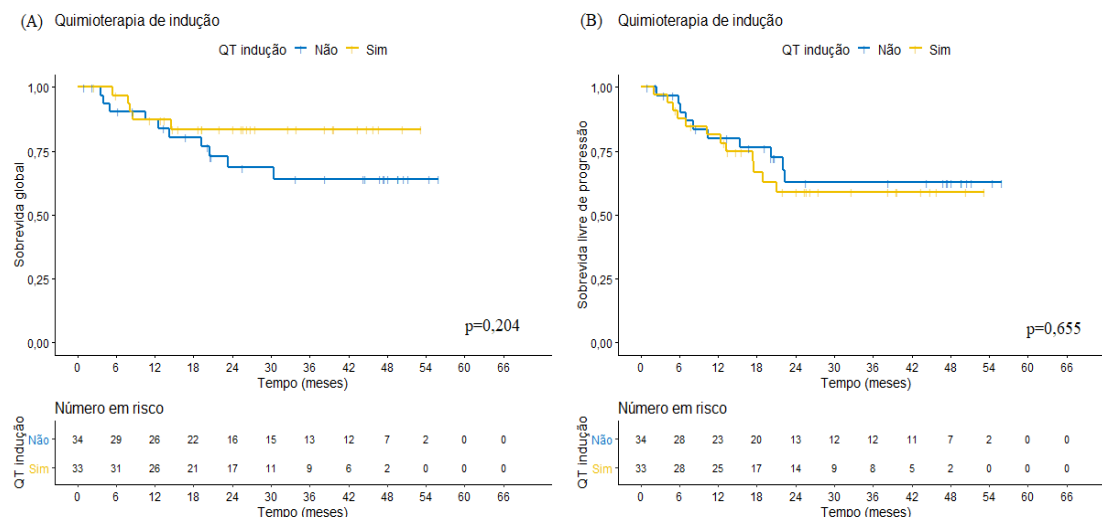


Figura 24 - Curvas de Kaplan Meier de sobrevida global (A) e livre de progressão (B) comparando os pacientes submetidos ou não a quimioterapia de indução.

Para avaliar o potencial papel preditor de desfechos da contagem de CTCs *baseline* de acordo com a estratégia de tratamento, avaliamos o subgrupo de pacientes com CTCs acima dos pontos de corte estabelecidos (2,8 e 3,8 CTCs/mL) e os desfechos de sobrevida de acordo com a realização ou não de QT de indução. Em relação a SG, avaliando pacientes com CTCs *baseline* acima de 2,8/mL, não houve diferença entre os que realizaram QT indução *versus* RT inicial (HR=0,61; IC95%: 0,17-2,08; p=0,426), entretanto houve uma diferença numérica na estimativa de SG em dois anos, com 74,8% para quem recebeu QT indução *versus* 58,9% para os que fizeram RT inicial. Analisando o ponto de corte de 3,8 CTCs/mL, esta diferença numérica fica mais evidente, com estimativa de SG em dois anos de 79% *versus* 30% respectivamente para QT de indução ou não, porém ainda sem diferença significativa (HR=0,32; IC95%: 0,07-1,38; p=0,112), conforme demonstrado na Figura 25.

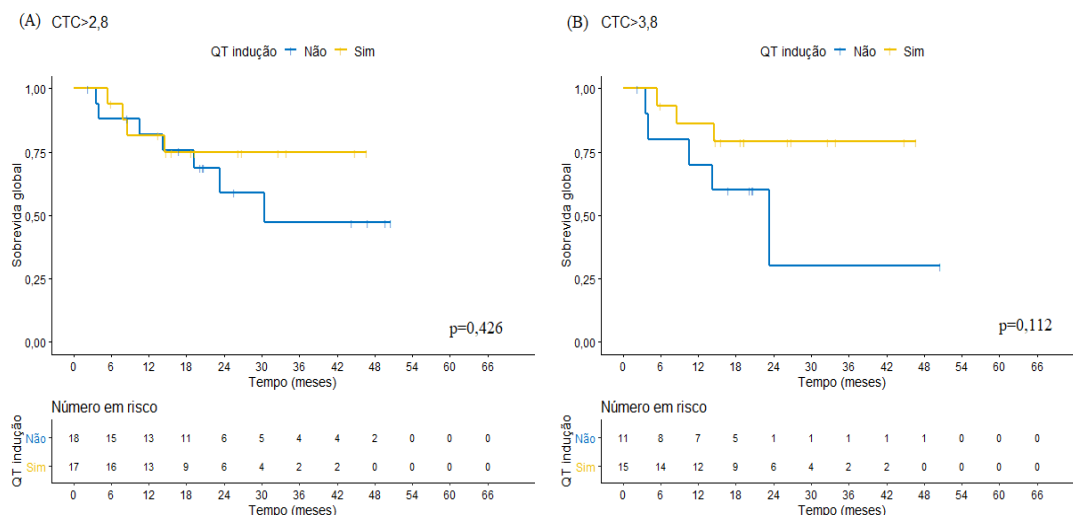


Figura 25 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global, demonstrando o uso de quimioterapia de indução ou não em pacientes com CTCs baseline acima de 2,8/mL (A) e acima de 3,8/mL (B).

Na análise multivariada, o emprego de QT de indução permaneceu sem impacto significativo na SG no modelo inicial, tanto em pacientes com CTCs > 2,8/mL (HR=0,27; IC95%: 0,03-1,96; p=0,195), quanto em pacientes com CTCs > 3,8/mL (HR=0,88; IC95%: 0,08-9,75; p=0,921).

Avaliando os pacientes com CTCs abaixo de 2,8/mL e 3,8/mL essas diferenças numéricas na estimativa de SG em dois anos, comparando os que receberam QT indução *versus* RT inicial, ficam menos evidentes. Nos pacientes com CTCs *baseline* $\leq 2,8$ /mL a estimativa de SG em dois anos foi de 93,3% para os que receberam QT de indução *versus* 78,3% para os que não receberam (HR=0,314; IC95%: 0,03-3,02; p=0,290), e nos pacientes com CTCs *baseline* $\leq 3,8$ /mL a SG em dois anos foi de 88,2% para os que fizeram QT indução *versus* 79,8% para os que não fizeram (HR=0,55; IC95%: 0,10-2,84; p=0,470), conforme Figura 26.

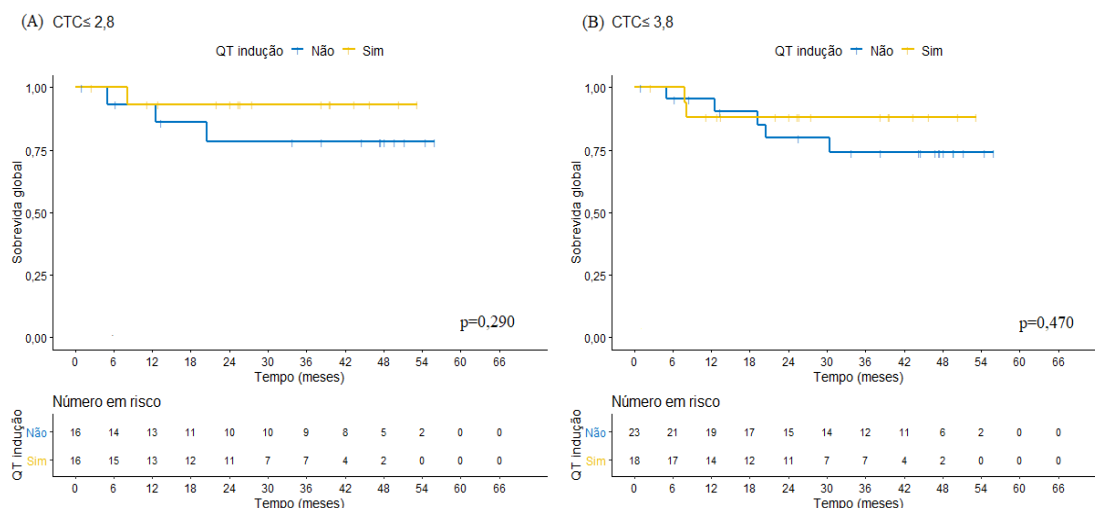


Figura 26 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global, demonstrando o uso de quimioterapia de indução ou não em pacientes com CTCs $\leq 2,8/\text{mL}$ (A) e $\leq 3,8/\text{mL}$ (B).

A Figura 27 representa as curvas de SG correlacionando o uso ou não de quimioterapia de indução e o valor quantitativo de CTCs/mL *baseline*, levando em consideração o ponto de corte de 3,8 CTCs/mL. Analisando os quatros braços, os pacientes com CTCs *baseline* acima de 3,8/mL e que não receberam QT de indução tiveram pior SG, significativa em relação aos pacientes com CTCs $\leq 3,8/\text{mL}$ que receberam indução (HR=0,17; IC95%: 0,03-0,90; p=0,037), e não significativa em relação aos pacientes com CTCs *baseline* $> 3,8/\text{mL}$ que receberam indução (HR=0,33; IC95%: 0,08-1,41; p=0,136) e $\leq 3,8/\text{mL}$ que não receberam indução (HR=0,31; IC95%: 0,09-1,12; p=0,074).

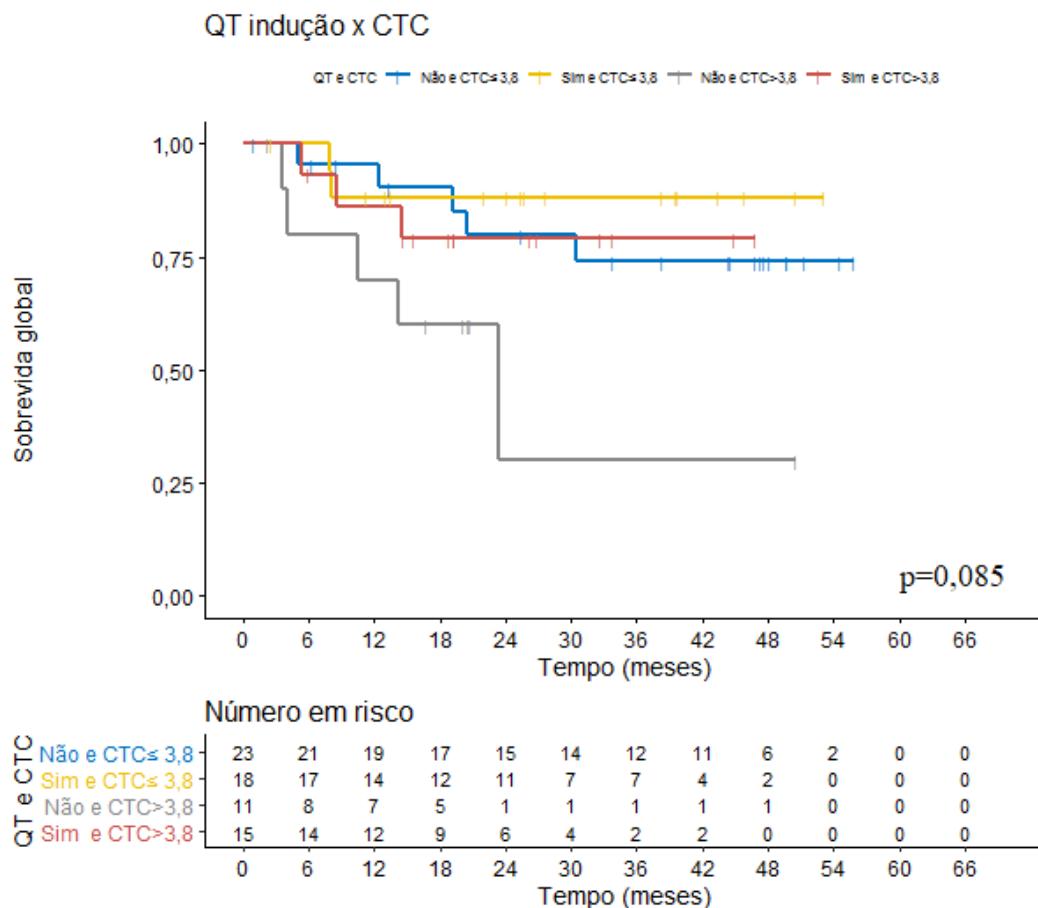


Figura 27 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global correlacionando a contagem de CTCs *baseline* ($\leq$ ou $> 3,8$ /mL) e a realização ou não de QT de indução

Quando analisamos o desfecho de SLP, não houve diferença entre o emprego de QT de indução ou não, na população com CTCs acima de 2,8/mL (HR=2,21; IC95%: 0,73-6,66; $p=0,158$) ou acima de 3,8/mL (HR=1,29; IC95%: 0,39-4,23; $p=0,673$). O mesmo foi observado na população com CTCs *baseline* $\leq 2,8$ CTCs/mL (HR=0,53; IC95%: 0,12-2,24; $p=0,392$) e $\leq 3,8$ CTCs/mL (HR=0,62; IC95%: 0,15-2,49; $p=0,506$).

Analizando o potencial papel preditivo da presença de ME antes do tratamento, de acordo com a estratégia utilizada, analisamos conjuntamente as duas variáveis (presença ou não de ME e emprego ou não de QT indução), em uma curva de Kaplan Meier para SG, que demonstrou diferença significativa entre as curvas ($p=0,020$), conforme figura 28. Essa análise dos 4 braços demonstra pior SG para pacientes que apresentavam ME *baseline* e que não receberam QT de indução, com

significância estatística comparativamente aos pacientes com ME ausentes que receberam QT de indução (HR=0,13; IC95%: 0,02-0,59; p=0,009) e que não receberam QT de indução (HR=0,22; IC95%: 0,06-0,84; p=0,027), e sem significância em relação aos pacientes com ME presentes que realizaram QT de indução (HR=0,29; IC95%: 0,05-1,64; p=0,164).

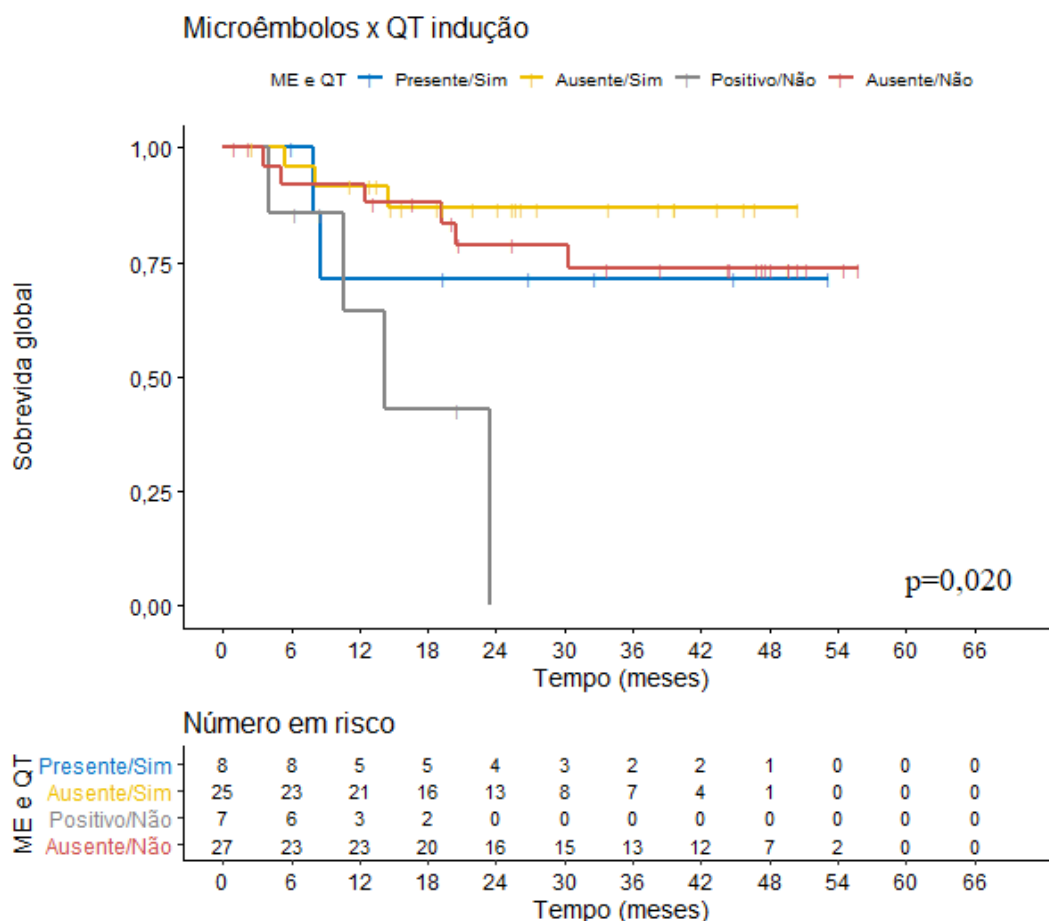


Figura 28 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global correlacionado a presença ou ausência de microêmbolos e a realização ou não de QT de indução.

Analisando o desfecho de SLP, o mesmo pode ser observado, com diferença significativa entre as curvas de sobrevida comparando os 4 braços (p<0,001), conforme figura 29. Os pacientes com ME presentes que não receberam QT de indução apresentaram pior SLP, com diferença significativa em relação aos pacientes sem ME que receberam QT indução (HR=0,15; IC95%: 0,05-0,58; p=0,004) ou não (HR=0,09; IC95%: 0,02-0,35; p<0,001), e sem diferença significativa em relação aos

pacientes com ME presentes que não receberam QT de indução (HR=0,33; IC95%: 0,08-1,30; p=0,116).

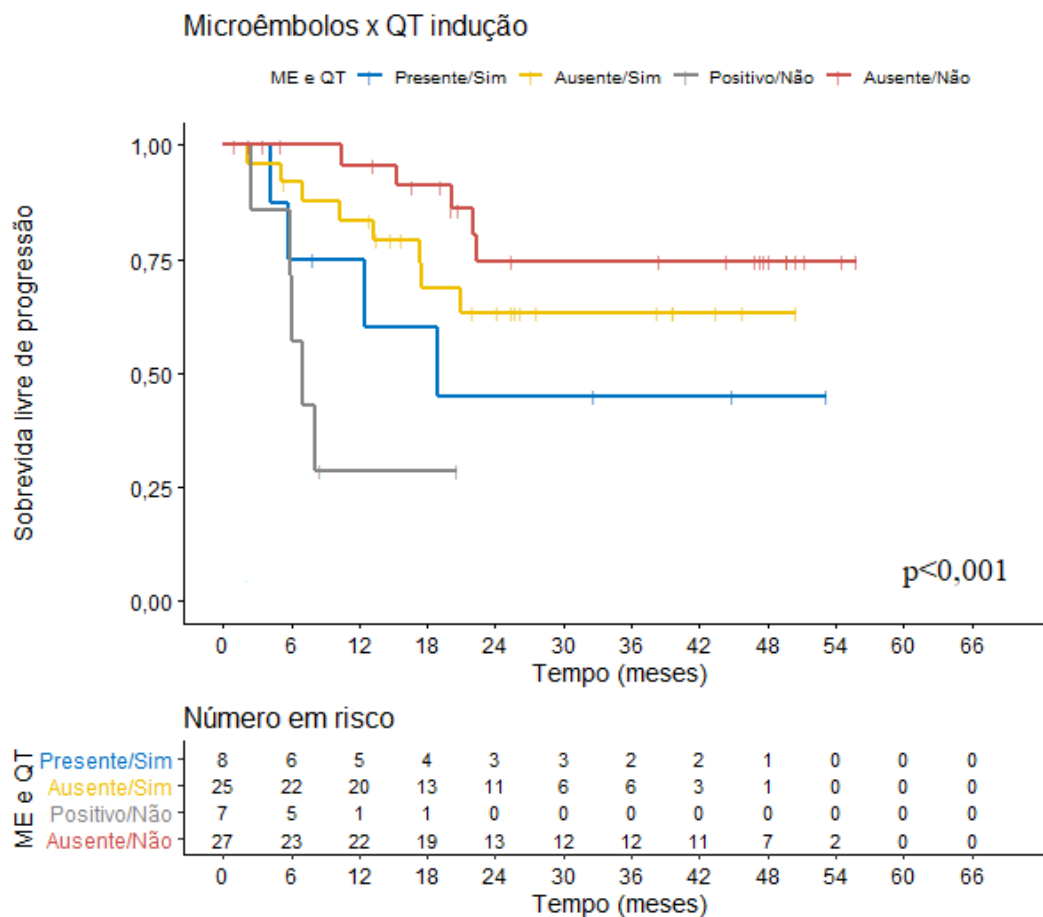


Figura 29 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida livre de progressão correlacionado a presença ou ausência de microêmbolos e a realização ou não de QT de indução.

4.9 POTENCIAL PAPEL PREDITOR DE RESPOSTA AO TRATAMENTO DA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES EM CTCs ANTES DO TRATAMENTO (BASELINE)

Em relação ao potencial papel preditor de resposta da expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em CTCs antes do tratamento, analisamos o impacto da expressão em relação a realização ou não de QT de indução. Avaliando a expressão de β -tubulina III apenas nos pacientes que realizaram QT de indução,

observamos diferença significativa em SG, com estimativa em dois anos de 58,3% para pacientes expressores *versus* 100% para não expressores ($p=0,012$; regressão de Cox não é factível pois não houve nenhum evento no braço BT-3 negativa), conforme Figura 30. Análise multivariada deste resultado não é factível pois não ocorreu nenhum evento no braço β -tubulina III negativo.

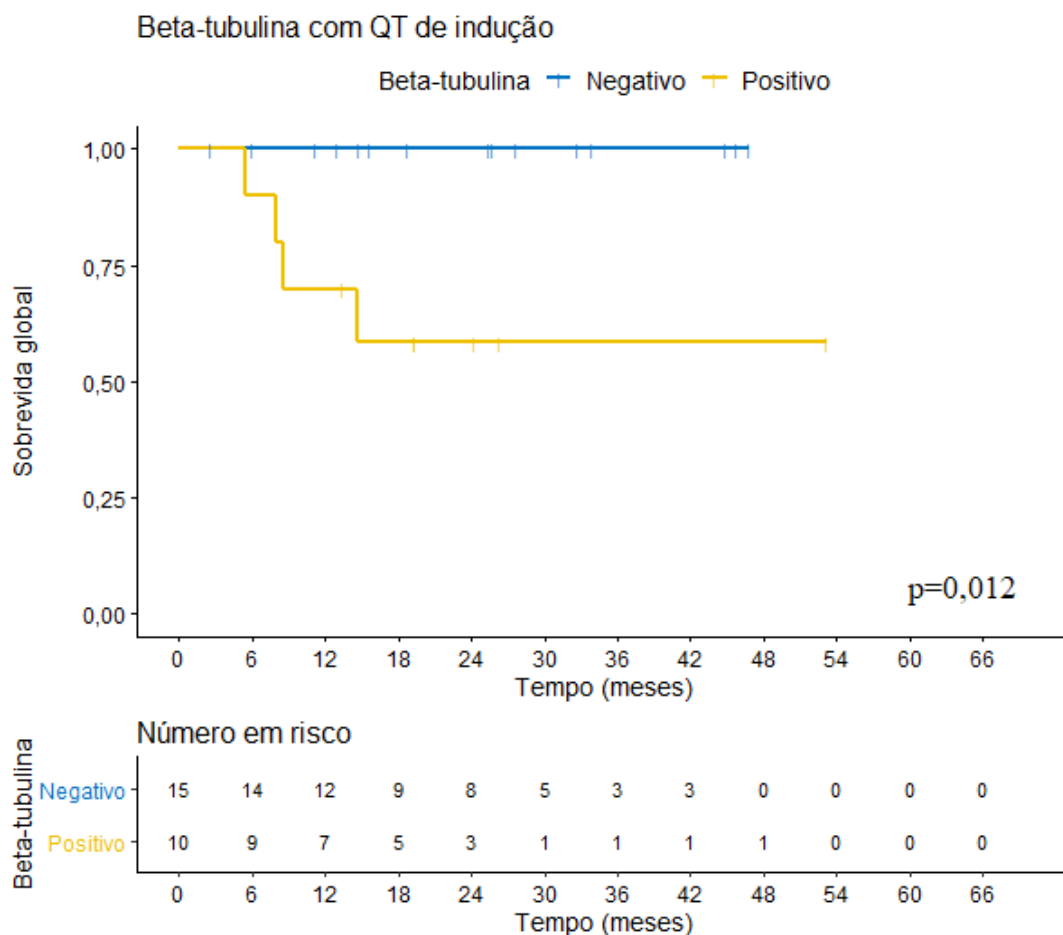


Figura 30 - Curva de Kaplan Meier para sobrevida global dos pacientes submetidos a quimioterapia de indução ($n=33$) de acordo com a expressão de β -tubulina III em CTCs *baseline*.

Quando analisamos apenas os pacientes que não receberam QT de indução não houve diferença em SG de acordo com a expressão de β -tubulina III. Quando avaliamos as 4 curvas, analisando a expressão ou não de β -tubulina III e a realização ou não de QT indução, não há diferença entre as curvas, tanto para SG ($p=0,090$) quanto para SLP ($p=0,540$), conforme Figura 31.

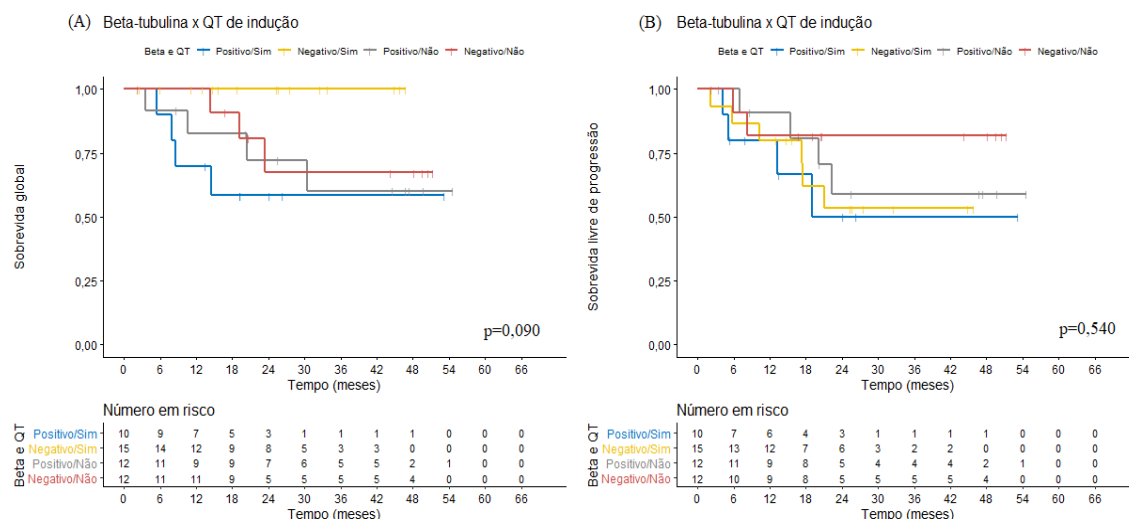


Figura 31 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e livre de progressão (B) correlacionando a expressão de β -tubulina III em CTCs *baseline* e realização ou não de QT de indução.

Em relação a expressão dos outros biomarcadores, não houve correlação entre a realização ou não de QT de indução com desfecho de SG. Portanto, expressão de EGFR ($p=0,503$), ERCC1 ($p=0,371$), MRP-2 ($p=0,334$), MRP-7 ($p=0,642$), TGF- β RI ($p=0,621$) ou MMP2 ($p=0,368$) não foram preditores de benefício da quimioterapia de indução nos pacientes tratados no cenário definitivo.

Também na análise de SLP, não houve impacto significativo da expressão de EGFR ($p=0,540$), ERCC1 ($p=0,271$), MRP-2 ($p=0,227$), MRP-7 ($p=0,865$), TGF- β RI ($p=0,734$) ou MMP2 ($p=0,764$) com benefício da quimioterapia de indução. As curvas de SG e SLP, de acordo com a expressão de biomarcadores em CTCs *baseline* e a realização ou não de QT de indução podem ser observadas no Apêndice 5.

Não foi explorado o potencial papel preditor de desfechos em relação a expressão de biomarcadores em ME antes do tratamento devido ao número limitado de pacientes para esta análise. Como a prevalência de ME positivo nesta população foi de 22,3%, isso corresponde a apenas 15 pacientes, uma amostra extremamente limitada para este tipo de análise.

4.10 TAXA DE DETECÇÃO DE CTCs APÓS O TRATAMENTO E CORRELAÇÃO DA CONTAGEM DE CTCs COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Foram coletadas amostras para análise de CTCs após o tratamento (após o término da radioterapia) em 65 dos 83 pacientes (78,3%). As razões para a não realização da coleta nos 18 pacientes restantes foram perda de seguimento em 5 pacientes, óbito por complicações relacionadas ao tratamento ou ao câncer em 5 pacientes e recusa do paciente ou outros motivos em 8 pacientes.

Foram caracterizadas CTCs em 57 das 65 amostras, perfazendo uma taxa de detecção de 87,6% após o tratamento. O número mediano de CTCs neste segundo momento foi de 2,8 CTCs/ml (desvio padrão: 3,9), variando de 0 a 27,3. Ao avaliarmos apenas os pacientes submetidos a tratamento adjuvante, ou seja, sem doença macroscópica *in loco* desde o início de tratamento, foram analisadas amostras de 12 dos 16 pacientes. Neste subgrupo foram caracterizadas CTCs em 8 das 12 amostras, com uma taxa de detecção de 66,6%. Já no subgrupo de pacientes em tratamento definitivo, foram analisadas amostras de 53 dos 67 pacientes, sendo detectadas CTCs em 49 pacientes, uma taxa de detecção neste cenário de tratamento de 85,9%.

Analisando a correlação entre contagens de CTCs após o tratamento e as características clínicas dos pacientes, não houve relação entre o valor médio quantitativo de CTCs e gênero, sítio primário, *status* p16, tabagismo, estágio T, estágio N ou estágio pela AJCC. Também não houve diferença entre contagens médias de CTCs após o tratamento e cenário de tratamento (adjuvante ou definitivo), estratégia de tratamento definitivo realizada (QT indução ou RT inicial) ou resposta ao tratamento definitivo (resposta completa x resposta parcial, doença estável ou progressão de doença). A correlação entre as contagens de CTCs e estas variáveis pode ser observada na Tabela 16.

Tabela 16 - Relação entre médias de contagens de CTCs após o tratamento e características clínicas dos pacientes.

Característica	Média de CTCs/ml após tratamento (DP)	Variação	p
Idade			
> 70 anos	2,7 (1,9)	0-6,6	0,231
≤ 70 anos	2,8 (4,3)	0-27,3	
Gênero			
Masculino	2,8 (4,1)	0-27,3	0,895
Feminino	2,8 (3,2)	0-11,6	
Sítio Primário			
Orofaringe	2,7 (4,6)	0-27,3	0,635
Não orofaringe	2,9 (3,1)	0-11,6	
Status p16			
Positivo	1,6 (1,8)	0-6,6	0,077
Negativo / Desconhecido	3,7 (6,1)	0-27,3	
Tabagismo			
≥ 10 nos/maço	2,8 (4,3)	0-27,3	0,879
< 10 anos/maço	2,6 (2,8)	0-10,5	
Estágio T			
T0, T1 ou T2	2,2 (2,5)	0-10,5	0,527
T3 ou T4	3,0 (4,5)	0-27,3	
Estágio N			
N0 ou N1	2,4 (2,0)	0-6,6	0,817
N2 ou N3	3,0 (4,6)	0-27,3	
Estágio N			
N0, N1, N2a ou N2b	2,4 (2,6)	0-11,6	0,702
N2c ou N3	3,3 (5,4)	0-27,3	
AJCC			
III	2,1 (1,8)	0-5,5	0,895
IVA	3,3 (5,0)	0-27,3	
IVB	2,1 (2,1)	0-6,75	
Cenário de tratamento			
Adjuvante	3,4 (4,3)	0-11,6	0,866
Definitivo	2,6 (3,9)	0-27,3	
Estratégia definitiva			
QT Indução	2,7 (5,3)	0-27,3	0,220
RT Inicial	2,8 (2,8)	0-11,6	
Resposta ao tratamento			
RC	2,7 (4,4)	0-27,3	0,486
RP / DE / PD	2,4 (1,8)	0,25-6,75	

4.11 IMPACTO PROGNÓSTICO DA CONTAGEM DE CTCs APÓS O TRATAMENTO

Analiando a contagem de CTCs como uma variável contínua, não houve impacto significativo da contagem de CTCs após o tratamento em SG (HR=1,07; IC95%: 0,98-1,16; p=0,100) ou em SLP (HR=1,01; IC95%: 0,92-1,10; p=0,804). A ausência de significância estatística foi mantida no modelo inicial da análise multivariada, tanto para SG (HR=1,06; IC95%: 0,96-1,17; p=0,219) quanto para SLP (HR=1,00; IC95%: 0,91-1,09; p=0,918).

Analizando pontos de corte através do método de Lausen e Schumacher para SG, foi evidenciado o valor de 6,6 CTCs/mL como ponto de corte ideal prognóstico do desfecho de SG. Analisando o gráfico pode-se observar que, excluindo esse extremo de valor, o segundo ponto de corte ideal se situa ao redor de 1 CTC/mL, conforme demonstrado na figura 32A.

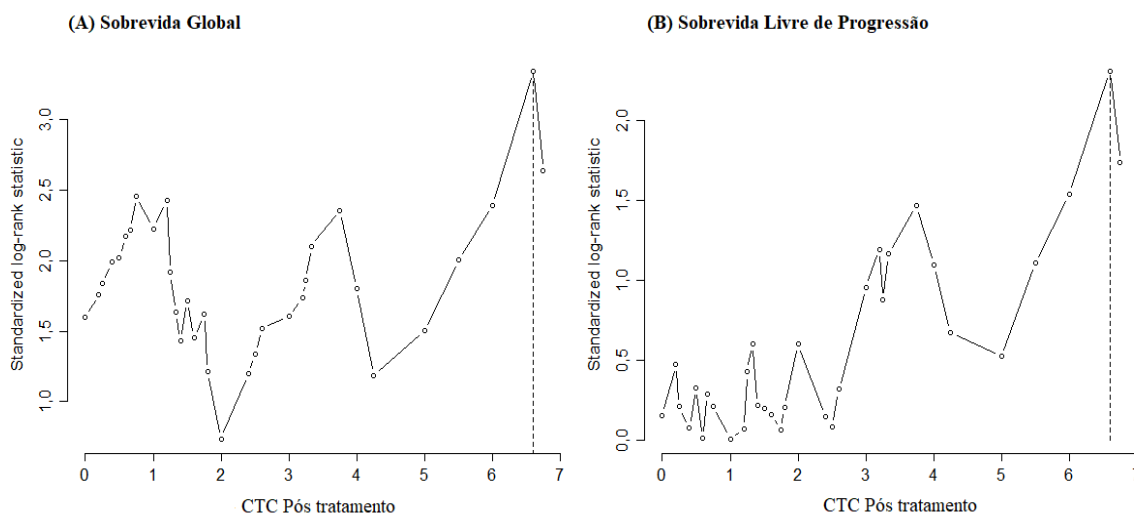


Figura 32 - Análise de pontos de corte de CTCs após o tratamento e risco de óbito. (A) e progressão (B). Ponto de corte ideal de 6,6 CTCs/mL para SG (A) e SLP (B).

Utilizando o ponto de corte de 6,6 CTCs/mL houve impacto significativo na SG, com estimativa em dois anos de 30% e mediana de 24,8 meses para pacientes com CTCs após o tratamento > 6,6/mL *versus* SG em dois anos de 86,2% com

mediana não atingida nos pacientes com CTCs $\leq 6,6$ /mL (HR=0,12; IC95%: 0,03-0,40; $p<0,001$), conforme Figura 33.

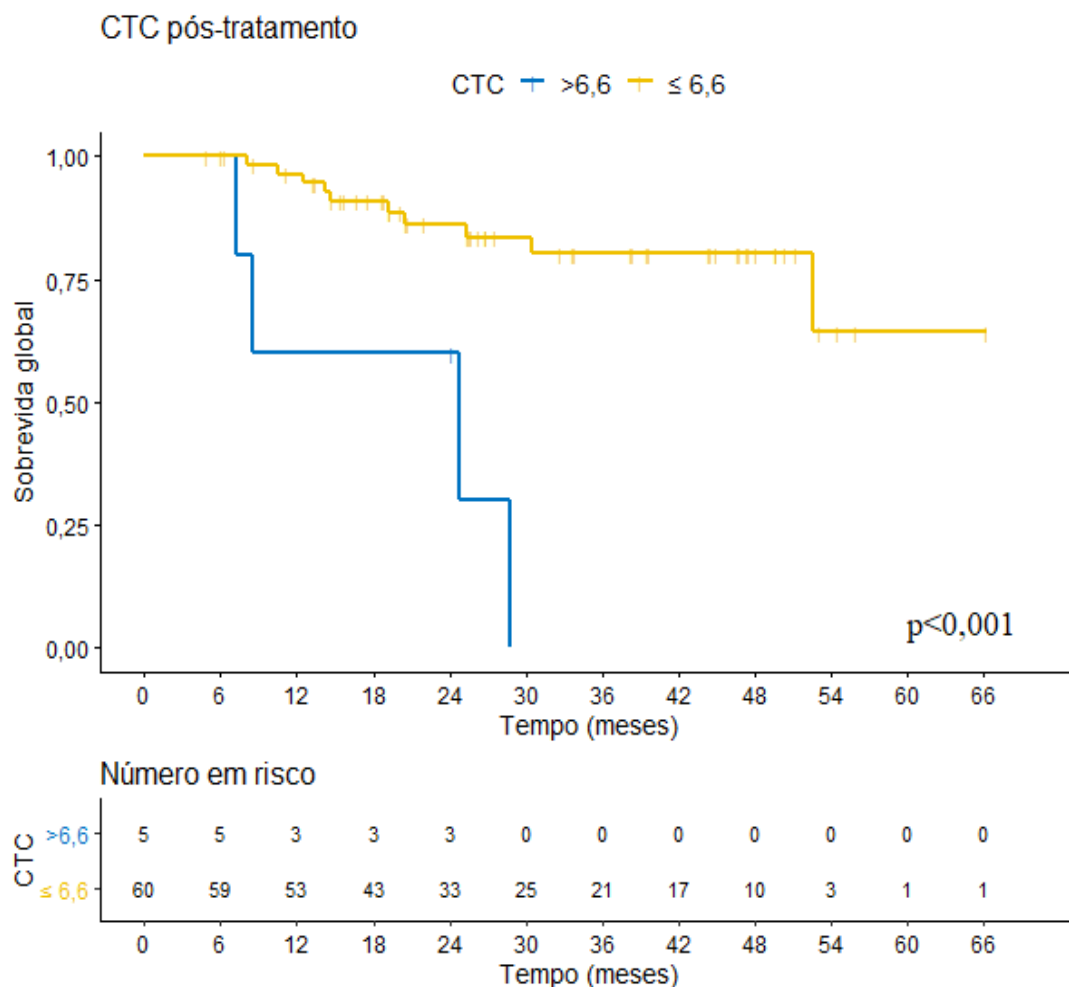


Figura 33 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global, considerando ponto de corte de 6,6 CTCs/mL após o tratamento.

Utilizando o ponto de corte de 1 CTC/mL houve também diferença significativa na SG, com estimativa em dois anos de 78,3% para pacientes com CTCs após o tratamento > 1 /mL *versus* SG em 2 anos de 100% nos pacientes com CTCs ≤ 1 /mL ($p=0,015$; não é possível regressão de Cox pois não há nenhum evento no grupo CTCs ≤ 1 /mL), conforme Figura 34.

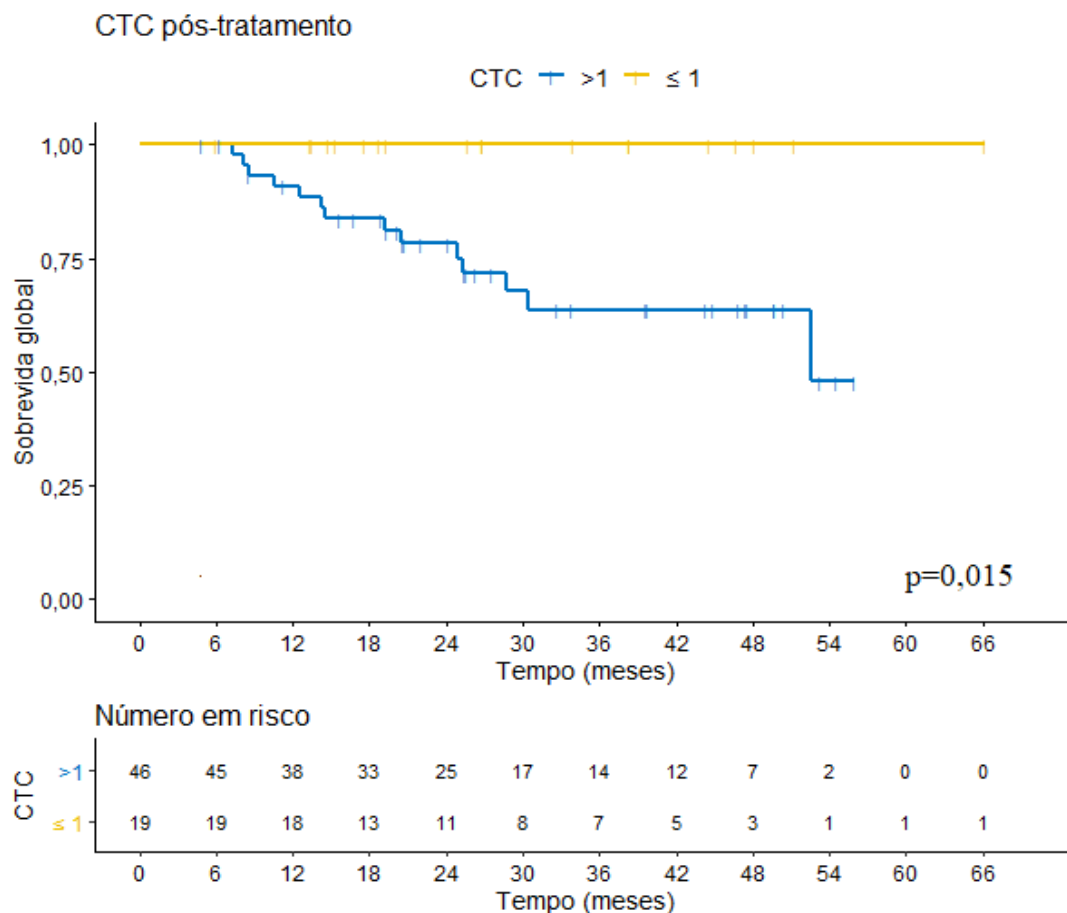


Figura 34 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global, considerando ponto de corte de 1 CTC/mL após o tratamento.

Aplicando o método de Lausen e Schumacher para SLP, observamos também o valor de 6,6 CTCs/mL como ponto de corte ideal como prognóstico do desfecho de SLP. Ao contrário da análise para SG, neste caso se excluirmos este valor extremo não encontramos outros pontos de corte adequados, conforme demonstrado na figura 32B. O segundo ponto de corte ideal excluindo o extremo de valor de 6,6 CTCs/mL se situaria ao redor de 3,8 CTCs/mL, porém com uma razão de risco de cerca de 1,5, que não se traduziria em diferença significativa no desfecho entre os grupos.

Analisando este ponto de corte, observamos impacto significativo na SLP, com estimativa em dois anos de 20% e mediana de 9,2 meses nos pacientes com CTCs > 6,6/mL após o tratamento *versus* SLP em 2 anos de 62,3% e mediana não atingida nos pacientes com CTCs ≤ 6,6/mL (HR=0,19; IC95%: 0,06-0,59; p=0,001), conforme Figura 35.

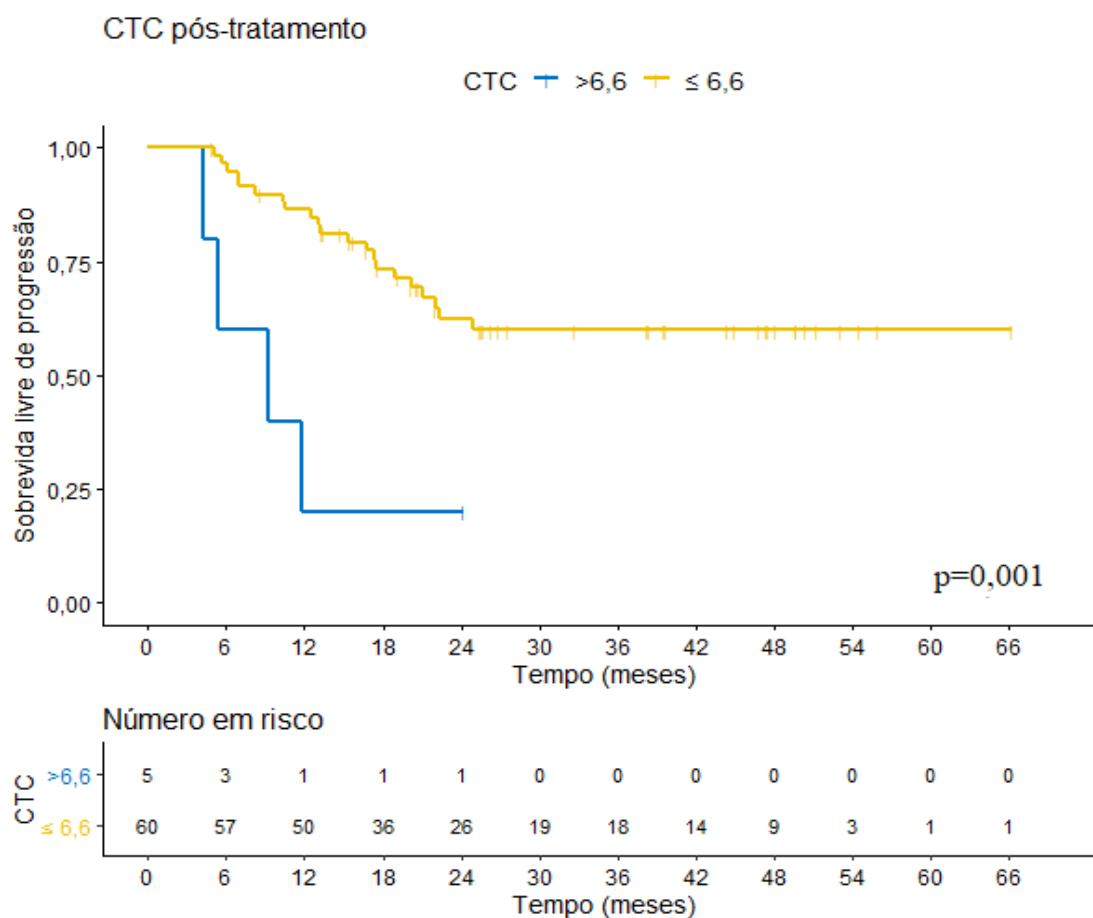


Figura 35 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida livre de progressão, considerando ponto de corte de 6,6 CTCs/mL após o tratamento.

Na análise multivariada para SG, o ponto de corte de 6,6 CTCs/mL foi um fator prognóstico independente significativo no modelo inicial (HR=0,11; IC95%: 0,02-0,56; p=0,008) e no modelo final (HR=0,08; IC95%: 0,02-0,37; p=0,001). Não foi possível realização da análise multivariada levando em consideração o ponto de corte de 1 CTC/mL pois nenhum evento ocorreu no grupo $CTC \leq 1/mL$. Em relação a SLP, o ponto de corte de 6,6 CTCs/mL também foi um fator prognóstico independente significativo no modelo inicial (HR=0,22; IC95%: 0,06-0,75; p=0,016) e no modelo final (HR=0,25; IC95%: 0,08-0,77; p=0,015).

4.12 IMPACTO PROGNÓSTICO DA PRESENÇA DE MICROÊMBOLS APÓS O TRATAMENTO

A prevalência de ME após o tratamento foi de 20% (13 de 65 pacientes analisados). Não houve diferença significativa em SG, comparando pacientes com presença ou ausência de ME após o tratamento (HR=2,25; IC95%: 0,69-7,32; $p=0,177$). Analisando o desfecho de SLP, também não houve impacto significativo da presença de ME após o tratamento (HR=0,89; IC95%: 0,30-2,61; $p=0,841$). As curvas de SG e SLP podem ser observadas na Figura 36.

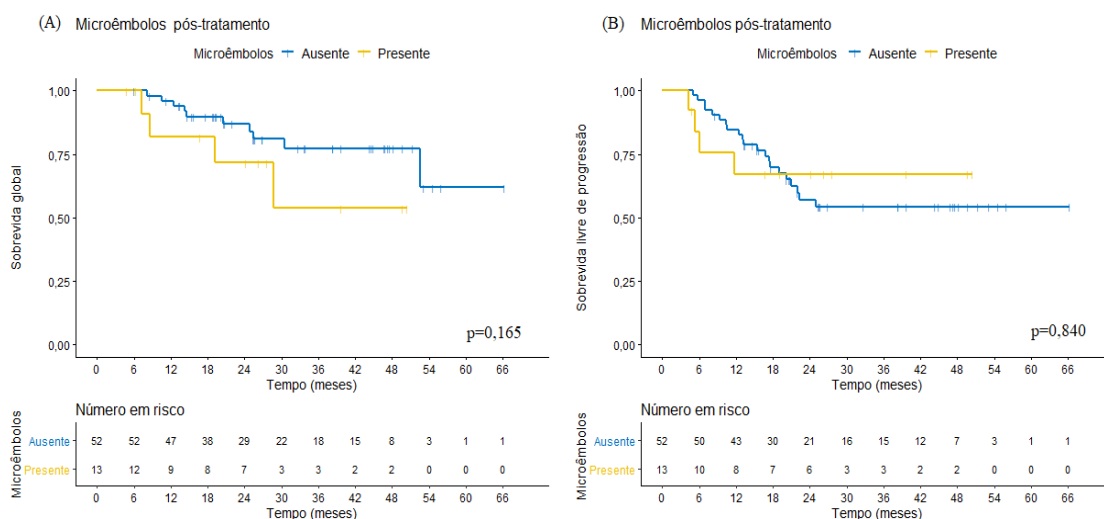


Figura 36 - Curvas de Kaplan Meier de sobrevida global (A) e sobrevida livre de progressão (B), de acordo com a presença ou ausência de microêmbolos após o tratamento.

Na análise multivariada a presença de ME após o tratamento continuou sem significância estatística no modelo inicial, para SG (HR=2,00; IC95%: 0,59-6,74; $p=0,262$) e para SLP (HR=0,77; IC95%: 0,26-2,27; $p=0,645$).

4.13 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES POR IMUNOCITOQUÍMICA NAS CTCs APÓS O TRATAMENTO

Foi analisada a expressão por ICC dos biomarcadores nas CTCs também após o tratamento e sua correlação com desfechos de sobrevida. Novamente, nem todos os pacientes que apresentavam CTCs detectáveis após o tratamento foram testados para todos os biomarcadores, pela necessidade de um número suficiente de CTCs para realização de todos os testes e de *spots* para leitura de CTCs. Por estes motivos o número de pacientes testados variou de 32 a 41.

A Tabela 17 sumariza os resultados em relação a SG, mostrando quantos pacientes tiveram as CTCs testadas para cada um destes biomarcadores, a taxa de positividade e sua correlação com o desfecho de SG.

Tabela 17 - Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em CTCs após o tratamento e sobrevida global

Biomarcador	n Testado	n (%)	SG Mediana (meses)	SG 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
EGFR	41					
Positivo		32 (78)	NA	76	*	0,109
Negativo		9 (22)	NA	100		
ERCC1	41					
Positivo		16 (39)	NA	78	0,96 (0,27-3,45)	0,960
Negativo		25 (61)	NA	82,6		
β-tubulina III	37					
Positivo		19 (51,3)	NA	88,1	0,79 (0,23-2,78)	0,724
Negativo		18 (48,7)	NA	70,2		
MRP-2	39					
Positivo		16 (41)	NA	64,2	3,20 (0,79-12,82)	0,083
Negativo		21 (59)	NA	95		
MRP-7	32					
Positivo		16 (50)	52,5	75	0,57 (0,15-2,21)	0,419
Negativo		16 (50)	28,7	75		
TGFβRI	39					
Positivo		10 (25,6)	28,7	51,4	3,60 (1,03-12,59)	0,032
Negativo		29 (74,4)	NA	84,4		
MMP2	41					
Positivo		27 (65,9)	NA	83,8	0,88 (0,24-3,13)	0,845
Negativo		14 (34,1)	NA	75,7		

* Regressão de Cox não é factível pois não ocorreu nenhum evento no braço EGFR negativo.

NA: não alcançada

Conforme observado na tabela, o único biomarcador que se correlacionou com o desfecho de SG foi o TGF- β RI, com pacientes com expressão em CTCs após o tratamento apresentando uma estimativa de SG em dois anos de 51,4% e mediana de 28,3 meses *versus* 84,4% e mediana não atingida nos pacientes sem expressão de TGF- β RI (HR=3,60; IC95%: 1,03-12,59; p=0,032), conforme Figura 37.

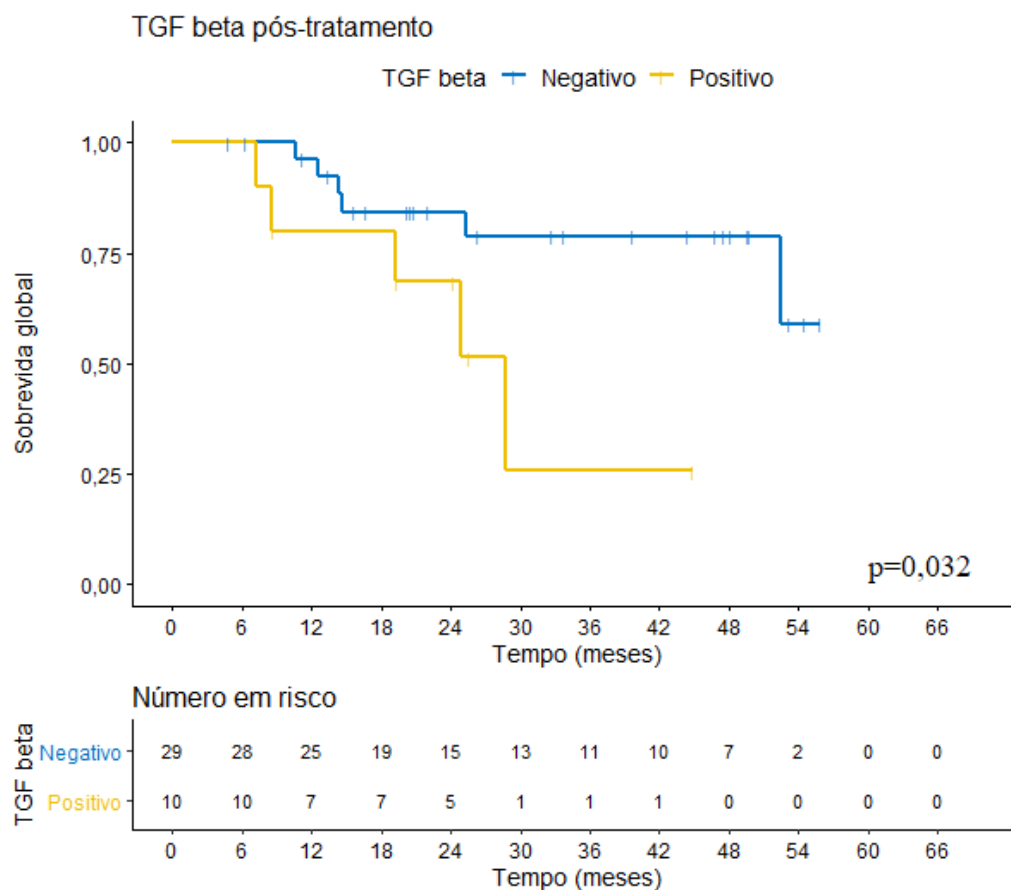


Figura 37 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global de pacientes com ou sem expressão de TGF- β RI em CTCs após o tratamento.

Na análise multivariada a expressão de TGF- β RI em CTCs após o tratamento não apresentou significância estatística como fator prognóstico independente de SG no modelo inicial (HR=2,67; IC95%: 0,58-12,18; p=0,204).

A Tabela 18 sumariza os resultados correlacionando a expressão dos biomarcadores e SLP. Neste cenário não houve correlação significativa entre a expressão de nenhum biomarcador em CTCs após o tratamento com o desfecho.

Tabela 18 - Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em CTCs após o tratamento e sobrevida livre de progressão

Biomarcador	SLP Mediana (meses)	SLP 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
EGFR				
Positivo	NA	57,8	3,94 (0,51-30,18)	0,152
Negativo	NA	88,9		
ERCC1				
Positivo	NA	60,2	1,19 (0,41-3,44)	0,740
Negativo	NA	66,1		
β-tubulina III				
Positivo	NA	63,3	0,87 (0,28-2,72)	0,820
Negativo	NA	66,7		
MRP-2				
Positivo	15,3	47,7	2,26 (0,78-6,57)	0,121
Negativo	NA	64,3		
MRP-7				
Positivo	NA	62,5	0,54 (0,19-1,49)	0,230
Negativo	16,7	42,9		
TGFβRI				
Positivo	13,2	45,7	2,09 (0,69-6,27)	0,179
Negativo	NA	69,7		
MMP2				
Positivo	NA	66	0,64 (0,23-1,78)	0,396
Negativo	22,3	48,2		

NA: não alcançada

Analisando a expressão de TGF- β RI, apesar da diferença numérica em estimativa de SLP em dois anos, com 45,7% para pacientes expressores de TGF- β RI em CTCs após o tratamento *versus* 69,7% para não expressores, esta diferença não foi significativa (HR=2,09; IC95%: 0,69-6,27; p=0,179) conforme figura 38, permanecendo sem significância na análise multivariada no modelo inicial (HR=1,41; IC95%: 0,35-5,72; p=0,624).

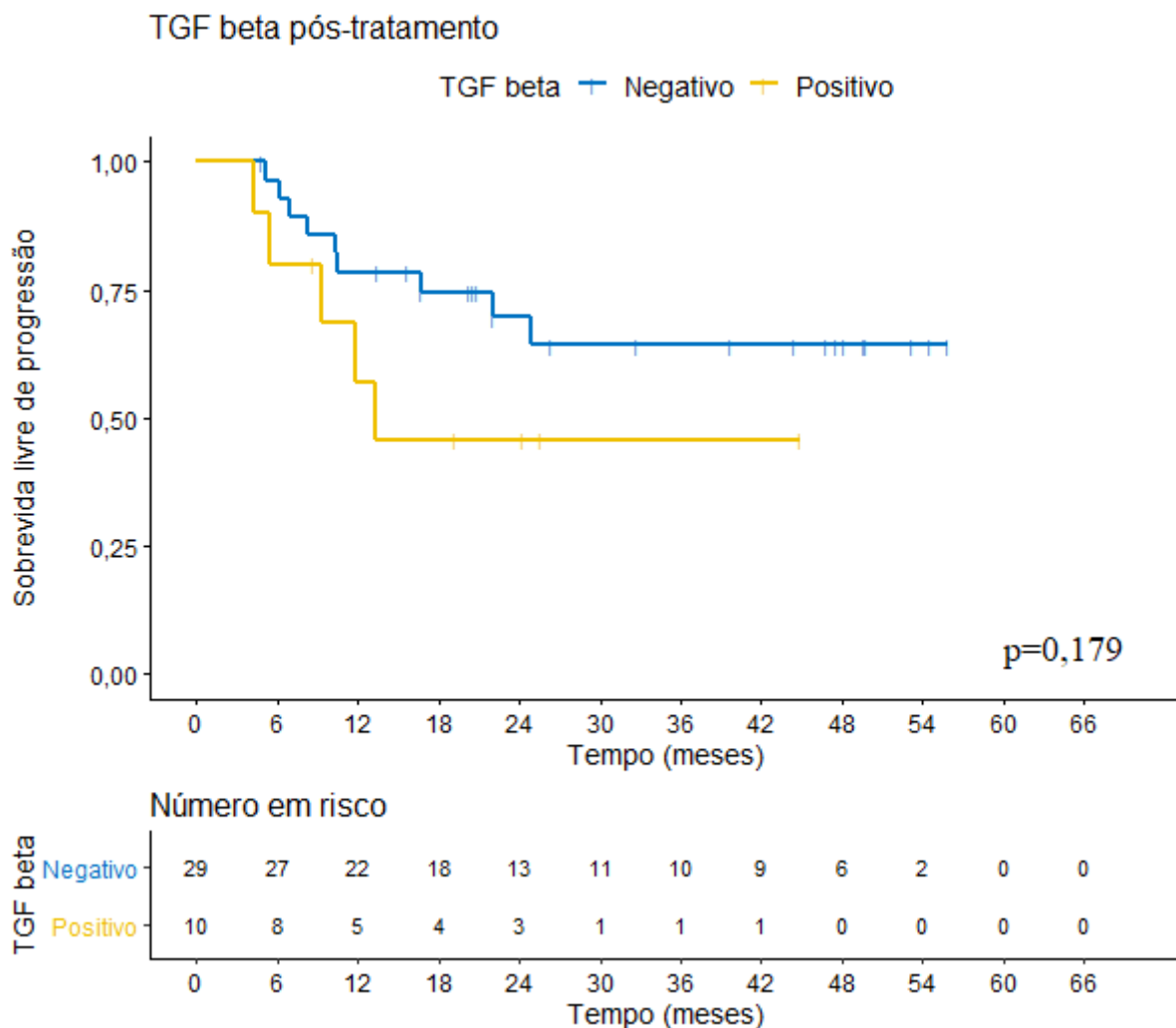


Figura 38: Curvas de Kaplan Meier para sobrevida livre de progressão de pacientes com ou sem expressão de TGF- β RI em CTCs após o tratamento.

Outros biomarcadores que apresentaram separação entre as curvas tanto de SG quanto de SLP, embora sem significância estatística, são o EGFR e o MRP-2. Para o MRP-2 observamos estimativa de SG em dois anos de 95% para não expressores *versus* 55% para expressores (HR=3,20; IC95%: 0,79-12,82; $p=0,083$) e estimativa de SLP em dois anos de 64,3% para não expressores *versus* 47,7% para expressores (HR=2,26; IC95%: 0,78-6,57; $p=0,121$). Na análise multivariada também não houve significância estatística para a expressão de MRP-2 no modelo inicial em SG (HR=3,02; IC95%: 0,80-11,38; $p=0,101$) ou SLP (HR=1,56; IC95%: 0,32-7,48; $p=0,576$).

Já para o EGFR observamos estimativa de SG em dois anos de 100% para não expressores *versus* 71,3% para expressores ($p=0,109$; regressão de Cox não é factível pois não ocorreu nenhum evento no braço EGFR negativo) e estimativa de SLP em dois anos de 88,9% para não expressores *versus* 57,8% para expressores ($HR=3,94$; $IC95\%$: 0,51-30,18; $p=0,152$). A análise multivariada para SG não é factível, pela ausência de eventos no braço EGFR negativo, e para SLP não houve significância no modelo inicial ($HR=5,71$; $IC95\%$: 0,71-73,27; $p=0,100$) e, embora selecionado como um varável para o modelo final, a expressão de EGFR permaneceu sem singnificância estatística ($HR=5,83$; $IC95\%$: 0,75-45,19; $p=0,091$). As curvas de Kaplan Meier para estes marcadores podem ser observadas nas Figuras 39 e 40.

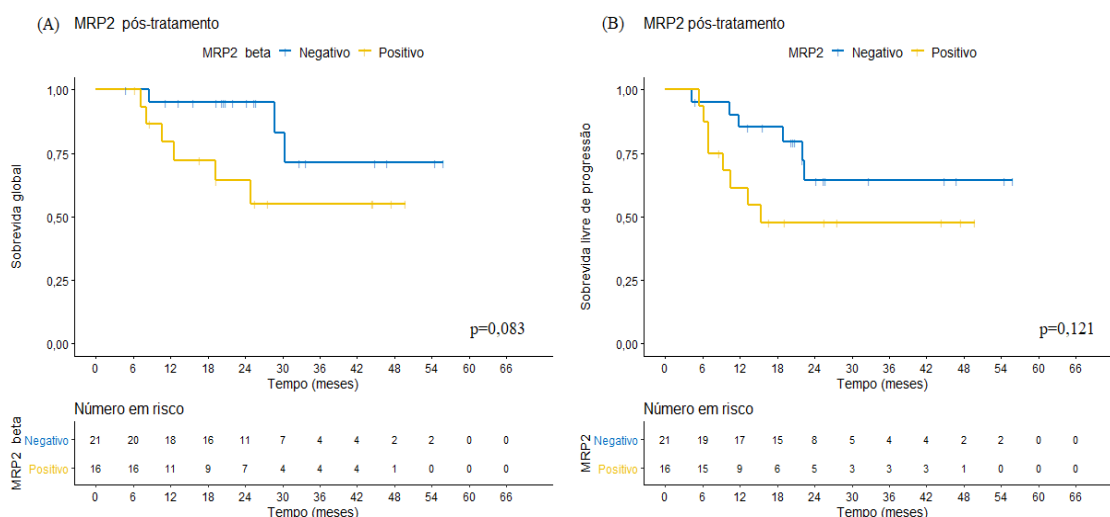


Figura 39 - Curvas de Kaplan Meier de sobrevida global (A) e sobrevida livre de progressão (B), de acordo com a expressão de MRP-2 em CTCs após o tratamento.

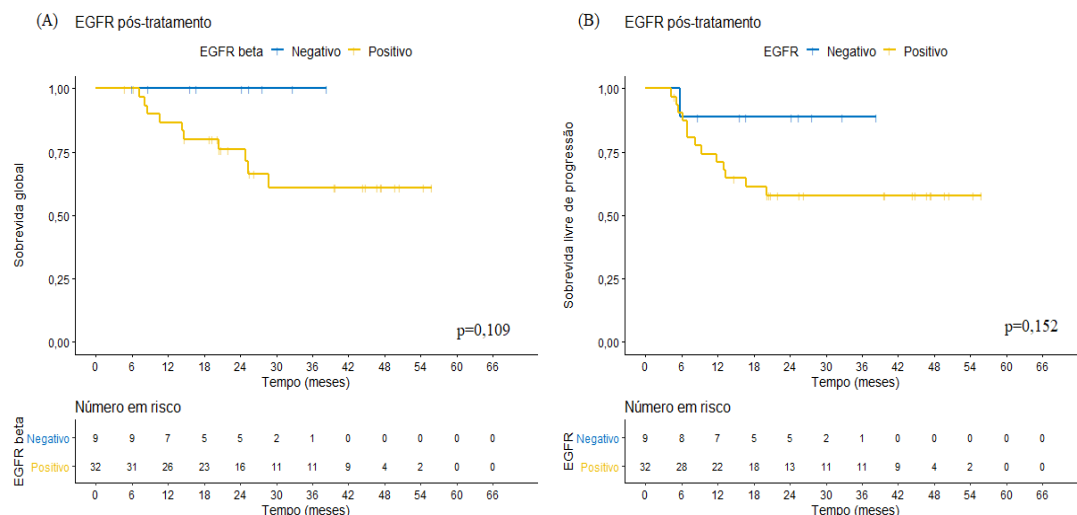


Figura 40 - Curvas de Kaplan Meier de sobrevida global (A) e sobrevida livre de progressão (B), de acordo com a expressão de EGFR em CTCs após o tratamento.

4.14 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES POR IMUNOCITOQUÍMICA EM MICROÊMBOS APÓS O TRATAMENTO

Foi analisado também a presença de expressão de biomarcadores por ICC em ME após o tratamento. Nesta análise foram considerados expressores aqueles que possuíam ME com expressão positiva e negativos os que apresentavam ME sem expressão dos biomarcadores (negativos) e aqueles que não apresentavam ME. Foram excluídos desta análise pacientes que não possuíam *spots* para esta análise. Não são descritos resultados para ERCC1, MMP2, MRP-2 e MRP-7 pois nenhuma amostra foi positiva para estes biomarcadores em ME.

Estas análises novamente ficam limitadas devido ao número pequeno de pacientes com presença de ME após o tratamento (n=13) e, conseqüentemente, de uma amostra pequena de pacientes com positividade para os biomarcadores. Ainda, esse pequeno número de pacientes com ME impossibilita análises limitadas a este subgrupo.

A Tabela 19 sumariza o número de pacientes incluídos em cada análise, quantos pacientes tiveram positividade dos biomarcadores em ME, e o impacto em SG e a tabela 20 sumariza o impacto destes biomarcadores em SLP.

Tabela 19 - Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em ME após o tratamento e sobrevida global.

Biomarcador	n Avaliado	n (%)	SG Mediana (meses)	SG 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
EGFR	64					
Positivo		2 (3,1)	8,5	50	2,94 (0,38-22,76)	0,278
Negativo		62 (96,9)	NA	85,1		
β-tubulina III	64					
Positivo		1 (1,5)	NA	100	*	0,675
Negativo		63 (98,5)	NA	83,7		
TGFβRI	64					
Positivo		2 (3,1)	7,2	50	5,85 (0,72-47,04)	0,060
Negativo		62 (96,9)	NA	85,1		

* Regressão de Cox não é factível pois não ocorreu nenhum evento no braço β -tubulina III positivo.

NA: não alcançada

Tabela 20 - Correlação entre expressão de biomarcadores por imunocitoquímica em ME após o tratamento e sobrevida livre de progressão.

Biomarcador	SLP Mediana (meses)	SLP 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
EGFR				
Positivo	4,2	50	1,84 (0,24-13,67)	0,544
Negativo	NA	60,5		
β-tubulina III				
Positivo	NA	100	*	0,474
Negativo	NA	59,5		
TGFβRI				
Positivo	5,3	50	1,86 (0,25-13,85)	0,537
Negativo	NA	60,5		

* Regressão de Cox não é factível pois não ocorreu nenhum evento no braço β -tubulina III positivo.

NA: não alcançada

Como demonstrado nas tabelas não houve diferença significativa em relação a expressão dos biomarcadores em ME após o tratamento e SG ou SLP. Em relação a expressão de TGF- β RI em ME houve diferença numérica para SG, com estimativa em dois anos de 50% e mediana de 7,2 meses para TGF- β RI positivo *versus* SG em dois anos de 85,1% e mediana não atingida para TGF- β RI negativo, embora sem

significância estatística (HR=5,85; IC95%: 0,72-47,04; $p=0,060$), conforme pode ser observado na figura 41. Cabe lembrar que a amostra de apenas 2 pacientes com positividade deste biomarcador limita esta análise.

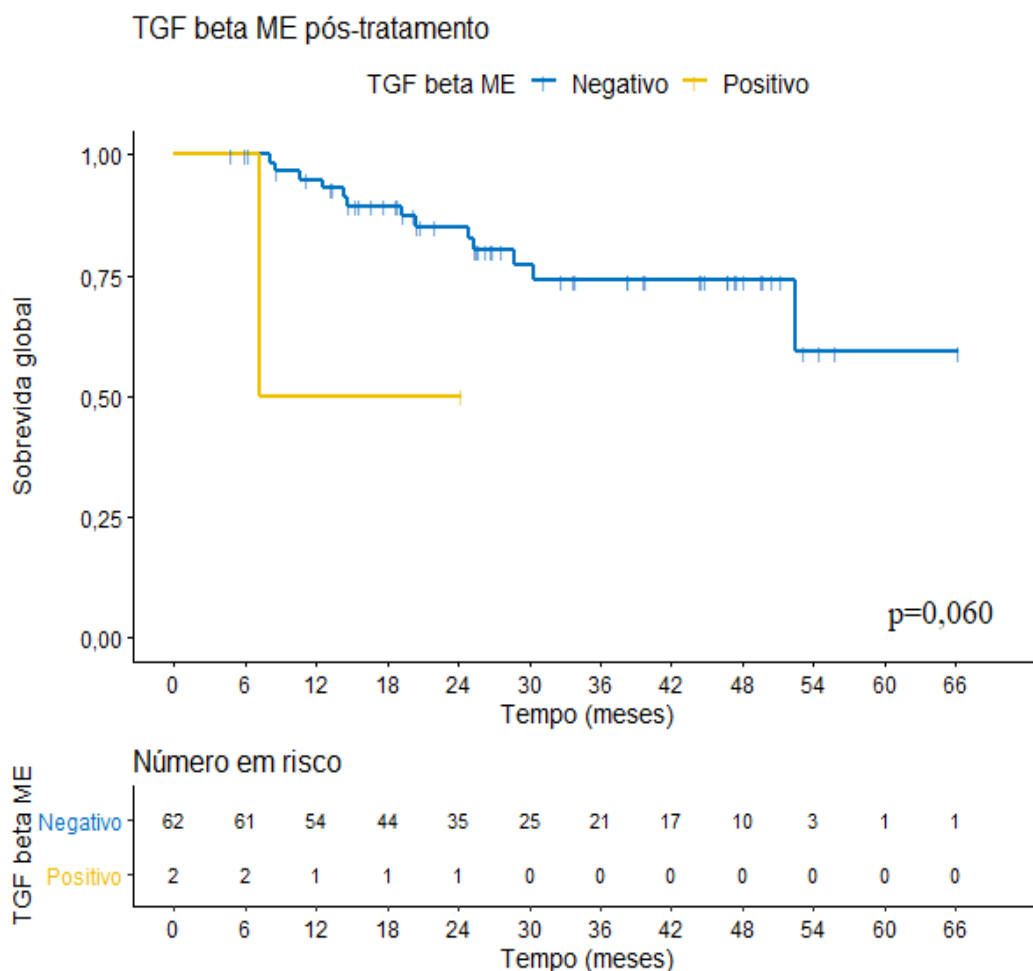


Figura 41 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global de pacientes com ou sem expressão de TGF- β RI em ME após o tratamento.

Na análise multivariada para SG a expressão de TGF- β RI em ME não demonstrou significância estatística como fator prognóstico independente, no modelo de ajuste inicial (HR=5,98; IC95%: 0,50-71,04; $p=0,156$).

4.15 IMPACTO PROGNÓSTICO DA CINÉTICA DE CTCs

Para análise da cinética de CTCs denominaremos CTC1 a análise de CTCs realizada antes do tratamento (*baseline*) e CTC2 a análise de CTCs realizada após o término do tratamento (após o término da radioterapia).

Comparando apenas os pacientes que tiveram estabilidade ou alguma redução no valor de CTCs após o tratamento ($CTC2 \leq CTC1$) *versus* aqueles que tiveram algum aumento no valor das CTCs entre a contagem *baseline* e após o tratamento ($CTC2 > CTC1$), não se observa nenhuma diferença em SG (HR=0,69; IC95%: 0,24-1,99; p=0,495) ou SLP (HR=0,90; IC95%: 0,39-2,04; p=0,804), conforme Figura 42.

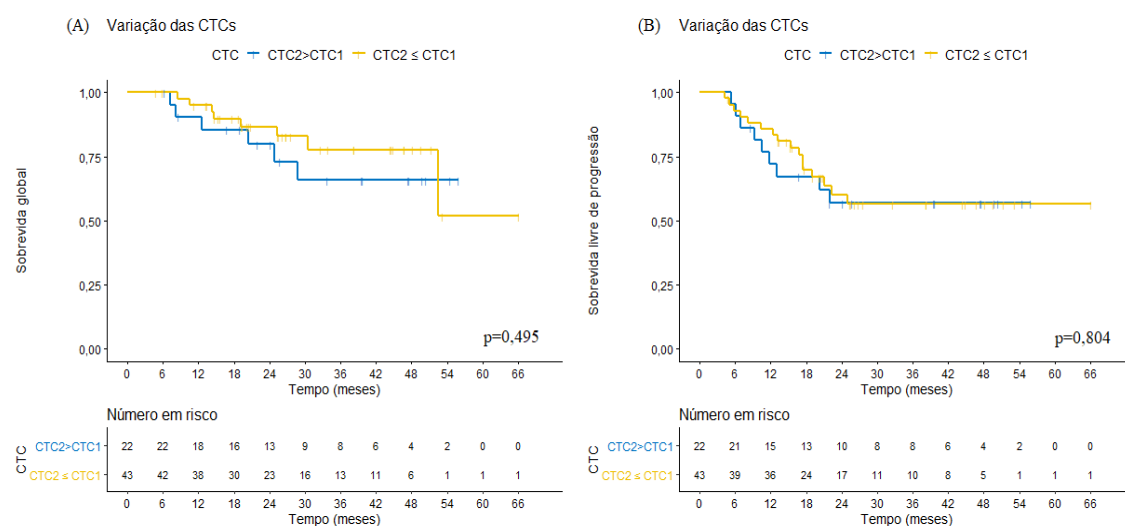


Figura 42 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global. (A) e livre de progressão (B), comparando pacientes com dosagem de $CTC2 > CTC1$ versus pacientes com dosagem de $CTC2 \leq CTC1$.

Na tentativa de estabelecer então um valor de variação entre a contagem de CTCs *baseline* a após o tratamento, aplicamos o método de Lausen e Schumacher de acordo com o delta ($CTC2 - CTC1$) de cada paciente, buscando um ponto de corte de variação de CTCs entre essas duas dosagens, que fosse capaz de prever melhores desfechos de SG e SLP.

Aplicando o método em relação a SG, chegamos ao valor de 3,8 CTCs/mL, ou seja, um ponto de corte entre pacientes que apresentaram aumento maior ou igual a 3,8 CTCs/mL entre a contagem *baseline* e após o tratamento em comparação com

pacientes que apresentaram redução ou aumento menor que 3,8 CTCs/mL, conforme demonstrado na Figura 43A. Analisando este ponto de corte observa-se diferença significativa em SG, com estimativa em dois anos de 87,3% x 62,5% para os pacientes abaixo ou acima desta variação (HR=0,22; IC95%: 0,07-0,67; $p=0,004$), conforme Figura 44.

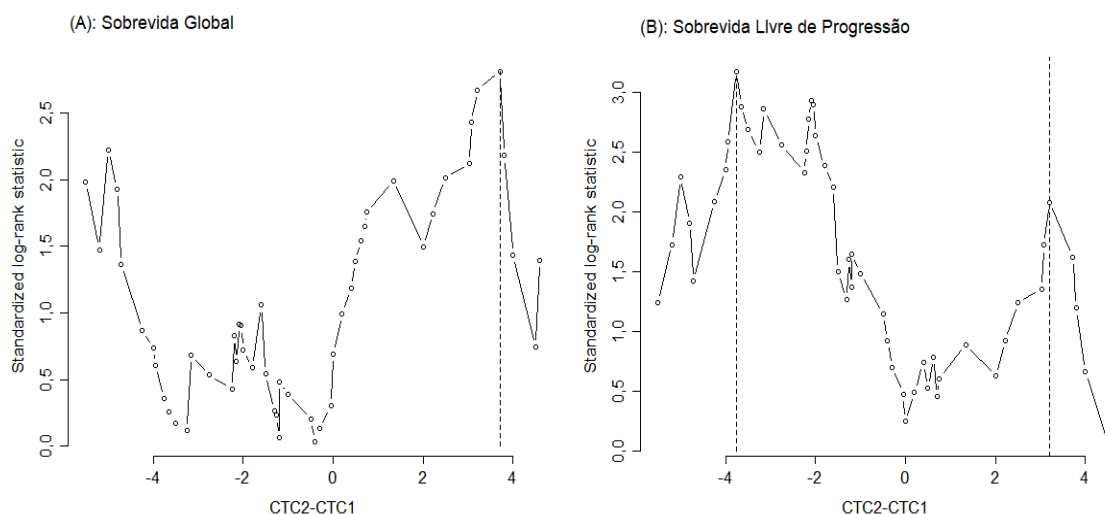


Figura 43 - Análise de pontos de corte do delta de CTCs (CTC2 – CTC1) e risco de óbito. (A) e progressão (B).

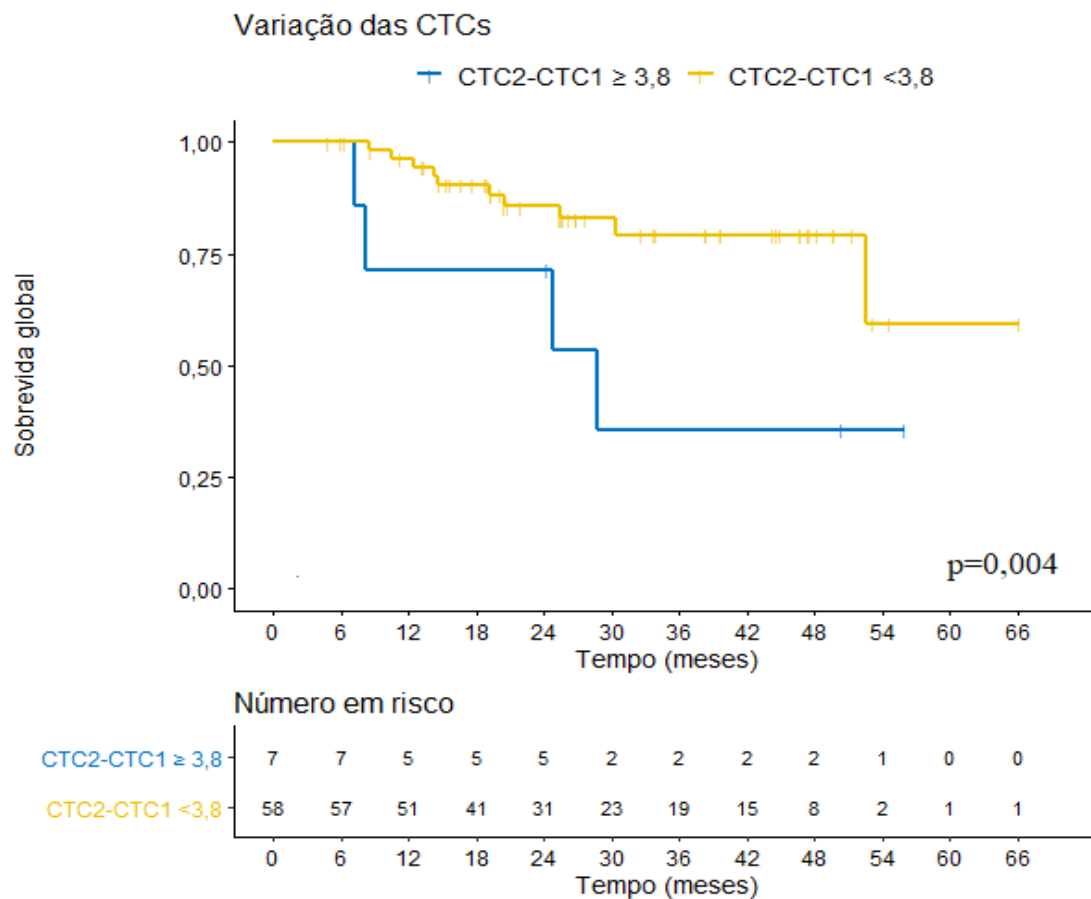


Figura 44 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global de acordo com delta de CTCs ($<$ ou $\geq 3,8$ /mL).

O mesmo foi realizado para o desfecho de SLP. Neste cenário, o gráfico fornecido pelo método de Lausen e Schumacher provia pontos de corte ideais negativos e positivos. Para manter o mesmo padrão e facilitar a interpretação do delta, foi optado por selecionar o ponto de corte positivo, que no gráfico corresponde ao valor de 3,2 CTCs/mL, como pode ser observado na figura 43B. Analisando este ponto de corte observa-se diferença significativa em SLP, com estimativa em dois anos de 67% para pacientes com redução ou aumento menor ou igual a 3,2 CTCs/mL entre a contagem *baseline* e após o tratamento *versus* 33,3% para aqueles com aumento maior que 3,2 CTCs/mL entre estes dois momentos (HR=0,33; IC95%: 0,13-0,84; $p=0,015$), demonstrado na Figura 45.

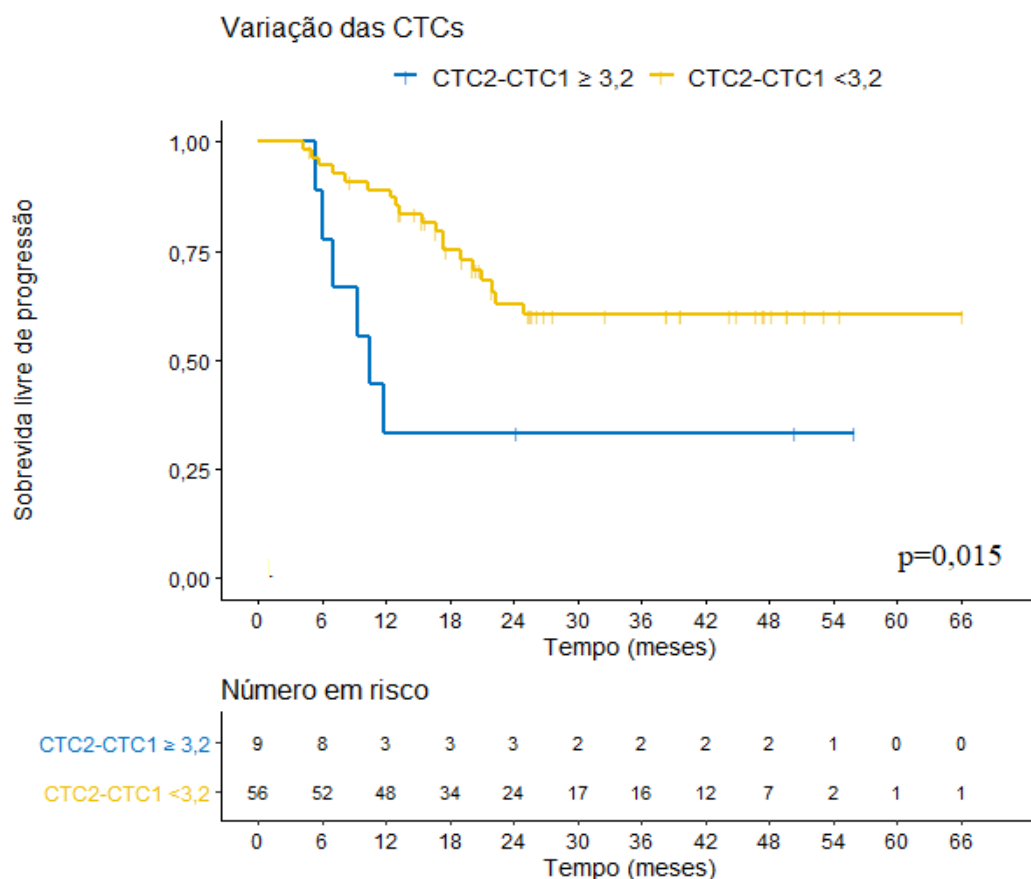


Figura 45 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida livre de progressão de acordo com delta de CTCs ($<$ ou $\geq 3,8/\text{mL}$).

Na análise multivariada para SG o delta de CTCs $\geq 3,8/\text{mL}$ foi um fator prognóstico significativo independente no modelo inicial (HR= 0,18; IC95%: 0,04-0,74; p=0,018) e também no modelo final (HR=0,27; IC95%: 0,08-0,90; p=0,034). Na análise multivariada para SLP, o delta CTCs $\geq 3,2/\text{mL}$ também foi um fator prognóstico independente significativo tanto no modelo inicial (HR=0,30; IC95%: 0,11-0,81; p=0,018) quanto no modelo final (HR=0,37; IC95%: 0,14-0,95; p=0,039).

5 DISCUSSÃO

O estudo avalia uma população portadora de câncer de cabeça e pescoço localmente avançado submetida a tratamento multidisciplinar. A maioria dos pacientes realizou tratamento não cirúrgico, com intuito de preservação de órgão ou devido a doença irresssecável, contudo, engloba também uma parcela de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico inicial, notadamente com tumores primários em cavidade oral. Desta forma, a amostra de pacientes tenta refletir a realidade de centros de tratamento de CECP localmente avançados. Demograficamente a maioria dos pacientes são homens com idade mediana de 60 anos, e há um predomínio de sítio primário em orofaringe, refletindo a tendência nos últimos anos de uma menor incidência de tumores tabaco-relacionados (como cavidade oral, laringe e hipofaringe) e uma maior incidência de tumores HPV relacionados (cerca de 30% da amostra era composta por não tabagistas ou com carga tabágica baixa). A sobrevida de acordo com sítio primário também reflete o impacto do HPV como fator de melhor prognóstico nos tumores primários de orofaringe. Embora uma parcela dos pacientes com tumores primários de orofaringe não tenha realizado a pesquisa imunoistoquímica de p16, visto que no início do estudo esta pesquisa não fazia parte da rotina de avaliação histopatológica destes tumores, naqueles testados a maioria foi positiva. Cabe ressaltar que essa taxa de positividade de p16 pode ser fruto de um viés de solicitação da pesquisa de p16, e deve ser interpretada com cautela, não devendo ser considerada como um reflexo da população global portadora de tumores primários de orofaringe.

A população aqui estudada tem doença avançada, com predomínio de tumores T3 e T4 (70%) e N2 e N3 (72%), sendo em sua maioria EC IV (82%). Estes dados refletem a realidade do diagnóstico tardio do CECP. Os tratamentos empregados mostram as opções terapêuticas disponíveis e comprovadamente eficazes, conforme amplamente discutido na introdução, com cerca de 20% dos pacientes realizando cirurgia inicial, todos seguidos de RT concomitante a cisplatina, e 80% sendo submetidos a uma estratégia de tratamento não cirúrgica. Neste subgrupo, metade dos pacientes realizou RT inicial (com radiosensibilização com

cisplatina ou cetuximabe) e metade realizou QT de indução seguida de RT. A escolha de tratamento cabia ao médico assistente, e a opção pela realização de QT de indução baseava-se em aspectos clínicos (volume de doença e risco de recidiva sistêmica), bem como no *performace status* do paciente. O uso de cetuximabe limitava-se a pacientes com contra-indicação ao uso de cisplatina.

Em relação às características demográficas e o impacto em sobrevida, fatores clássicos como idade, carga tabágica e estágio T impactaram negativamente a SG. Além disso, conforme já discutido, sítio primário em orofaringe e positividade para p16 também se correlacionaram com melhor SG. Entretanto estágio N não se associou com piora em SG ou SLP, seja com uma dicotomização de N0 e N1 *versus* N2 e N3, e nem mesmo quando avaliados separadamente os pacientes com estágio N2c e N3, situação que correlaciona-se com maior risco de recidiva sistêmica. Esses pacientes mais frequentemente receberam QT de indução, o que eventualmente pode ter tido influência neste resultado.

A taxa de detecção de CTCs utilizando o método ISET foi de 94%, com CTCs identificáveis em 78 dos 83 pacientes do estudo. Este resultado compara-se de maneira muito favorável aos dados da literatura. Em relação ao tamanho da amostra, se analisarmos os 23 estudos publicados avaliando CTCs em CECp localmente avançado (vide tabela 1), o número médio de pacientes incluído por estudo foi de 41 (variando de 9 a 144), sendo que apenas um possuía mais que 80 pacientes incluídos (TINHOFER et al. 2014). Ao analisarmos a taxa de detecção, a média dos estudos publicados foi de apenas 34,4%. Nesse sentido, destaque-se que quase a totalidade destes estudos utilizava técnicas dependentes de marcação de citoqueratinas para detecção e contagem de CTCs.

Se avaliarmos, por exemplo, apenas os 5 estudos que utilizavam o *CellSearch*[®] (NICHOLS et al. 2011; BUGLIONE et al. 2012; BOZEC et al. 2013; HE et al. 2013; GRÖBE et al. 2014), técnica de seleção imunomagnética de células expressoras de EpCAM e CKs 8 18 e/ou 19, evidencia-se uma taxa de detecção média de apenas 23,3% nos 225 pacientes incluídos (média de 45 por estudo). Ao analisarmos a utilização de técnicas de RT-PCR, associadas ou não a técnicas imunomagnéticas ou de citometria de fluxo, identificamos 8 estudos (PAJONK et al. 2001; PARTRIDGE et al. 2003; Dyavanoglou 2008; BALASUBRAMANIAN et

al. 2009; TOYOSHIMA et al. 2009; WINTER et al. 2009; HRISTOZOVA et al. 2011; TINHOFFER et al. 2014). O RT-PCR tinha alvos diferentes nestes estudos, como mRNA de CK19 ou CK20, EGFR, E48, ELF3, EphB4, todos marcadores de diferenciação epitelial das CTCs. Utilizando esta técnica, a taxa de detecção média nos estudos foi de 31% em 412 pacientes analisados, uma média de 51 pacientes por estudo. Neste subgrupo encontra-se o estudo com maior amostra analisando CTCs em CECP, publicado por TINHOFFER et al. (2014), que conta com 144 pacientes e uma taxa de detecção de apenas 29% (42/144), mesmo utilizando uma técnica de citometria de fluxo enriquecida com marcadores epiteliais (EpCAM+, CK+) e com depleção de leucócitos (CD45-), validada por RT-PCR de transcritos de EGFR.

Outros 7 estudos avaliaram outras técnicas de separação imunomagnéticas e por fluorescência, associadas ou não a citometria de fluxo (WIRTSCHAFTER et al. 2002; GUNNEY et al. 2007; YANG et al. 2009; JATANA et al. 2010; TINHOFFER et al. 2012; INHETERN et al. 2014; HSIEH et al. 2015), num total de 237 pacientes (média de 33 por estudo), com uma taxa de detecção de CTCs média de 50%. Como pode-se observar, quando comparamos os nossos resultados em relação a taxa de detecção de CTCs com os dados da literatura, que são majoritariamente de técnicas com algum tipo de seleção ou enriquecimento dependente de marcadores epiteliais, o sistema ISET, utilizando uma seleção baseada no tamanho e com depleção de linfócitos (via marcação negativa de CD45), consegue sensibilidade significativamente maior.

O estudo que mais se aproxima em termos de taxa de detecção de CTCs foi reportado por KAWADA et al. (2017), avaliando 32 pacientes quanto a presença de CTCs pela técnica *CellSieve Microfiltration Assay*, que consiste numa filtração inicial de baixa pressão da amostra de sangue, que separa as potenciais CTCs pelo tamanho, com posterior imunocitoquímica (ICC) com um coquetel de marcadores epiteliais (CK8, CK18, CK19, EpCAM e CD45) para detecção e contagem. Com esta técnica foram identificadas CTCs em 29 pacientes, perfazendo uma taxa de detecção de 90,6%, parecida com os resultados obtidos pelo sistema ISET, embora numa população menor de pacientes. Um segundo estudo utilizou técnica semelhante (KULASINGHE et al. 2018), denominada *ClearCellFX*, que consiste na filtração da amostra e seleção das CTCs baseada no tamanho e deformabilidade, com posterior

confirmação através de marcação por ICC para panCK e CD45. Foram avaliados 23 pacientes, com identificação de CTCs em 11, uma taxa de detecção de 47,8%.

Estes estudos demonstram que técnicas de isolamento de CTCs baseadas no tamanho apresentam taxas de detecção maiores em CECp. Porém, nestes estudos, além do tamanho, a identificação e contagem de CTCs dependia de marcação epitelial das CTCs enquanto no sistema ISET, após a filtração as CTCs são caracterizadas por aspectos citopatológicos, além do controle negativo de CD45. Isto permite a realização de ICC de outros biomarcadores com potencial implicação prognóstica e preditiva, além da identificação de CTCs sem expressão de marcadores epiteliais, que em CECp estão regulados negativamente conforme revisado por KULASINGHE et al (2015).

Outro ponto que merece discussão são as altas taxas de detecção de CTCs numa população de pacientes sem metástases à distância (M0), uma vez que incluímos em nosso estudo apenas portadores de doença locorregional avançada e não metastáticos. Mesmo quando avaliamos a população de pacientes submetida a tratamento cirúrgico inicial e que, consequentemente, realizaram a coleta já sem doença macroscópica *in loco* (pelo menos duas semanas após a cirurgia), observa-se uma taxa de detecção de CTCs de 93,7% (15/16), semelhante a população que foi submetida a tratamento definitivo (63/67: 94%). Estes dados mostram que os pacientes com CECp localmente avançado, estágios III, IVA e IVB, apresentam alta prevalência de CTCs ou de doença micrometastática, embora isto não se traduza em recidiva de doença na maioria destes pacientes. Portanto, além da presença de CTCs, outros fatores impactam no processo de metastatização e recidiva, como número de CTCs, capacidade de formação de microêmbolos e potencial escape imunológico, diferenciação das CTCs analisada através da expressão de biomarcadores, aspectos estes que foram explorados neste estudo.

Comparando a taxa de detecção com outros estudos utilizando a técnica ISET em diferentes tipos de tumores, pode-se observar que no cenário de doença metastática, como seria esperado, observa-se altas taxas de detecção em sarcomas, com 94% (BRAUN et al. 2018), câncer colorretal, com 88,2% (ABDALLAH et al. 2016), pulmão e próstata com 100% e finalmente mama com 85% (FARACE et al. 2015). E mesmo em doença não metastática, como em análise de pacientes com

câncer gástrico localmente avançado submetidos a tratamento perioperatório, pode-se observar taxa de detecção de 90% utilizando o sistema ISET (ABDALLAH et al. 2019).

Em relação a análise quantitativa, o número mediano de CTCs *baseline* em nossa população foi de 3,5/mL (DP: 3,2), variando de 0 a 19. Houve uma correlação significativa entre número médio de CTCs *baseline* e estágio N, com pacientes com doença N2 e N3 apresentando valores quantitativos significativamente maiores. Esse achado faz sentido, uma vez que doença linfonodal cervical avançada é o principal fator de risco para recidiva sistêmica em CECp localmente avançado (BROCKSTEIN et al. 2004), e sugere o impacto do valor quantitativo de CTCs no processo de metastatização. Houve também uma diferença em relação ao estágio pela AJCC, com doença em estágio IVB apresentando médias significativamente maiores que estágio III, mas esse resultado provavelmente é um reflexo do estágio N. Entretanto, quando avaliamos os pacientes com estágio N2c e N3, que são associados ao maior risco de recidiva sistêmica (BROCKSTEIN et al. 2004), não observamos diferença significativa nas contagens de CTCs em relação a estágio $\leq$ N2b, o que pode ser devido a uma amostra mais limitada deste subgrupo.

Comparativamente a outros tumores, o CCP localmente avançado parece apresentar valores quantitativos médios de CTCs maiores. Quando comparamos nossos resultados com outros trabalhos utilizando a mesma técnica em pacientes com doença metastática, observa-se contagem de CTCs menores em câncer de mama (0,27/mL), próstata (2,2 CTC/mL), pulmão (0,67/mL) (FARACE et al. 2015), além de câncer colorretal (2,0 e 2,3/mL) (BUIM et al. 2015; ABDALLAH et al. 2016) e sarcomas (2,0 e 2,6/mL) (CHINEN et al. 2014; BRAUN et al. 2018). E no cenário de doença não metastática, câncer gástrico localmente avançado também apresentou contagem média de CTCs *baseline* menor, com 2,8 CTCs/mL (ABDALLAH et al. 2019). Mais uma vez estes resultados sugerem uma alta capacidade de disseminação de CTCs em pacientes portadores de CCP, mesmo num cenário de doença não metastática e localmente avançada.

A contagem de CTCs *baseline* foi um fator prognóstico significativo independente. Para cada incremento de 1 CTC *baseline* houve um aumento de 18% no risco relativo de óbito (HR=1,18; IC95%: 1,06-1,31; $p<0,001$) e de 16% no de

progressão (HR=1,16; IC95%: 1,04-1,28; p=0,004), e o resultado manteve-se significativo em análise multivariada, com seleção de variáveis pela técnica stepwise (backward), tanto para SG (HR=1,17; IC95%: 1,05-1,31; p=0,005), quanto para SLP (HR=1,14; IC95%: 1,03-1,26; p=0,007). Para salientar o impacto prognóstico quantitativo das CTCs foi construído, baseado na regressão de Cox, uma estimativa numérica do impacto relativo em sobrevida, para cada contagem de CTC *baseline*, aliado a uma representação gráfica, enfatizando que quanto maior o número de CTCs antes do tratamento, maior o risco de óbito ou progressão de doença.

Comparativamente aos dados da literatura, dos 23 estudos publicados e revisados sobre o tema, em 10 deles a SLP (com algumas variações como sobrevida livre de recidiva, de doença, de metástases) foi avaliada (PARTRIDGE et al. 2003; TOYOSHIMA et al. 2009; JATANA et al. 2010; NICHOLS et al. 2011; BUGLIONE et al. 2012; HE et al. 2013; GRÖBE et al. 2014; TINHOVER et al. 2014; INHETERN et al. 2015; KULASINGHE et al. 2018), com resultados significativos em 6 deles. A maioria (9 estudos) avaliou as CTCs de maneira qualitativa, ou seja, detectáveis ou não, sem qualquer avaliação quantitativa do impacto da contagem de CTCs no desfecho, uma vez que as taxas de detecção eram baixas. Destes 9 estudos, em 5 foi encontrada uma correlação entre a presença de CTCs detectáveis e piores desfechos de SLP. Se avaliarmos, por exemplo, os 4 estudos que correlacionaram SLP com CTCs utilizando a técnica *Cellsearch*® (NICHOLS et al. 2011; BUGLIONE et al. 2012; HE et al. 2013; GRÖBE et al. 2014), em todos a análise foi apenas qualitativa, sendo que houve correlação entre CTCs detectáveis e SLP em um deles, não sendo evidenciada esta correlação nos outros três.

Apenas um estudo avaliou as CTCs de maneira quantitativa correlacionando contagens com desfecho de SLP, reportado por INHETERN et al. (2015), que avaliaram 40 pacientes portadores de tumores de cavidade oral e orofaringe localmente avançados, candidatos a QT de indução seguido de tratamento local, utilizando uma técnica de citometria com escaneamento a laser de CTCs marcadas com EpCAM, com uma taxa de detecção de 80%. Chama atenção neste trabalho o número mediano de CTCs detectadas antes do tratamento, de 3295 CTCs/mL, sendo que pacientes com CTCs *baseline* acima da mediana tiveram pior sobrevida livre de recidiva (p=0,025).

Portanto, quando avaliamos o desfecho de SLP, menos da metade dos estudos revisados publicados sobre o tema realizou esta análise, com resultados controversos. A maioria destes avaliou apenas qualitativamente as CTCs, com apenas um trabalho analisando quantitativamente, sendo que foi evidenciada a correlação em 6 dos 10 trabalhos. Importante salientar que, dentre os estudos com correlação significativa, em apenas um este resultado foi confirmado por análise multivariada (NICHOLS et al. 2011). Nossa análise demonstrou de maneira inequívoca a correlação entre contagens de CTCs *baseline* mais altas e pior desfecho de SLP, sendo inclusive fator prognóstico independente após análise multivariada. É o único estudo a demonstrar essa correlação analisando as CTCs como uma variável quantitativa contínua, ou seja, não apenas presença ou ausência, ou valores acima da mediana, mas avaliando o impacto do incremento de cada CTC *baseline* no desfecho de SLP.

Em relação a SG, apenas 5 estudos tentaram correlacionar CTCs com este desfecho (TOYOSHIMA et al. 2009; BUGLIONE et al. 2012; GRÖBE et al. 2014; TINHOFFER et al. 2014; INHESTERN et al. 2015). Quatro deles, mais uma vez, analisaram qualitativamente a presença de CTCs detectáveis com SG, não sendo observada correlação significativa em nenhum deles. Apenas INHESTERN et al. (2015), relataram correlação significativa entre contagens de CTCs *baseline* acima da mediana e pior SG ($p=0,025$), entretanto esse resultado não foi submetido a análise multivariada. Logo, de acordo com a revisão de literatura que realizamos, nosso estudo é o primeiro a demonstrar que a contagem de CTCs antes do tratamento, como uma variável quantitativa contínua, é um fator prognóstico significativo independente de SG em pacientes com CCP localmente avançados.

O impacto prognóstico das CTCs em tumores de cabeça e pescoço foi também reportado em três metanálises (WANG et al. 2015; WU et al. 2016; CHO et al. 2018). WANG et al. (2015) conduziram uma revisão sistemática e metanálise de 8 estudos, com um total de 433 pacientes e demonstraram que a presença de CTCs (*versus* CTCs não detectadas) correlacionava-se com maior risco de recidiva de doença (OR=3,44 – IC95%: 1,87-6,33; $p<0,01$), sem análise do impacto em SG. Resultados semelhantes foram obtidos por WU et al. (2016), ao analisarem 5 estudos que reportaram impacto negativo da presença de CTCs em sobrevida livre de doença (HR=4,62; IC95%: 2,51-8,52; $p<0,05$), porém sem impacto em SG (HR=1,63;

IC95%: 0,85-3,13; $p=ns$). Mais recentemente, CHO et al. (2018) analisaram 6 estudos com um total de 429 pacientes, e a presença de CTCs correlacionou-se com maior risco de reicidiva (HR=4,88; IC95%: 1,93-12,35; $p<0,001$), porém não foi demonstrada correlação significativa com SG (HR=1,92; IC95%: 0,93-3,96; $p=0,078$). Vale ressaltar que nestas metanálises foi considerada apenas a presença ou ausência de CTCs, sem qualquer análise quantitativa.

Foi avaliado um ponto de corte como preditor dos desfechos de SG e SLP e para isto utilizamos a técnica descrita por LAUSEN e SCHUMACHER (1992). Para SG o valor de 6,5 CTCs/mL correlacionou-se de maneira independente, embora o número de pacientes que se situam acima deste nível seja limitado, de 13% da amostra. Quando selecionamos um ponto de corte mais baixo, o segundo ideal, de 2,8 CTCs/mL, encontramos significância na análise uniivariada, mas ela é perdida na multivariada. Esses dados ressaltam o impacto da contagem de CTCs como variável contínua, com um aumento do risco de óbito quanto mais altos os valores de CTCs *baseline*. Para SLP o valor de 3,8 CTCs/mL foi um fator prognóstico independente. Ao avaliar os gráficos gerados pelo método, observa-se um aumento do risco relativo do desfecho a partir de um ponto de corte ao redor de 3 CTCs/mL, com algumas variações em determinados valores (reduções do *log rank* para pontos de corte mais altos que este), provavelmente devido ao número limitado da amostra, o que reforça o conceito de variável contínua e não dicotômica. Dos trabalhos revisados e já amplamente discutidos, o único que correlacionou quantitativamente CTCs e desfechos foi o reportado por INHETERN et al. (2015), que utilizou como ponto de corte a contagem mediana de CTCs. Não consideramos esta uma avaliação adequada, pois a mediana simplesmente divide a população em dois grupos iguais e avalia o desfecho entre estes dois grupos, sem um aprofundamento maior do ponto de corte que realmente separa subgrupos com desfechos opostos.

Avaliamos também a presença de microêmbolos (ME), que são definidos como grupos de três ou mais CTCs (KHOJA et al. 2014). Para evitar que ME possam ser confundidos com CTCs em mitose, esse agrupamento de CTCs deve conter 3 ou mais núcleos distintos (HOU et al. 2012). Na população global do estudo foram detectados ME em 27,7% dos pacientes, e sua presença não se correlacionou com SG (HR=2,32; IC95%: 0,95-5,66; $p=0,064$) porém houve correlação significativa com

SLP (HR=2,70; IC95%: 1,30-5,58; p=0,007), que se manteve como fator prognóstico significativo independente na análise multivariada (HR=2,58; IC95%: 1,24-5,35; p=0,010). A formação de ME traz uma vantagem no processo de metastatização, uma vez que agrupamentos de CTCs quando injetados em camundongos apresentam maior potencial de formação de metástases em comparação com a injeção de CTCs isoladas (FIDLER 1970; LIOTTA et al. 1976; ACETO et al. 2014). A ausência de células em apoptose ou em proliferação também suporta a hipótese de uma vantagem de sobrevivência dos ME, seja por uma proteção contra a apoptose por contato célula-células ou célula-matriz extracelular ou pela menor eficácia da quimioterapia sistêmica (FRISCH e FRANCIS 1994; FRIEDL e GILMOUR 2009). E, por fim, a formação destes agrupamentos de CTCs facilitaria o escape do sistema imune, uma das principais linhas de defesa contra a proliferação e disseminação neoplásica (FRIEDL e WOLF 2003). Dados mais recentes demonstram estas hipóteses, de que a presença de ME aumenta de maneira significativa o potencial metastático (ACETO et al. 2014; AU et al. 2016) e a resistência à terapia (BITHI e VANAPALLI 2017; UMER et al. 2018). Esse racional e estes dados suportam nossos resultados que correlacionam a presença de ME com pior prognóstico e maior risco de progressão da doença.

Não há, pelo nosso conhecimento, nenhum outro estudo que correlacione a presença de ME com piores desfechos em CCP. Há, entretanto, dados de outros tipos de tumores correlacionando a presença de ME com pior SLP e/ou SG como câncer de pulmão de pequenas células (HOU et al. 2012), câncer de mama (UM et al. 2015; WANG et al. 2017), câncer de pâncreas (CHANG et al. 2016), câncer gástrico (ZHENG et al. 2017; ABDALLAH et al. 2019), câncer colorretal (ZHANG D et al. 2017), melanoma (LONG et al. 2016) e hepatocarcinoma (VONA et al. 2004). A maioria destes trabalhos utiliza a técnica ISET (câncer gástrico, colorretal, melanoma, hepatocarcinoma), que através do seu sistema de filtração e detecção pelo tamanho, favorece a identificação de ME. Outras técnicas foram utilizadas como *Cellsearch*[®] (pulmão e mama), que apresenta a limitação da dependência de marcação epitelial, além do processo de centrifugação apresentar o risco de desagregar as CTCs de ME, e técnicas de microfiltração (pâncreas), que são

promissoras para avaliação de ME (ANTFOLK e LAURELL 2017) mas ainda possuem poucos dados publicados.

Em relação a expressão de biomarcadores por ICC nas CTCs *baseline*, não houve correlação significativa com SG ou SLP. Nesse contexto, os dois biomarcadores que parecem promissores como prognósticos foram o EGFR, expresso em 74% das CTCs testadas, e a β -tubulina III, expressa em 45%, por apresentarem diferença numérica na estimativa de SG em dois anos, embora sem significância estatística. O impacto prognóstico negativo da expressão imunoistoquímica de EGFR em CECp já é sabido de diversos estudos e metanálise (ANG et al. 2002; KEREN et al. 2014), porém sua análise em CTCs e consequente impacto prognóstico neste contexto foram pouco exploradas até o momento. TINHOFFER et al. (2012) analisaram a expressão de EGFR em CTCs de 31 pacientes portadores de CECp localmente avançado utilizando técnica de citometria de fluxo. A taxa de detecção de CTCs foi de apenas 29%, com 100% de positividade para EGFR, porém não foi demonstrada correlação de expressão de EGFR nas CTCs com sobrevida. GRISANTI et al. (2014) avaliaram 53 pacientes portadores de CECp recidivado ou metastático utilizando o *Cellsearch*[®], evidenciando uma taxa de detecção de 26%, com 45% das CTCs apresentando positividade para EGFR. Apesar da presença de CTCs detectáveis ter se correlacionado com SLP e SG, não houve correlação da expressão de EGFR com piores desfechos. Também para a β -tubulina III existem dados que evidenciam o papel prognóstico da expressão imunoistoquímica em CCP, conforme reportado por KOH et al. (2009) demonstrando impacto negativo significativo em SLP, e sem significância em SG. Porém, mais uma vez, dados sobre sua expressão em CTCs não estão disponíveis.

A expressão de EGFR já tem uma base de dados disponíveis mostrando tratar-se de um fator prognóstico negativo, uma vez que sua hiperexpressão faz parte do processo de carcinogênese do CECp, e ativa uma cascata de sinalização que culmina com proliferação, sobrevivência e metastatização celular (KEREN et al. 2014). E embora haja uma terapia que bloqueie o EGFR (o anticorpo monoclonal Cetuximabe), sua hiperexpressão no tumor primário não se mostrou um preditor de resposta a este tratamento (LICITRA et al. 2013). Portanto, apesar de identificarmos a expressão de EGFR como um fator de mau prognóstico, até o momento isto não

leva a uma alteração de estratégia terapêutica. A β -tubulina III é interpretada classicamente como um biomarcador de resistência a terapia com taxanos, entretanto dados sugerem que outras isoformas, como a β -tubulina II, podem conferir resistência a tratamentos baseados em platina (CULLEN et al. 2009) em CECp localmente avançado, o que justificaria sua expressão como um fator prognóstico adverso na população global do estudo, independente do tratamento realizado.

A expressão de outros biomarcadores de resistência a drogas (ERCC1, MRP-2 e MRP-7) ou de transição epitélio mesênquima (TGF- β RI e MMP2) não teve impacto significativo em desfechos de SG e SLP, sugerindo que seu papel possa ser mais importante como preditores de resposta ao tratamento, no caso do primeiro, ou de risco de recidiva de doença para expressão após o tratamento, no caso do segundo.

Ao analisar a expressão dos biomarcadores em ME antes do tratamento, observa-se que positividade de MRP-7 em ME, presente em 6% dos pacientes analisados, correlacionou-se significativamente com SG na análise univariada (embora tenha perdido a significância na multivariada) e foi fator prognóstico independente de pior SLP. A MRP-7 é uma proteína associada a resistência de múltiplas drogas, muitas delas utilizadas no tratamento do CCP localmente avançado, como docetaxel (HOPPER-BORGE et al. 2004; DOMANITSKAYA et al. 2014), paclitaxel (HOPPER-BORGE et al. 2011; KATHAWALA et al. 2014; ZHANG et al. 2017b), 5-FU (XIE et al. 2017) e terapias anti-EGFR (KUANG et al. 2010; ZHAO et al. 2018). Some-se a isso as evidências que demonstram que a formação de ME confere resistência às terapias, uma vez que as CTCs nesses agregados encontram-se em fase não proliferativa, teoricamente menos susceptíveis à terapia citotóxica (UMER et al. 2018), além de estudo experimental demonstrando que a efetividade da quimioterapia (doxorubicina) é maior em CTCs isoladas em comparação com ME (BITHI e VANAPALLI 2017). Estes dados sugerem uma clara vantagem em sobrevivência, resistência a tratamento e consequentemente piores desfechos nos pacientes que, além de apresentarem ME, possuam expressão de biomarcadores de resistência como a MRP-7.

Outros biomarcadores cuja expressão em ME correlacionou-se com piores desfechos na análise univariada foram a β -tubulina III (SG) e o EGFR (SLP), embora esses resultados não tenham se confirmado na análise multivariada. Conforme

discutido previamente, esses biomarcadores estão relacionados a piores desfechos, e sua expressão associada a presença de ME provavelmente reflete um cenário de doença mais agressiva, resistente ao tratamento e de pior prognóstico em termos de sobrevida.

Para análise do potencial papel preditor de resposta de CTCs, ME e expressão de biomarcadores, limitamos nossa análise à população submetida a tratamento definitivo, ou seja, os pacientes que apresentavam doença *in loco* e cujo intuito do tratamento era curativo com uma estratégia não cirúrgica, baseada em tratamento sistêmico e radioterapia, num total de 67 pacientes. Inicialmente confirmamos o papel prognóstico da contagem de CTCs *baseline* nesta população, que como uma variável contínua foi um fator prognóstico independente de pior SG (HR=1,23; IC95%: 1,09-1,39; $p<0,001$) e SLP (HR=1,22; IC95%: 1,08-1,37; $p=0,001$). A contagem de CTCs *baseline* como variável contínua foi um preditor de resposta ao tratamento, com uma redução na chance de resposta completa de 26% para cada incremento de 1 CTC/mL (OR=0.74; IC95%: 0.58-0.95; $p=0.022$). Foi construída uma curva ROC, porém o ponto otimizado de 3,1 CTCs/mL levava a uma sensibilidade e especificidade ao redor de 60%, que não foram suficientes para estabelecer este ponto de corte como um preditor significativo de resposta completa ao tratamento (OR=0.48; IC95%: 0.15-1.15; $p=0.212$). BUGLIONE et al. (2012) avaliaram a correlação entre CTCs e resposta ao tratamento em 73 pacientes com CECP localmente avançado, entretanto incluindo diversas histologias e sítios primários (e não apenas CEC de sítios clássicos das vias aerodigestivas superiores), utilizando o sistema *CellSearch*[®]. Não houve correlação significativa entre presença de CTCs *baseline* e resposta parcial ou completa ao tratamento, e foi identificada correlação com a cinética de CTCs, sendo que pacientes que foram negativos antes ou após o tratamento apresentaram maior taxa de resposta ($p=0,017$). GRISANTI et al. (2014), avaliaram 53 pacientes portadores CECP recidivado ou metastático utilizando o sistema *CellSearch*[®], e observaram taxas de controle de doença significativamente maiores em pacientes com CTCs negativas (45% x 8%; $p=0,03$). Este é, portanto, pelo nosso conhecimento, o primeiro estudo a correlacionar de maneira quantitativa a contagem de CTCs *baseline* com resposta ao tratamento em CECP localmente avançado. Esta informação pode ser relevante na prática clínica,

visto que ao se predizer uma menor probabilidade de resposta completa ao tratamento não cirúrgico, poderia discutir-se a modificação ou adaptação da estratégia, seja substituindo-a por uma abordagem cirúrgica inicial em pacientes ressecáveis ou intensificando o tratamento, com adição de quimioterapia de indução por exemplo, como será discutido posteriormente.

Os pontos de corte prognósticos também foram semelhantes aos encontrados na população total do estudo, com os valores de 6,5, 3,8 e 2,8 CTCs/mL correlacionando-se com uma boa discriminação dos desfechos de sobrevida. Por motivos de aplicabilidade clínica e de factibilidade das análises, foram avaliados os pontos 2,8 e 3,8 CTCs/mL. Para a análise do potencial papel preditor da contagem de CTCs, de acordo com a estratégia de tratamento utilizada, mais uma vez limitamos a avaliação aos pacientes submetidos a tratamento não cirúrgico, dividindo em dois grupos de pacientes: aqueles submetidos a quimioterapia de indução seguido de radioterapia concomitante a platina ou cetuximabe (grupo QTI; n=33) e os tratados com radioterapia inicial combinada à platina ou cetuximabe (grupo RT inicial; n=34). Foi optado por esta análise pelo número de pacientes em cada grupo e pela grande dúvida que paira sobre qual o papel da QT de indução em CECP localmente avançado, com resultados conflitantes na literatura e, até o momento, sem identificação de biomarcadores preditores de um eventual benefício desta estratégia. Apesar de alguns desbalanços, com o grupo QTI apresentando pacientes mais jovens (média de 56 x 64 anos; $p=0,001$), com menor carga tabágica (média de 26 x 43 anos/maço; $p=0,033$), com maior volume de doença cervical (78% x 20% de doença N2c ou N3; $p<0,001$) e com estágio AJCC mais avançado (100% x 58% de estágio IVA ou IVB; $p<0,001$), não houve diferença significativa na análise multivariada de SG (HR=1,68; IC95%: 0,42-6,76; $p=0,460$) ou SLP (HR=2,05; IC95%: 0,75-5,56; $p=0,158$) entre os dois grupos de tratamento. Essas diferenças demográficas são explicadas pelos critérios utilizados em nosso serviço para indicação de QT indução, que é reservada a pacientes capazes de tolerar tal tratamento (em geral mais jovens, com bom *performance* e com menos comorbidades), e com doença de alto volume (T4, N3) ou alto risco de recidiva à distância (N2c ou N3).

Com o intuito de avaliar a contagem de CTCs como um potencial biomarcador preditor do benefício de QT de indução, avaliamos os pacientes abaixo

e acima dos pontos de corte estabelecidos em relação a estratégia de tratamento utilizada. Analisando pacientes com CTCs *baseline* $\leq 2,8/\text{mL}$ a estimativa de SG em dois anos foi de 93,3% para o grupo QTI *versus* 78,3% para RT inicial (HR=0,314; IC95%: 0,03-3,02; p=0,290) enquanto naqueles com dosagem $> 2,8/\text{mL}$ a estimativa de SG dois anos foi de 74,8% para QTI *versus* 58,9% para RT inicial (HR=0,61; IC95%: 0,17-2,08; p=0,426). Embora não haja significância estatística, chama a atenção a diferença numérica na estimativa de SG em dois anos nos pacientes com CTCs *baseline* acima do ponto de corte, diferença esta que fica mais evidente ao utilizar o ponto de 3,8 CTCs/mL, com SG em dois anos de 88,2% para QTI *versus* 79,8% para RT inicial (HR=0,55; IC95%: 0,10-8,4; p=0,470) em pacientes com dosagem $\leq 3,8/\text{mL}$, enquanto naqueles com contagem $> 3,8/\text{mL}$ a SG em dois anos foi de 79% para QTI *versus* 30% para RT inicial (HR=0,32; IC95%: 0,07-1,38; p=0,112). Embora sem significância estatística, estes resultados geram a hipótese que pacientes com contagem de CTCs *baseline* mais altas derivem maior benefício do uso de quimioterapia de indução.

Esta hipótese faz sentido racional, uma vez que acredita-se que a presença de CTCs está diretamente envolvida no processo de metastatização à distância (MEGO et al. 2010; ZHOU et al. 2017), e que o emprego de quimioterapia de indução com adição de taxanos, esquemas que foram utilizados na população de nosso estudo, tem a capacidade de reduzir de maneira significativa a incidência de recidiva à distância em CECp localmente avançado (BLANCHARD et al. 2013). Metanálise reportada por BLANCHARD et al. (2013), analisando 5 estudos prospectivos e randomizados com um total de 1772 pacientes, demonstrou que a QT de indução com TPF trazia uma redução absoluta no risco de recidiva à distância de 6,4% em comparação com esquema PF (HR=0,63; IC95%: 0,45-0,89; p=0,009), com uma taxa de metástases em 5 anos de 13,7% *versus* 20,1%. Apesar do benefício significativo, apenas uma parcela dos pacientes se beneficiaria desta estratégia para este desfecho, visto as taxas de recidiva à distância em geral serem mais baixas do que a taxa de recidiva locorregional (no mesmo estudo entre 40 e 50%). Portanto, nos últimos anos, esforço tem sido direcionado para identificar pacientes potencialmente com maior risco de recidiva à distância para utilização dos esquemas de indução e, na ausência de

biomarcadores validados até o momento, esta decisão tem se baseado em fatores clínicos.

Atualmente a principal característica clínica avaliada para estimar o risco de recidiva à distância e embasar a indicação de QT de indução com intuito de redução deste desfecho é o volume de doença cervical, uma vez que estágios $\geq$ N2b, especialmente N2c e N3 se associam com aumento do risco de metástases (BROCKSTEIN et al. 2004). Além disso, análises de subgrupos de estudos que empregaram QT de indução ou neoadjuvante com TPF, identificaram potencial maior benefício da estratégia neste cenário. ZHONG et al. (2013) conduziram estudo prospectivo e randomizado de fase III com 256 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cavidade oral localmente avançado ressecável, que receberam QT neoadjuvante com TPF por dois ciclos seguido de cirurgia *versus* cirurgia inicial. O estudo foi negativo para seu desfecho primário de SG (HR=0,97; IC95%: 0,63-1,50; p=0,918) e secundário de sobrevida livre de doença (HR=0,97; IC95%: 0,65-1,45; p=0,897). Entretanto, ao analisar o subgrupo de pacientes com doença cervical mais volumosa, houve benefício da QT em SG (HR=0,41; IC95%: 0,17-0,97) e sobrevida livre de metástases à distância (HR=0,41; IC95%: 0,17-0,97). COHEN et al. (2014) reportaram os resultados do estudo *DeCIDE*, que randomizou 285 pacientes com CECP localmente avançado N2 e N3, para receberem QT indução com esquema TPF por dois ciclos seguido de quimiorradioterapia *versus* quimiorradioterapia inicial. O estudo foi fechado precocemente por baixo recrutamento (estudo desenhado para 400 pacientes), portanto não apresenta poder estatístico para o desfecho primário de SG, que foi negativo (HR=0,91; IC95%: 0,59-1,41; p=0,68), entretanto houve menos recidivas à distância no grupo TPF (29 x 19; p=0,11) e, ao se analisar apenas a população com pescoço N2c e N3, observa-se uma diferença numérica favorável ao TPF em SG, sem significância estatística (p=0,19).

Estes resultados sugeriam que o volume de doença cervical seria um bom preditor do benefício da QT indução, e baseado nessa premissa foi desenhado o estudo GORTEC 2007/02 (GEOFFROIS et al. 2018), que randomizou 370 pacientes portadores de CECP localmente avançado, incluindo apenas estágios N2b, N2c e N3, para QT indução com TPF por três ciclos seguido de RT concomitante a cetuximabe *versus* RT concomitante a quimioterapia baseada em platina (carboplatina + 5-FU).

Houve redução significativa na incidência de metástases à distância no grupo TPF (HR=0,54; IC95%: 0,30-0,99; p=0,05) entretanto isto não se traduziu em benefício nos desfechos de sobrevida, com uma estimativa de SLP em dois anos de 36% no grupo TPF *versus* 38% para RT + QT (HR=0,93; IC95%: 0,73-1,20; p=0,58) e sem diferença em SG (HR=1,12; IC95%: 0,86-1,46; p=0,39). Estes resultados mostram que selecionar pacientes para QT de indução baseado apenas no volume de doença cervical, embora possa trazer uma redução na incidência de metástases à distância, não se traduz em benefício significativo de sobrevida, mesmo em estudo prospectivo e randomizado de fase III desenhado para esta população específica.

Portanto são necessários biomarcadores preditores do benefício desta estratégia, uma vez que se trata de tratamento tóxico, especialmente o esquema TPF, com potencial de complicações como neutropenia graus III ou IV em até 59% dos pacientes (BLANCHARD et al. 2013), neutropenia febril em 17% e taxa de mortalidade relacionada ao tratamento que pode chegar a 6,6% (GEOFFROIS et al. 2018). Embora haja relação entre a contagem de CTCs *baseline* e o volume de doença cervical em nosso estudo, nossos resultados sugerem que a contagem de CTCs tenha potencial para ser um melhor biomarcador preditivo, uma vez que observamos uma diferença numérica favorável a QT de indução para SG nos pacientes com contagens mais altas antes do tratamento. Vale ressaltar que a ausência de diferença estatística nestes resultados, bem como não se tratar de um estudo randomizado com este objetivo, não nos permitem afirmar no momento a aplicabilidade clínica da dosagem de CTCs com o intuito de selecionar pacientes para QT de indução, mas como discutido, geram uma hipótese plausível e que necessita de confirmação em estudos subsequentes.

Para avaliar o papel preditor de resposta ao tratamento da presença de ME, mais uma vez limitamos a análise à população submetida a tratamento definitivo não cirúrgico. Nesse cenário, a presença de microêmbolos foi fator prognóstico independente para pior SLP na análise multivariada (HR=3,34; IC95%: 1,40-7,99; p=0,007) enquanto para SG, embora significativo para pior SG na análise univariada (HR=3,01; IC95%: 1,06-8,52; p=0,029), perdeu a significância na análise multivariada (HR=2,54; IC95%: 0,79-8,15; p=0,115). Devido ao número limitado de pacientes com presença de ME (15 de 67), o que limitaria a análise desse subgrupo

isoladamente, optado por construir uma curva de Kaplan Meier com 4 braços, contemplando a presença ou ausência de ME e a estratégia de tratamento, QT de indução ou RT inicial. Analisando a SG, houve diferença significativa entre as curvas ($p=0,020$) com pior SG para pacientes que apresentavam ME *baseline* e que não receberam QTI, significativa em relação a pacientes com ME ausentes que receberam QTI (HR=0,13; IC95%: 0,02-0,59; $p=0,009$) e que não receberam QTI (HR=0,22; IC95%: 0,06-0,84; $p=0,027$), porém sem significância em relação aos pacientes com ME presentes que realizaram QTI (HR=0,29; IC95%: 0,05-1,64; $p=0,164$). Estes resultados sugerem que pacientes com ME presentes e que não recebem tratamento sistêmico efetivo, no caso QT de indução, tem um péssimo prognóstico. Aparentemente, nessa população, quando se oferece a QTI, os desfechos de SG são melhores, embora sem significância estatística. Em contrapartida, pacientes com ausência de ME *baseline*, não parecem se beneficiar da adição de QT de indução ao tratamento definitivo.

Analisando a SLP resultados semelhantes foram observados, com diferença entre as 4 curvas ($p<0,001$) e pior SLP para pacientes com ME que não receberam QTI, significativa em relação aos pacientes sem ME que receberam QTI (HR=0,15; IC95%: 0,05-0,58; $p=0,004$) ou não (HR=0,09; IC95%: 0,02-0,35; $p<0,001$), e não significativa em relação aos pacientes com ME presentes que não receberam QT de indução (HR=0,33; IC95%: 0,08-1,30; $p=0,116$). O número pequeno de pacientes com ME presentes, como já exposto, limita este tipo de análise, porém mais uma vez, estes resultados sugerem que o benefício da QT de indução limita-se a pacientes com presença de ME *baseline*, sem impacto significativo naqueles sem ME. Apesar das CTCs isoladas estarem diretamente envolvidas no processo de metastatização, acredita-se que a maioria destas células esteja fadada a sucumbir na corrente sanguínea, por forças mecânicas e ambientais como trauma, stress oxidativo e ação do sistema imune, o que leva apenas uma pequena fração a atingir órgãos distantes e, em última análise, originar doença metastática (GIULIANO et al. 2018). Portanto, a presença de ME pode significar uma vantagem na capacidade de metastatização, esse subgrupo de pacientes represente àqueles com maior risco de disseminação sistêmica e, consequentemente, com maior benefício do uso de QT de indução. Embora alguns dados demonstrem que as CTCs em ME sejam não proliferativas, o

que conferiria resistência ao tratamento citotóxico (KREBS et al. 2012; GIULIANO et al. 2018), ou ainda que permaneçam em um estado de dormência (SPILIOTAKI et al. 2014; DASGUPTA et al. 2017), nossos resultados sugerem que em pacientes com ME, o uso de QT sistemicamente efetiva pode resultar em melhores desfechos, independente destas características de potencial quimiorresistência.

Conforme previamente discutido em relação a contagem de CTCs *baseline*, estes resultados são geradores de hipótese, lembrando que altas contagens de CTCs e a presença de ME *baseline* são correlacionados, se traduzem em piores desfechos de sobrevida, e poderiam selecionar pacientes para uma estratégia mais intensa de tratamento, com a incorporação da QT de indução sistêmica ao tratamento locorregional.

Em relação ao potencial papel preditor de desfechos da expressão de biomarcadores por ICC em CTCs e ME antes do tratamento demonstramos piores desfechos nos pacientes com expressão de β -tubulina III nas CTCs *baseline* que foram submetidos a QT indução (combinações com taxanos) em comparação com ausência de expressão. Neste grupo de pacientes, aqueles sem expressão de β -tubulina III apresentaram estimativa de SG em dois anos de 100% *versus* 58,5% para os expressores ($p=0,012$). Quando avaliamos o subgrupo de pacientes tratados com RT inicial, não houve diferença em SG entre expressores ou não para β -tubulina III e, ao analisar as 4 curvas conjuntamente, há uma sugestão de que pacientes sem expressão de BT-3 e que não realizaram QTI, sendo tratados com RT inicial, também tiveram pior desfecho de SG.

Estes dados demonstram que a expressão de BT-3 em CTCs é um potencial biomarcador de resistência ao tratamento com QT de indução com taxanos, e que pacientes sem expressão que realizam QTI apresentam excelente desfecho de SG. Estes mesmos pacientes não expressores, ao realizarem RT inicial, sem QTI, não parecem ter os mesmos resultados de SG. Análises retrospectivas demonstram papel semelhante da expressão por IHQ de BT-3 em biópsias de tumores de orofaringe, laringe e hipofaringe localmente avançados submetidos a QT de indução baseada em platina, com menores taxas de resposta e SLP nos alto expressores (KOH et al. 2009).

Os taxanos são agentes citotóxicos cujo mecanismo de ação envolve a inibição de microtúbulos, através da ligação com a β -tubulina e consequente inibição do ciclo celular. Entretanto isoformas da β -tubulina, como a classe III, apresentam resistência a esta ligação (SÈVE et al. 2010). Em outros sítios primários também há evidência de que a expressão de BT-3 por IHQ em biópsias do tumor seja um preditor de resistência à terapia baseada em taxanos. Diversos estudos em câncer de pulmão não pequenas células evidenciam a expressão de BT-3 como preditor de resistência ao tratamento com docetaxel (HAYASHI et al. 2010; KAIRA et al. 2013), paclitaxel (VILMAR et al. 2011; AZUMA et al. 2009) ou alcalóides da vinca, no caso a vinorelbina, também um inibidor de microtúbulos (YANG et al. 2014). O mesmo pode ser observado em tumores de mama (HASEGAWA et al. 2003; YUAN et al. 2012; SHIMADA et al. 2015), próstata (PLOUSSARD et al. 2002) e estômago (HWANG et al. 2013). Nossos dados refletem a literatura, com a expressão de BT-3 sendo um biomarcador de resistência a terapia com taxanos. Entretanto, chama a atenção o desfecho de SG dos não expressores quando tratados com RT inicial, uma vez que há evidências de que a expressão de BT-3 também seja um biomarcador prognóstico, com melhores desfechos para não expressores, independente do tratamento realizado (TERRY et al. 2009; YANG et al. 2014). Portanto os resultados sugerem que pacientes não expressores de β -tubulina III tem melhor sobrevida apenas quando tratados com QT de indução, e que este biomarcador teria potencial indicação para selecionar pacientes candidatos a esta estratégia de tratamento. Novamente, uma vez que o estudo não foi desenhado especificamente para esta análise, os resultados devem ser interpretados com cautela e, apesar da diferença estatística na SG do grupo QTI, trata-se de uma amostra pequena e sujeita a vieses, no qual não foi possível realizar análise multivariada (pela ausência de eventos no braço BT-3 negativo). Portanto, estes dados formulam uma hipótese, do potencial uso clínico deste biomarcador para selecionar pacientes candidatos à terapia de indução.

A taxa de detecção de CTCs após o tratamento foi de 87,6% (57 de 65), com uma mediana de 2,8 CTCs/mL. Apesar de valores menores comparativamente com os números da análise *baseline* (taxa de detecção de 94% e mediana de 3,5 CTC/mL), se levarmos em conta que todos estes pacientes possuem doença não

metastática, foram submetidos a tratamento com intuito curativo, e realizaram a coleta de amostras até 6 semanas após o término do tratamento (a maioria entre 4 e 6 semanas), são taxas de detecção bastante altas. Se analisarmos separadamente, os pacientes no cenário adjuvante, ou seja, sem doença *in loco* no início da radioterapia, têm uma taxa de detecção menor, de 66,6% (8 de 12), também um valor alto tendo em vista o contexto desta coleta, enquanto pacientes tratados no cenário definitivo apresentam taxa de detecção de 85,9% (49 de 53). Existem dados escassos em relação a taxa de detecção de CTCs após tratamento em CCP, com alguns autores analisando a presença de CTCs após o início ou durante o tratamento. BUGLIONE et al. (2012), utilizando a técnica *CellSearch*[®], demonstraram CTCs durante o tratamento em apenas 4 de 73 pacientes (5,5%) enquanto HRISTOZOVA et al. (2011), utilizando uma técnica de citometria de fluxo com enriquecimento positivo por meio da marcação de EpCAM e citoqueratinas, detectaram CTCs após o início do tratamento baseado em radioterapia em 4 de 23 pacientes (17%). Essa diferença se deve provavelmente a diferenças na sensibilidade dos métodos, conforme discutido previamente, uma vez que o ISET é uma técnica independente de marcação de citoqueratinas. Em relação ao potencial impacto da radioterapia nas contagens de CTCs após o tratamento existem resultados controversos com dados em CCP sugerindo que a radioterapia poderia aumentar a prevalência de CTCs após o tratamento (TINHOFER et al. 2012), enquanto dados em câncer de pulmão não pequenas células localizado ou localmente avançado mostrando o inverso, uma redução significativa da detecção de CTCs após RT (DORSEY et al. 2015; FRICK et al. 2018). Nossos dados demonstram que após a RT houve uma redução na mediana de CTCs e uma discreta redução na taxa de detecção, que pode ser relacionada a algum efeito do tratamento, ou a outros mecanismos dependentes da resposta do hospedeiro, como apoptose mecânica ou imuno mediada.

Não houve diferença entre a contagem de CTCs após o tratamento e resposta, com uma média de CTCs/mL de 2,7 para pacientes com resposta completa *versus* 2,4 para pacientes com resposta parcial, doença estável ou progressão ($p=0,486$). Logo, pelo menos do ponto de vista quantitativo, a contagem de CTCs após o tratamento não reflete a resposta alcançada pelo paciente. Do mesmo modo, a análise das CTCs pós tratamento como variável contínua não se mostrou prognóstica para SG

(HR=1,07; IC95%: 0,98-1,16; p=0,100) ou SLP (HR=1,01; IC95%: 0,92-1,10; p=0,804). Em contrapartida, quando avaliamos os pontos de corte da contagem de CTCs em relação aos desfechos, identificamos dois cenários distintos. Pacientes que persistem com CTCs muito altas após o tratamento, acima de 6,6/mL, têm um prognóstico muito ruim, com SG em dois de anos de 30% e SLP em dois anos de 20% *versus* 85,6% e 65,3% respectivamente para aqueles com contagem $\leq 6,6$ /mL. Nesse contexto, a contagem de CTCs acima de 6,6/mL é fator prognóstico independente para SG (HR=0,08; IC95%: 0,02-0,37; p=0,001) e SLP (HR=0,25; IC95%: 0,08-0,77; p=0,015). Um segundo cenário são pacientes que ao término do tratamento apresentam contagens de CTCs muito baixas, menores ou iguais a 1 CTC/mL, apresentando um excelente prognóstico, com SG em dois anos de 100% *versus* 78,3% (p=0,015). Isto reflete, provavelmente, o impacto do tratamento nas contagens de CTCs, mostrando que pacientes que a despeito do tratamento apresentam contagens altas provavelmente não responderam adequadamente e, portanto, apresentam um risco de progressão ou óbito aumentado enquanto pacientes com contagens baixas refletem um grupo com boa resposta e melhor prognóstico. Esta diferença não foi observada quando analisamos as CTCs de maneira contínua, provavelmente por se tratarem de extremos de valor, sendo que estes dados demonstram que após o tratamento o impacto prognóstico das CTCs está relacionado não a seu valor linear contínuo mas a valores polarizados, muito altos (acima de 6,6/mL) ou muito baixos (abaixo de 1 CTC/mL).

A utilização clínica destas informações poderia ser avaliada em estudos clínicos prospectivos e randomizados. Por exemplo, pacientes que persistam com contagens de CTCs altas após o tratamento, e que tenham realizado apenas RT inicial, poderiam ser randomizados para realização ou não de quimioterapia sistêmica de consolidação, na tentativa de melhores desfechos de sobrevida. Embora o racional seja bastante interessante e promissor, ele já foi testado em CCP, especificamente em tumores de nasofaringe e utilizando uma outra técnica de biópsia líquida, porém com resultados negativos. CHAN et al. (2018) randomizaram 104 pacientes portadores de carcinoma indiferenciado de nasofaringe EBV relacionado, com persistência de DNA de EBV plasmático detectável após tratamento de quimiorradioterapia concomitante, para receber tratamento adjuvante com quimioterapia (cisplatina e

gemcitabina por 6 ciclos) *versus* observação. Com um seguimento mediano de 6,6 anos, não houve diferença significativa em sobrevida livre de recidiva em 5 anos entre os pacientes que receberam QT ou não (49,3% x 54,7%; HR=1,09; IC95%: 0,63-1,89; p=0,75). Estes resultados mostram que, para tais pacientes, o pior prognóstico é intrínseco a uma biologia tumoral desfavorável, e que o impacto da intensificação de terapias seja limitado, embora tais estratégias ainda não tenham sido testadas utilizando informações provenientes de CTCs, e este seja um caminho para pesquisas futuras.

A prevalência de ME após o tratamento foi de 20% (13 de 65) e não houve impacto significativo da presença de ME em SG (HR=2,25; IC95%: 0,69-7,32; p=0,177) ou SLP (HR=0,89; IC95%: 0,30-2,61; p=0,841). Dados em câncer de mama metastático demonstram que presença de ME após início de tratamento sistêmico é preditor de piores desfechos (PAOLETTI et al. 2015; WANG et al. 2017). PAOLETTI et al. (2015) analisaram 52 pacientes portadoras de câncer de mama triplo negativo metastático em tratamento com quimioterapia utilizando o *CellSearch*[®]. A prevalência de ME *baseline* foi de 15,3%, e nos dias 15 e 29 após o início da quimioterapia variou de 6,6 a 13,4%, e a presença de ME detectáveis no dia 29 correlacionou-se com piores taxas de resposta (p=0,044) e pior SLP (p=0,009). WANG et al. (2017) analisaram 128 pacientes portadoras de câncer de mama metastático em tratamento quimioterápico, utilizando novamente a técnica *CellSearch*[®], demonstrando uma prevalência de ME *baseline* de 16,2% e de 24,7% no primeiro seguimento após tratamento. A presença de ME após o tratamento correlacionou-se com pior SLP (p=0,037).

Estes estudos foram realizados em populações distintas de nossa amostra, em pacientes com doença metastática em tratamento sistêmico. Não existiam, até o momento, dados do impacto da presença de ME em pacientes com doença não metastática, especificamente de CECP localmente avançados, tratados com intuito curativo. Nesse cenário a simples presença de ME detectáveis após o tratamento não influenciou negativamente o prognóstico destes pacientes, e talvez não seja suficiente para o processo de metastatização. Entretanto, a expressão de biomarcadores nestes ME poderia caracterizar um processo de seleção clonal caracterizando um cenário de biologia mais agressiva de doença. Análise preliminar desta amostra (n=53)

previamente publicada (FANELLI et al. 2017), por exemplo, demonstrou que a presença de ME expressores de TGF- β RI após o tratamento, embora pouco frequente e presente apenas em 1 paciente, era fator prognóstico adverso para SLP, com média de 4,6 meses *versus* 23 meses para expressor e não expressores respectivamente ($p < 0,001$). Estes dados preliminares refletiam um contexto com seguimento ainda curto, com número limitado de pacientes, e não observamos os mesmos resultados na amostra final do estudo. Nas 13 amostras testadas após o tratamento para expressão de TGF- β RI em ME foram encontrados apenas 2 pacientes expressores, que apresentaram numericamente pior SLP mediana e em dois anos (7,5 meses e 50%) comparativamente a não expressores (não atingida e 85,1% respectivamente), entretanto sem significância estatística (HR=5,85; IC95%: 0,72-47,04; $p=0,060$). Estes resultados refletem provavelmente o seguimento mais longo e são influenciados pelo número muito baixo de pacientes expressores, o que limita esta análise, entretanto, estes dados sugerem um pior prognóstico para pacientes com expressão de TGF- β RI em ME após o tratamento.

A análise da expressão de biomarcadores em CTCs após o tratamento corrobora esta hipótese pois pacientes com expressão de TGF- β RI apresentaram uma estimativa de SG em dois anos de 51,4% *versus* 84,4% para não expressores (HR=3,60; IC95%: 1,03-12,59; $p=0,032$). Apesar da significância não ter se mantido na análise multivariada de SG e de não haver diferença significativa em SLP, embora haja uma diferença numérica na estimativa em dois anos, com 45,7% *versus* 69,7% para expressores ou não respectivamente (HR=2,09; IC95%: 0,69-6,27; $p=0,179$), estes resultados apontam para um pior prognóstico e um maior risco de recidiva e óbito para os pacientes com expressão de TGF- β RI em CTCs ou ME após o término do tratamento curativo.

A via do TGF- β tem um papel central no processo de carcinogênese, proliferação e metastatização (SYED 2016). Esse papel, entretanto, é paradoxal, visto que em tecidos normais TGF- β exerce uma supressão tumoral inibindo a transformação celular, porém, com o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, passa a promover a proliferação, através da indução de angiogênese, imunossupressão e indução da EMT (HAQUE e MORRIS 2017). Especificamente em tumores de cabeça e pescoço TGF- β está envolvido no risco de metástase (CHEN

et al. 2001; DU et al. 2016), imuno vigilância (PANG et al. 2018) e resistência à radioterapia (AGOSTINI et al. 2017; POLAT et al. 2017). Um dos mecanismos centrais que esta via utiliza para promoção de migração celular, invasão e metástase é através da indução da EMT. Trata-se de um processo no qual as células tumorais perdem a polaridade celular ápico-basal e adquirem uma conformação fusiforme, característica de células mesenquimais, paralelamente à alteração de biomarcadores epiteliais para mesenquimais (SYED 2016). A avaliação de marcadores de EMT em CTCs ou ME após o término do tratamento traz particular interesse, uma vez que além de ganharem a corrente sanguínea estas células necessitam de habilidades especiais para invadir a matriz extracelular, membrana basal e endotélio vascular, resultando em metástases viáveis, e a EMT seria o mecanismo subjacente a este processo (HANAHAHAN e WEINBERG 2011; UMER et al. 2018). Portanto, pacientes que apresentam estes marcadores após o tratamento, provavelmente passaram por um processo de seleção clonal, e apresentam maior risco de recidiva de doença, sendo potenciais candidatos a alguma estratégia de complementação terapêutica.

A ativação da via do TGF- β está também envolvida em resistência a tratamento de quimioterapia e radioterapia. OSHIMORI et al (2015) avaliaram linhagens de carcinoma epidermóide *in vivo* e demonstraram que a ativação da via TGF- β está envolvida em quimiorresistência. AGOSTINI et al. (2017) demonstraram que polimorfismos no gene TGF- β estão associados a maior risco de recidiva locorregional e óbito após radioterapia, em tumores de laringe. Logo, nesse cenário, a intensificação por tratamentos convencionais pode não ser a melhor alternativa. Estudos *in vitro* sugerem que o tratamento radioterápico possa exercer pressão de seleção e indução da ativação da EMT via TGF- β em linhagens de adenocarcinoma de esôfago, e que a inibição da via possa reverter esse processo (STEINS et al. 2019). BROWN et al. (2017) demonstraram, também *in vitro*, que em linhagens de carcinoma epidermóide a expressão de TGF- β induzia quiescência celular e resistência à quimioterapia e, mais uma vez, a inibição da via era capaz de reverter este estado e consequentemente sensibilizar as células ao tratamento citotóxico.

Portanto, a inibição do TGF- β pode ser uma alternativa promissora nesse contexto. O composto mais estudado até o momento é o Galunersitib (LY2157299), uma pequena molécula inibidora da atividade quinase do TGF- β RI, que mostrou

efetividade em monoterapia em hepatocarcinoma (FAIVRE et al. 2014) e em combinação com gemcitabina em adenocarcinoma de pâncreas (MELISI et al. 2018). Como já mencionado, o TGF- β exerce papel crucial na regulação imune, e especificamente em neoplasias, sua expressão está relacionada à imunossupressão no microambiente tumoral (BATLLE e MASSAGUÉ 2019). Imunoterapia com inibidores de *checkpoint* é efetiva em CEC de cabeça e pescoço metastático (FERRIS et al. 2016; BURTNESS et al. 2018; COHEN et al. 2019), e estudos pré-clínicos demonstram que os efeitos imunológicos do Galunersitib são fortemente potencializados pela associação com inibidores de *checkpoint* (HOLMGAARD et al. 2018; MARIATHASAN et al. 2018; NAKANISHI et al. 2018; TAURIELLO et al. 2018), sendo esta estratégia bastante atraente em CECP, especialmente em pacientes que persistam após o tratamento com potencial ativação da via do TGF- β , na tentativa de minimizar o prognóstico adverso desta situação melhorando os desfechos clínicos. O uso prévio ou concomitante da radioterapia pode, inclusive, potencializar este efeito anti-tumoral, conforme sugerem estudos *in vivo* (RODRÍGUEZ-RUIZ et al. 2019). Em resumo, nossos dados atuais e prévios (FANELLI et al. 2017) sugerem que pacientes com expressão de TGF- β RI em CTCs ou ME após o tratamento apresentam um pior prognóstico, com maior risco de recidiva e óbito, e seriam potenciais candidatos a complementação de tratamento visando melhorar seus desfechos, sendo que terapias inibindo a via do TGF- β , especialmente se associadas à imunoterapia com inibidores de *checkpoint*, são estratégias que merecem ser avaliadas em estudos prospectivos e randomizados nessa situação.

Para avaliar a cinética das CTCs, analisamos inicialmente qualquer queda ou aumento da contagem (delta CTC *baseline* menos CTC pós tratamento negativo ou positivo) com o tratamento e não observamos qualquer impacto em SG (HR=0,69; IC95%: 0,24-1,99; p=0,495) ou SLP (HR=0,90; IC95%: 0,39-2,04; p=0,804). Portanto, sendo que a simples queda ou aumento de CTCs não impactava o desfecho de sobrevida, teorizamos que o valor absoluto de CTCs tivesse algum impacto nesta cinética. Para esta avaliação utilizou-se o delta CTCs através do método de Lausen e Schumacher chegando a um valor de 3,8 CTCs/mL para SG e de 3,2 CTCs/mL para SLP, ou seja, a ocorrência de aumento $\geq 3,8$ CTCs/mL após o tratamento era fator

prognóstico independente de pior SG (HR=0,27; IC95%: 0,08-0,90; p=0,034) enquanto aumento $\geq 3,2$ CTCs/mL de pior SLP (HR=0,37; IC95%: 0,14-0,95; p=0,039).

A avaliação da cinética de CTCs e sua correlação com resposta ao tratamento e desfechos está bem estabelecida em câncer de próstata castração resistente, onde estudos desmonstram a contagem de CTCs como um melhor preditor de desfechos que a variação do PSA, por exemplo (SCHER et al. 2009, 2015; LORENTE et al. 2016; ONSTENK et al. 2016). Também em câncer de mama, a avaliação de CTCs antes e após tratamento adjuvante à cirurgia traz impacto prognóstico negativo em sobrevida livre de recidiva e sobrevida global (PACHMANN et al. 2008; VAN DALUM et al. 2015). Utilizando a técnica ISET, foi demonstrado que cinética desfavorável de CTCs se correlacionava com pior SLP (p=0,02) em 32 pacientes portadores de câncer colorretal metastático K-RAS selvagem (SOUZA E SILVA et al. 2016). Em CEC os dados são mais escassos, com poucos trabalhos desmonstrando correlação entre cinética de CTCs favorável e melhores desfechos. BUGLIONE et al. (2012) demonstrou que queda das contagens de CTCs ou sua ausência ao longo do tratamento correlacionava-se com doença não progressiva (p=0,009), em 43 pacientes com CCP de diversos sítios primários e histologias. INHESTERN et al. (2015) avaliaram 40 pacientes portadores de CEC de cavidade oral com análise de CTCs ao longo do tratamento de QT de indução seguido cirurgia e quimiorradioterapia adjuvante. Dosagens de CTCs acima da mediana em algum momento do tratamento correlacionavam-se com pior SG (p=0,049). Comparativamente a esses resultados, que avaliam a cinética de CTCs através de quedas ou aumento de contagens em qualquer ponto ao longo do tratamento em um número limitado de pacientes, nossos resultados demonstram que aumentos significativos de contagem de CTCs após o término do tratamento curativo, em comparação a dosagem *baseline*, são fatores prognósticos independentes de pior SG e SLP. Mais uma vez, esse cenário, além de refletir uma biologia tumoral extremamente desfavorável, abre uma janela terapêutica na tentativa de melhorar os desfechos, através da potencial intensificação ou complementação do tratamento empregado até o momento. Estudos prospectivos avaliando o impacto da adição de novas terapias nessa população, eventualmente guiados pela expressão de

biomarcadores nas CTCs e ME, são um caminho a ser perseguido buscando maximizar as chances de cura em tumores de cabeça e pescoço localmente avançados.

6 CONCLUSÕES

A taxa de detecção de CTCs em câncer de cabeça e pescoço localmente avançado antes e após o tratamento curativo foi alta e a contagem de CTCs *baseline* foi fator prognóstico independente para sobrevida global, livre de progressão e preditora de maior chance de resposta completa ao tratamento.

Em pacientes submetidos a tratamento definitivo não cirúrgico a presença de microêmbolos detectáveis *baseline* foi fator prognóstico e, juntamente com a contagem de CTCs, potenciais preditores de benefício da quimioterapia de indução.

Contagem de CTCs altas após o tratamento e cinética desfavorável de CTCs foram fatores prognósticos independentes de pior sobrevida global e livre de progressão.

Avaliação de biomarcadores em CTCs e ME através de imunocitoquímica é factível e a expressão de EGFR e β -tubulina III em CTCs ou ME e de MRP-7 em ME *baseline* tem papel prognóstico nesse cenário. Expressão de β -tubulina III em CTCs *baseline* tem potencial papel preditor de resposta à quimioterapia de indução baseada em taxanos e expressão de TGF- β RI em CTCs ou ME após o tratamento se correlaciona com piores desfechos de sobrevida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah EA, Fanelli MF, Souza E Silva V et al. MRP1 expression in CTCs confers resistance to irinotecan-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. **Int J Cancer** 2016; 139: 890-98.

Abdallah EA, Braun AC, Flores BCTCP, et al. The potential clinical implications of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in gastric cancer. **Oncologist** 2019 Mar 7. Epub ahead of print.

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

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.

Adelstein DJ, Li Y, Adams J, et al. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21: 92-8.

Adjei AA, Rowinsky EK. Novel anticancer agents in clinical development. **Cancer Biol Ther** 2003; 2(4 Suppl 1):S5-15.

Agostini LP, Stur E, Garcia FM, et al. ATM, BCL2, and TGF β gene polymorphisms as radiotherapy outcome biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Genet Test Mol Biomarkers** 2017; 21:727-35.

Amdur RJ, Parsons JT, Mendenhall WM, et al. Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the head and neck: an analysis of treatment results and complications. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1989; 16:25-36.

Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. **Cancer Res** 2002; 62:7350-6.

Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **N Engl J Med** 2010; 363:24-35.

Argiris C, Eng C. Epidemiology, staging and screening of head and neck cancer. **Cancer Treat Res** 2003; 114: 15-60.

Antfolk M, Laurell T. Continuous flow microfluidic separation and processing of rare cells and bioparticles found in blood: a review. **Anal Chim Acta** 2017; 965:9-35.

Ashworth TR. A case of cancer in which cell similar to those in the tumours were seen in the blood after death. **Aust Med J** 1869; 14:146-9.

Azuma K, Sasada T, Kawahara A, et al. Expression of ERCC1 and class III beta-tubulin in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel. **Lung Cancer** 2009; 64:326-33.

Bachaud JM, Cohen-Jonathan E, Alzieu C, et al. Combined postoperative radiotherapy and weekly cisplatin infusion for locally advanced head and neck carcinoma: final report of a randomized trial. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1996; 36:999-1004.

Balasubramanian P, Yang L, Lang JC, et al. Confocal images of circulating tumor cells obtained using a methodology and technology that removes normal cells. **Mol Pharm** 2009; 6:1402-8.

Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 2019; 50:924-40.

Bauman JE, Austin MC, Schmidt R, et al. ERCC1 is a prognostic biomarker in locally advanced head and neck cancer: results from a randomised, phase II trial. **Br J Cancer** 2013; 109:2096-105.

Bennett KL, Romigh T, Eng C. Disruption of transforming growth factor-beta signaling by five frequently methylated genes leads to head and neck squamous cell carcinoma pathogenesis. **Cancer Res** 2009; 69:9301-5.

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

Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). **Head Neck** 2005; 27:843-50.

Bithi SS, Vanapalli SA. Microfluidic cell isolation technology for drug testing of single tumor cells and their clusters. **Sci Rep** 2017; 7:41707.

Blanchard P, Bourhis J, Lacas B, et al. Taxane-cisplatin-fluorouracil as induction chemotherapy in locally advanced head and neck cancers: an individual patient data meta-analysis of the meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer group. **J Clin Oncol** 2013; 31:2854-60.

Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, et al. The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1994; 29:243-7.

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

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. **Lancet Oncol** 2010; 11:21-8.

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

Braun AC, de Mello CAL, Corassa M, et al. EGFR expression in circulating tumor cells from high-grade metastatic soft tissue sarcomas. **Cancer Biol Ther** 2018; 19:454-60.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 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.

Brizel DM, Albers ME, Fisher SR, et al. Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. **N Engl J Med** 1998; 338:1798-804.

Brockstein B, Haraf DJ, Rademaker AW, et al. Patterns of failure, prognostic factors and survival in locoregionally advanced head and neck cancer treated with concomitant chemoradiotherapy: a 9-year, 337-patient, multi-institutional experience. **Ann Oncol** 2004; 15:1179-86.

Brown JA, Yonekubo Y, Hanson N, et al. TGF- β -induced quiescence mediates chemoresistance of tumor-propagating cells in squamous cell carcinoma. **Cell Stem Cell** 2017; 21:650-64.

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

Buim ME, Fanelli MF, Souza VS et al. Detection of KRAS mutations in circulating tumor cells from patients with metastatic colorectal cancer. **Cancer Biol Ther** 2015; 16:1289-95.

Burduk PK, Bodnar M, Sawicki P, et al. Expression of metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors 1 and 2 as predictors of lymph node metastases in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head Neck** 2015; 37:418-22.

Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, et al. KEYNOTE-048: Phase 3 study of first-line pembrolizumab (P) for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC). **Ann Oncol** 2108; 29(suppl 8):LBA08. [Presented at the 43rd Congress-ESMO Annual Meeting; 2018 Oct 19-23; Munich-Germay]

Calais G, Alfonsi M, Bardet E, et al. Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:2081-6.

Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, et al. EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. **Ann Oncol** 2008; 19:717-23.

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 ATC, Hui EP, Ngan RKC, et al. Analysis of plasma Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal cancer after chemoradiation to identify high-risk patients for adjuvant chemotherapy: a randomized controlled trial. **J Clin Oncol** 2018; 31:3091-100.

Chang MC, Chang YT, Chen JY, et al. Clinical significance of circulating tumor microemboli as a prognostic marker in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. **Clin Chem** 2016; 62:505-13.

Chaudhary AK, Singh M, Bharti AC, Asotra K, Sundaram S, Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. **J Biomed Sci** 2010; 17:10.

Chen T, Yan W, Wells RG, et al. Novel inactivating mutations of transforming growth factor-beta type I receptor gene in head-and-neck cancer metastases. **Int J Cancer** 2001; 93:653-61.

Chien MH, Lin CW, Cheng CW, Wen YC, Yang SF. Matrix metalloproteinase-2 as a target for head and neck cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets** 2013; 17:203-16.

Chinen L, Mello C, Abdallah E, et al. Isolation, detection, and immunomorphological characterization of circulating tumor cells (CTCs) from patients with different types of sarcoma using isolation by size of tumor cells: A window on sarcoma-cell invasion. **Onco Targets Ther** 2014; 7:1609-17.

Chiu TJ, Chen CH, Chien CY, Li SH, Tsai HT, Chen YJ. High ERCC1 expression predicts cisplatin-based chemotherapy resistance and poor outcome in unresectable squamous cell carcinoma of head and neck in a betel-chewing area. **J Trans Med** 2011; 9:31.

Cho JK, Lee GJ, Kim HD, et al. Differential impact of circulating tumor cells on disease recurrence and survivals in patients with head and neck squamous cell carcinomas: An updated meta-analysis. **PLoS One** 2018; 13:e0203758.

Christensen ME, Therkildsen MH, Hansen BL, et al. Epidermal growth factor receptor expression on oral mucosa dysplastic epithelia and squamous cell carcinomas. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 1992; 249: 243-7.

Chung C, Mirakhur B, Chan E, et al. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. **N Engl J Med** 2008; 358:1109-17.

Chung CH, Ely K, McGavran L, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. **J Clin Oncol** 2006; 24:4170-6.

Cohen EE, Karrison TG, Kocherginsky M, et al. Phase III randomized trial of induction chemotherapy in patients with N2 or N3 locally advanced head and neck cancer. **J Clin Oncol** 2014; 32:2735-43.

Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. **Lancet** 2019; 393:156-67.

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere A, et al. Precisely defining high-risk operable head and neck tumors based on RTOG #85-03 and #88-24: targets for postoperative radiochemotherapy? **Head Neck** 1998; 20:588-94.

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, et al. Radiation Therapy Oncology Group 9501/Intergroup. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med** 2004; 350:1937-44.

Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). **J Royal Stat Soc** 1972; Series B, 34:187-220.

Cullen KJ, Schumaker L, Nikitakis N, et al. β - Tubulin-II expression strongly predicts outcome in patients receiving induction chemotherapy for locally advanced squamous carcinoma of the head and neck: a comparison analysis of the TAX 324 Trial. **J Clin Oncol** 2009; 27:6222-8.

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N Engl J Med** 2007; 356:1944-56.

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

Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, et al. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). **Head Neck Oncol** 2010; 2:15.

Domanitskaya N, Wangari-Talbot J, Jacobs J, et al. Abcc10 status affects mammary tumour growth, metastasis, and docetaxel treatment response. **Br J Cancer** 2014; 111:696-707.

Domenge C, Hill C, Lefebvre JL, et al. Randomized trial of neoadjuvant chemotherapy in oropharyngeal carcinoma. French Groupe d'Etude des Tumeurs de la Tête et du Cou (GETTEC). **Br J Cancer** 2000; 83:1594-8.

Dorsey JF, Kao GD, MacArthur KM, et al. Tracking viable circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients undergoing definitive radiation therapy: pilot study results. **Cancer** 2015; 121:139-49.

Du L, Chen X, Cao Y, et al. Overexpression of PIK3CA in murine head and neck epithelium drives tumor invasion and metastasis through PDK1 and enhanced TGF β signaling. **Oncogene** 2016; 35:4641-52.

Dyavanagoudar S, Kale A, Bhat K, Hallikerimath S. Reverse transcriptase polymerase chain reaction study to evaluate dissemination of cancer cells into circulation after incision biopsy in oral squamous cell carcinoma. **Indian J Dent Res** 2008; 19:315-9.

Einsenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). **Eur J Cancer** 2009; 45:228-47.

Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:2078-93.

Elshimali YI, Grody WW. The clinical significance of circulating tumor cells in the peripheral blood. **Diag Mol Pathol** 2006; 15:187-94.

Faivre SJ, Santoro A, Kelley RK, et al. A phase 2 study of a novel transforming growth factor-beta (TGF- β 1) receptor I kinase inhibitor, LY2157299 monohydrate (LY), in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). **J Clin Oncol** 2014; 32(3 suppl):LBA173. [Presented at the ASCO Annual Meeting, 2014 May 30 to June 3, Chicago, Illinois]

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.

Fehm T, Muller V, Alix-Panabières C, Pantel K. Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance. **Breast Cancer Res** 2008; 10 Suppl 1:S1.

Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med** 2016; 375:1856-67.

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

Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. **N Engl J Med** 2003; 349:2091-8.

Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, et al. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. **J Clin Oncol** 2013; 31:845-52.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat Med** 1995; 1:27-31.

Frattini M, Saletti P, Romagnani E, et al. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. **Br J Cancer** 2007; 97:1139-45.

Frick MA, Kao GD, Aguarin L, et al. Circulating tumor cell assessment in presumed early stage non-small cell lung cancer patients treated with stereotactic body radiation therapy: a prospective pilot study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2018; 102:536-42.

Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:362-74.

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

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

Fukai J, Yokote H, Yamanaka R, et al. EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the human glioma U251 cell line. **Mol Cancer Ther** 2008; 7:2768-78.

Gazzaniga P, Gradilone A, Naso G, et al. Chemoresistance profile of circulating tumor cells: Toward a clinical benefit? **Int J Cancer** 2008; 123:1730-2.

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** 2010; 126:2437-47.

Geoffrois L, Martin L, De Raucourt D, et al. Induction chemotherapy followed by cetuximab radiotherapy is not superior to concurrent chemoradiotherapy for head and neck carcinomas: results of the GORTEC 2007-02 Phase III Randomized Trial. **J Clin Oncol** 2018; 36:3077-83.

George TJ, Laplant KD, Walden EO, et al. Managing cetuximab hypersensitivity-infusion reactions: incidence, risk factors, prevention, and retreatment. **J Support Oncol** 2010; 8:72-7.

Ghi MG, Paccagnella A, Ferrari D, et al. GSTTC (Gruppo di Studio Tumori della Testa e del Collo) Italian Study Group. Induction TPF followed by concomitant treatment versus concomitant treatment alone in locally advanced head and neck cancer: a phase II-III trial. **Ann Oncol** 2017; 28:2206-12.

Gillison ML, Trotti AM, Harris J, et al. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. **Lancet** 2019; 393:40-50.

Giro C, Berger B, Bölke E, et al. High rate of severe radiation dermatitis during radiation therapy with concurrent cetuximab in head and neck cancer: results of a survey in EORTC institutes. **Radiother Oncol** 2009; 90:166-71.

Giuliano M, Shaikh A, Lo HC, et al. Perspective on circulating tumor cell clusters: why it takes a village to metastasize. **Cancer Res** 2018; 78:845-52.

Grambsch PM, Therneau TM. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. **Biometrika** 1994; 81:515-26.

Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. **Cancer Res** 1993; 53:3579-84.

Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, et al. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer** 1996; 78:1284-92.

Grisanti S, Almici C, Consoli F, et al. Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: prognostic and predictive significance. **Plos One** 2014; 9:e103918.

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

Guney K, Yoldas B, Ozbilim G, Derin AT, Sarihan S, Balkan E. Detection of micrometastatic tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. A possible predictor of recurrences? **Saudi Med J** 2007; 28:216-20.

Haddad R, O'Neill A, Rabinowits G, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy (sequential chemoradiotherapy) versus concurrent chemoradiotherapy alone in locally advanced head and neck cancer (PARADIGM): a randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2013; 14:257-64.

Haddad RI, Massarelli E, Lee JJ, et al. Weekly paclitaxel, carboplatin, cetuximab, and cetuximab, docetaxel, cisplatin, and fluorouracil, followed by local therapy in previously untreated, locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. **Ann Oncol** 2019; 30:471-7.

Hama T, Yuza Y, Saito Y, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncologist** 2009; 14:900-8.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Haque S, Morris JC. Transforming growth factor- β : a therapeutic target for cancer. **Hum Vaccin Immunother** 2017; 13:1741-50.

Hasegawa S, Miyoshi Y, Egawa C, et al. Prediction of response to docetaxel by quantitative analysis of class I and III beta-tubulin isotype mRNA expression in human breast cancers. **Clin Cancer Res** 2003; 9:2992-7.

Hayashi Y, Kuriyama H, Umezu H, et al. Class III beta-tubulin expression in tumor cells is correlated with resistance to docetaxel in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. **Intern Med** 2009; 48:203-8.

Hayes M, Lan C, Yan J, et al. ERCC1 expression and outcomes in head and neck cancer treated with concurrent cisplatin and radiation. **Anticancer Res** 2011; 31:4135-9.

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

Heun J, Holen K. Treatment with panitumumab after a severe infusion reaction to cetuximab in a patient with metastatic colorectal cancer: a case report. **Clin Colorectal Cancer** 2007; 6:529-31.

Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, et al. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. **J Clin Oncol** 2008; 26:3351-7.

Hitt R, Grau J, Lopez-Pousa A, et al. Randomized phase III trial comparing induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy versus chemoreadiotherapy alone as treatment of unresectable head and neck cancer. **Ann Oncol** 2014; 25:216-25.

Holmgaard RB, Schaer DA, Li Y, et al. Targeting the TGFb pathway with galunisertib, a TGFbRI small molecule inhibitor, promotes anti-tumor immunity leading to durable, complete responses, as monotherapy and in combination with checkpoint blockade. **J Immunother Cancer** 2018; 6:47.

Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchaveleva I, Belinsky MG, Kruh GD. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. **Cancer Res** 2004; 64:4927-30.

Hopper-Borge EA, Churchill T, Paulose C, et al. Contribution of Abcc10 (Mrp7) to in vivo paclitaxel resistance as assessed in Abcc10(-/-) mice. **Cancer Res** 2011; 71:3649-57.

Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2012; 30:525-32.

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

Hsieh JC, Lin HC, Huang CY, et al. Prognostic value of circulating tumor cells with podoplanin expression in patients with locally advanced or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck** 2015; 37:1448-55.

Huang DT, Johnson CR, Schmidt-Ullrich R, et al. Postoperative radiotherapy in head and neck carcinoma with extracapsular lymph node extension and/or positive resection margins: a comparative study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1992; 23:737-42.

Hwang JE, Hong JY, Kim K, et al. Class III β -tubulin is a predictive marker for taxane-based chemotherapy in recurrent and metastatic gastric cancer. **BMC Cancer** 2013; 13:431.

Inhestern J, Oertel K, Stemmann V, et al. Prognostic role of circulating tumor cells during induction chemotherapy followed by curative surgery combined with postoperative radiotherapy in patients with locally advanced oral and oropharyngeal squamous cell cancer. **PLoS One** 2015; 10:e0132901.

Janoray G, Pointreau Y, Garaud P, et al. Long-term results of a multicenter randomized phase iii trial of induction chemotherapy with Cisplatin, 5-fluorouracil, ± Docetaxel for larynx preservation. **J Natl Cancer Inst** 2015; 108:djv368.

Jatana KR, Balasubramanian P, Lang JC, et al. Significance of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: initial results. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2010; 136:1274-9.

Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Jeremic B, Shibamoto Y, Milicic B, et al. Hyperfractionated radiation therapy with or without concurrent low-dose daily cisplatin in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a prospective randomized trial. **J Clin Oncol** 2000; 18:1458-64.

Jun HJ, Ahn MJ, Kim HS, et al. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. **Br J Cancer** 2008; 99:167-72.

Kaira K, Takahashi T, Murakami H, et al. The role of β III-tubulin in non-small cell lung cancer patients treated by taxane-based chemotherapy. **Int J Clin Oncol** 2013; 18:371-9.

Kang CH, Jang BG, Kim DW, et al. The prognostic significance of ERCC1, BRCA1, XRCC1, and β III-tubulin expression in patients with non-small cell lung cancer treated by platinum- and taxane-based neoadjuvant chemotherapy and surgical resection. **Lung Cancer** 2010; 68:478-83.

Kawada T, Takahashi H, Sakakura K, et al. Circulating tumor cells in patients with head neck squamous cell carcinoma: Feasibility of detection and quantification. **Head Neck** 2017; 39:2180-6.

Keren S, Shoude Z, Lu Z, Beibei Y. Role of EGFR as a prognostic factor for survival in head and neck cancer: a meta-analysis. **Tumour Biol** 2014; 35:2285-95.

Khambata-Ford S, Harbison CT, Hart LL, et al. Analysis of potential predictive markers of cetuximab benefit in BMS099, a phase III study of cetuximab and first-line taxane/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:918-27.

Kathawala RJ, Wei L, Anreddy N, et al. The small molecule tyrosine kinase inhibitor NVP-BHG712 antagonizes ABCC10-mediated paclitaxel resistance: a preclinical and pharmacokinetic study. **Oncotarget** 2015; 6:510-21.

Khoja L, Shenjere P, Hodgson C et al. Prevalence and heterogeneity of circulating tumour cells in metastatic cutaneous melanoma. **Melanoma Res** 2014; 24:40-6.

Kies MS, Holsinger FC, Lee JJ, et al. Induction chemotherapy and cetuximab for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: results from a phase II prospective trial. **J Clin Oncol** 2010; 28:8-14.

Knobloch TJ, Lynch MA, Song H, et al. Analysis of TGF-beta type I receptor for mutations and polymorphisms in head and neck cancers. **Mutat Res** 2001; 479:131-9.

Koh Y, Kim TM, Jeon YK, et al. Class III β -tubulin, but not ERCC1, is a strong predictive and prognostic marker in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. **Ann Oncol** 2009; 20:1414-9.

Krebs MG, Hou JM, 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.

Kuang YH, Shen T, Chen X, et al. Lapatinib and erlotinib are potent reversal agents for MRP7 (ABCC10)-mediated multidrug resistance. **Biochem Pharmacol** 2010; 79:154-61.

Kulasinghe A, Kapeleris J, Kimberley R, et al. The prognostic significance of circulating tumor cells in head and neck and non-small cell lung cancer. **Cancer Med** 2018; 7:5910-9.

Langer CJ. Exploring biomarkers in head and neck cancer. review. **Cancer** 2012; 118:3882-92.

Laramore GE, Scott CB, al-Sarraf M, et al. Adjuvant chemotherapy for resectable squamous cell carcinomas of the head and neck: report on Intergroup Study 0034. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1992; 23:705-13.

Lausen B, Schumacher M. Maximally selected rank statistics. **Biometrics** 1992; 48:73-85.

Liang K, Ang KK, Milas L, et al. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2003; 57:246-54.

Licitra L, Mesia R, Rivera F, et al. Evaluation of EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy in the first-line treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: EXTREME study. **Ann Oncol** 2011; 22: 1078-87.

Licitra L, Störkel S, Kerr KM, et al. Predictive value of epidermal growth factor receptor expression for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with head and neck and colorectal cancer: analysis of data from the EXTREME and CRYSTAL studies. **Eur J Cancer** 2013; 49:1161-8.

Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. **Cancer Res** 2006; 66:3992-5.

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

Liu RR, Li MD, Li T, Tan Y, Zhang M, Chen JC. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) protein expression and laryngeal cancer prognosis: a meta analysis. **Int J Clin Exp Med** 2015; 8:2261-6.

Long E, Ilie M, Bence C, et al. High expression of TRF2, SOX10, and CD10 in circulating tumor microemboli detected in metastatic melanoma patients. A potential impact for the assessment of disease aggressiveness. **Cancer Med** 2016; 5:1022-30.

Lord RV, 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.

Lorente D, Olmos D, Mateo J, et al. Decline in circulating tumor cell count and treatment outcome in advanced prostate cancer. **Eur Urol** 2016; 70:985-92.

Lotfi A, Mohammadi G, Saniee L, Mousaviagdas M, Chavoshi H, Tavassoli A. Serum Level of Matrix Metalloproteinase-2 and - 9 in Patients with Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Clinical Significance. **Asian Pac J Cancer Prev** 2015; 16):6749-51.

Lu SL, Herrington H, Reh D, et al. Loss of transforming growth factor-beta type II receptor promotes metastatic head and neck cancer squamous cell carcinoma. **Genes Dev** 2006; 20:1331-42.

Lundahl RE, Foote RL, Bonner JA, et al. Combined neck dissection and postoperative radiation therapy in the management of the high-risk neck: a matched-pair analysis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1998; 40:529-34.

Lurje G, Schiesser M, Claudius A, et al. Circulating tumor cells in gastrointestinal malignancies current techniques and clinical implications. **J Oncol** 2010; 2010:392652.

Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, et al. TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. **Nature** 2018; 554:544-8.

Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. **Nat Rev Clin Oncol** 2010; 7:693-701.

Mehanna H, Robinson M, Hartley A, et al; De-ESCALaTE HPV Trial Group. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. **Lancet** 2019; 393:51-60.

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.

Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21:2787-99.

Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. **Clin Cancer Res** 2004; 10:8152-62.

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

Mu Z, Wang C, Ye Z, et al. Prospective assessment of the prognostic value of circulating tumor cells and their clusters in patients with advanced-stage breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2015; 154:563-71.

Muller V, Hayes DF, Pantel K. Recent translational research: circulating tumor cells in breast cancer patients. **Breast Cancer Res** 2006; 8:110-11

Mukai M. Occult neoplastic cells and malignant microaggregates in lymph node sinuses: review and hypothesis. **Oncol Rep** 2005; 14:173-5.

Nakanishi Y, Duran A, L'Hermitte A, et al. Simultaneous Loss of Both Atypical Protein Kinase C Genes in the Intestinal Epithelium Drives Serrated Intestinal Cancer by Impairing Immunosurveillance. **Immunity** 2018; 49:1132-47.e7.

Naramoto H, Uematsu T, Uchihashi T, et al. Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines. **Int J Oncol** 2007; 30:393-401.

Nichols AC, Lowes LE, Szeto CC, et al. Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the cellsearch system. **Head Neck** 2012; 34:1440-4.

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. **Eur J Cancer** 2001; 37:(Suppl 4):S9-S15.

Noronha V, Joshi A, Patil VM, et al. Once-a-week versus once-every-3-weeks cisplatin chemoradiation for locally advanced head and neck cancer: a phase iii randomized noninferiority trial. **J Clin Oncol** 2018; 36:1064-72.

O'Byrne KJ, Bondarenko I, Barrios C, et al. Molecular and clinical predictors of outcome for cetuximab in non-small cell lung cancer (NSCLC): data from the FLEX study. **J Clin Oncol** 2009; 27(15_suppl):A8007. [Presented at the ASCO Annual Meeting 2009; 29 May to 2 June, Orlando-Florida]

Oguri T, Ozasa H, Uemura T, et al. MRP7/ABCC10 expression is a predictive biomarker for the resistance to paclitaxel in non-small cell lung cancer. **Mol Cancer Ther** 2008; 7:1150-5.

Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. **N Engl J Med** 2006; 355:983-91.

Onstenk W, de Klaver W, de Wit R, Lolkema M, Foekens J, Sleijfer S. The use of circulating tumor cells in guiding treatment decisions for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. **Cancer Treat Rev** 2016; 46:42-50.

Oshimori N, Oristian D, Fuchs E. TGF- β promotes heterogeneity and drug resistance in squamous cell carcinoma. **Cell** 2015; 160:963-76.

Paccagnella A, Orlando A, Marchiori C, et al. Phase III trial of initial chemotherapy in stage III or IV head and neck cancers: a study by the Gruppo di Studio sui Tumori della Testa e del Collo. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:265-72.

Paccagnella A, Ghi MG, Loreggian L, et al. Gruppo di Studio Tumori della Testa e del Collo XRP 6976 F/2501 Study. Concomitant chemoradiotherapy versus induction docetaxel, cisplatin and 5 fluorouracil (TPF) followed by concomitant chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer: a phase II randomized study. **Ann Oncol** 2010; 21:1515-22.

Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. **J Clin Oncol** 2008; 26:1208-15.

Pajonk F, Schlessmann S, Guttenberger R, et al. Epithelial cells in the peripheral blood of patients with cancer of the head and neck: incidence, detection and possible clinical significance. **Radiother Oncol** 2001; 59:213-7.

Pang X, Tang YL, Liang XH. Transforming growth factor- β signaling in head and neck squamous cell carcinoma: insights into cellular responses. **Oncol Lett** 2018; 16:4799-806.

Paoletti C, Li Y, Muñiz MC, et al. Significance of circulating tumor cells in metastatic triple-negative breast cancer patients within a randomized, phase II Trial: TBCRC 019. **Clin Cancer Res** 2015; 21:2771-9.

Partridge M, Brakenhoff R, Phillips E, et al. Detection of rare disseminated tumor cells identifies head and neck cancer patients at risk of treatment failure. **Clin Cancer Res** 2003; 9:5287-94.

Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection; clinical impact and future directions. **Cancer Lett** 2007; 253:180-204.

Personeni N, Fieuws S, Piessevaux H, et al. Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study. **Clin Cancer Res** 2008; 14:5869-76

Peters LJ, Goepfert H, Ang KK, et al. Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of a prospective randomized trial. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1993; 26:3-11.

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

Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. **Radiother Oncol** 2009; 92:4-14.

Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. **Lancet Oncol** 2012; 13:33-42.

Ploussard G, Terry S, Maillé P, et al. Class III beta-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy. **Cancer Res** 2010; 70:9253-64.

Polat B, Kaiser P, Wohlleben G, et al. Perioperative changes in osteopontin and TGFβ1 plasma levels and their prognostic impact for radiotherapy in head and neck cancer. **BMC Cancer** 2017; 17:6.

Pointreau Y, Garaud P, Chapet S, et al. Randomized trial of induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil with or without docetaxel for larynx preservation. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:498-506.

Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. **N Engl J Med** 2007; 357:1705-15.

Riethdorf S, Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. **Pathobiology** 2008a; 75:140-148.

Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. **Int J Cancer** 2008b; 123:1991-2006.

Rodríguez-Ruiz ME, Rodríguez I, Mayorga L, et al. TGF β blockade enhances radiotherapy abscopal efficacy effects in combination with anti-PD1 and anti-CD137 immunostimulatory monoclonal antibodies. **Mol Cancer Ther** 2019; 18:621-31.

Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. **N Engl J Med** 2009; 361:958-67.

Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. **Head Neck** 2006; 28:639-48.

Rydlova M, Holubec L Jr, Ludvikova M Jr, et al. Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. **Anticancer Res** 2008; 28:1389-97.

Scher HI, Jia X, de Bono JS, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. **Lancet Oncol** 2009; 10:233-9.

Scher HI, Heller G, Molina A, et al. Circulating tumor cell biomarker panel as an individual-level surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. **J Clin Oncol** 2015; 33:1348-55.

Schoenfeld DA, Richter JR. Nomograms for calculating the number of patients needed for a clinical trial with survival as an endpoint. **Biometrics** 1982; 38:163-70.

Sève P, Reiman T, Dumontet C. The role of betaIII tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer** 2010; 67:136-43.

Shimada K, Ishikawa T, Kita K, et al. Neoadjuvant docetaxel/cyclophosphamide in triple-negative breast cancer: predictive value of class III- β tubulin and non-basal subtype. **Anticancer Res** 2015; 35:907-12.

Souza e Silva V, Chinen LT, 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.

Spiliotaki M, Mavroudis D, Kapranou K, et al. Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy. **Breast Cancer Res** 2014; 16:485.

Steins A, Ebbing EA, Creemers A, et al. Chemoradiation induces epithelial-to-mesenchymal transition in esophageal adenocarcinoma. **Int J Cancer** 2019 Apr 24. [Epub ahead of print]

Strieter RM. Masters of angiogenesis. **Nat Med** 2005; 11:925-7.

Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. **Clin Cancer Res** 2006; 12:5064-73.

Suzuki A, Sekiya S, Gunshima E, et al. EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. **Lab Invest** 2010; 90:1425-36.

Syed V. TGF- β Signaling in Cancer. **J Cell Biochem** 2016; 117:1279-87.

Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, et al. TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. **Nature** 2018; 554:538-43.

Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, et al. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:2164-70.

Terry S, Ploussard G, Allory Y, et al. Increased expression of class III beta-tubulin in castration-resistant human prostate cancer. **Br J Cancer** 2009; 101:951-6.

Thatcher N, Hirsch FR, Luft AV, et al; SQUIRE Investigators. Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2015; 16:763-74.

Tinhofer I, Hristozova T, Stromberger C, et al. Monitoring of circulating tumor cells and their expression of EGFR/phospho-EGFR during combined radiotherapy regimens in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2012; 83:e685-90.

Tinhofer I, Konschak R, Stromberger C, et al. Detection of circulating tumor cells for prediction of recurrence after adjuvant chemoradiation in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **Ann Oncol** 2014; 25:2042-7.

Toyoshima T, Vairaktaris E, Nkenke E, et al. Hematogenous cytokeratin 20 mRNA detection has prognostic impact in oral squamous cell carcinoma: preliminary results. **Anticancer Res** 2009; 29:291-7.

Trifiletti DM, Smith A, Mitra N, et al. Beyond positive margins and extracapsular extension: evaluating the utilization and clinical impact of postoperative chemoradiotherapy in resected locally advanced head and neck cancer. **J Clin Oncol** 2017; 35:1550-60.

Tsuzuki H, Fujieda S, Sunaga H, Sugimoto C, Tanaka N, Saito H. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Lett** 1998; 126:89-95.

Umer M, Vaidyanathan R, Nguyen NT, Shiddiky MJA. Circulating tumor microemboli: Progress in molecular understanding and enrichment technologies. **Biotechnol Adv** 2018; 36:1367-89.

Van Dalum G, van der Stam GJ, Tibbe AG, et al. Circulating tumor cells before and during follow-up after breast cancer surgery. **Int J Oncol** 2015; 46:407-13.

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

Vilmar AC, Santoni-Rugiu E, Sørensen JB. Class III β -tubulin in advanced NSCLC of adenocarcinoma subtype predicts superior outcome in a randomized trial. **Clin Cancer Res** 2011; 17:5205-14.

Vona G, Estepa L, Beroud C, et al. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer. **Hepatology** 2004; 39: 792-7.

Wang C, Mu Z, Chervoneva I, et al. Longitudinally collected CTCs and CTC-clusters and clinical outcomes of metastatic breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2017; 161:83-94.

Wang Z, Cui K, Xue Y, Tong F, Li S. Prognostic value of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. **Med Oncol** 2015; 32:164.

Warta R, Theile D, Mogler C, et al. Association of drug transporter expression with mortality and progression-free survival in stage IV head and neck squamous cell carcinoma. **PLoS One** 2014; 9:e108908.

Wendt TG, Grabenbauer GG, Rodel CM, et al. Simultaneous radiochemotherapy versus radiotherapy alone in advanced head and neck cancer: a randomized multicenter study. **J Clin Oncol** 1998; 16: 1318-24.

White RA, Malkoski SP, Wang XJ. TGF β signaling in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncogene** 2010; 29:5437-46.

Winter SC, Stephenson SA, Subramaniam SK, et al. Long-term survival following the detection of circulating tumour cells in head and neck squamous cell carcinoma. **BMC Cancer** 2009; 9:424.

Wirtschafter A, Benninger MS, Moss TJ, Umiel T, Blazoff K, Worsham MJ. Micrometastatic tumor detection in patients with head and neck cancer: a preliminary report. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2002; 128:40-3.

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. **Nature** 1994; 370:341-7.

Wu XL, Tu Q, Faure G, Gallet P, Kohler C, Bittencourt Mde C. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep** 2016; 6:20210.

Xie T, Geng J, Wang Y, et al. FOXM1 evokes 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer depending on ABCC10. **Oncotarget** 2017; 8:8574-89.

Xuelei M, Jingwen H, Wei D, Hongyu Z, Jing Z, Changle S, Lei L. ERCC1 plays an important role in predicting survival outcomes and treatment response for patients with HNSCC: a meta-analysis. **Oral Oncol** 2015; 51:483-92.

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.

Yang YL, Luo XP, Xian L. The prognostic role of the class III β -tubulin in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients receiving the taxane/vinorebine-based chemotherapy: a meta-analysis. **PLoS One** 2014; 9:e93997.

Yuan SF, Zhu LJ, Zheng WE, et al. Expression of β -tubulin III and survivin in advance stage breast cancer correlates with chemotherapeutic effects of docetaxel. **Asian Pac J Cancer Prev** 2012; 13:361-5.

Zelevsky MJ, Harrison LB, Fass DE, et al. Postoperative radiation therapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx: impact of therapy on patients with positive surgical margins. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1993; 25:17-21.

Zhang D, Zhao L, Zhou P, et al. Circulating tumor microemboli (CTM) and vimentin⁺ circulating tumor cells (CTCs) detected by a size-based platform predict worse prognosis in advanced colorectal cancer patients during chemotherapy. **Cancer Cell Int** 2017; 17:6.

Zhang H, Gong S, Liu Y, et al. Enumeration and molecular characterization of circulating tumor cell using an in vivo capture system in squamous cell carcinoma of head and neck. **Chin J Cancer Res** 2017a; 29:196-203.

Zhang H, Patel A, Wang YJ, et al. The BTK inhibitor ibrutinib (PCI-32765) overcomes paclitaxel resistance in ABCB1- and ABCC10-overexpressing cells and tumors. **Mol Cancer Ther** 2017b; 16:1021-30.

Zhao H, Huang Y, Shi J, Dai Y, Wu L, Zhou H. ABCC10 Plays a Significant Role in the Transport of Gefitinib and Contributes to Acquired Resistance to Gefitinib in NSCLC. **Front Pharmacol** 2018; 9:1312.

Zheng X, Fan L, Zhou P, et al. Detection of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in gastric cancer. **Transl Oncol** 2017; 10:431-41.

Zhong LP, Zhang CP, Ren GX, et al. Randomized phase III trial of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and fluorouracil followed by surgery versus up-front surgery in locally advanced resectable oral squamous cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2013; 31:744-51.

Zhou L, Dicker DT, Matthew E, El-Deiry WS, Alpaugh RK. Circulating tumor cells: silent predictors of metastasis. **F1000Res** 2017; 6. pii: F1000 Faculty Rev-1445.

Zorat PL, Paccagnella A, Cavaniglia G, et al. Randomized phase III trial of neoadjuvant chemotherapy in head and neck cancer: 10-year follow-up. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:1714-7.

Zumsteg ZS, Luu M, Kim S, et al. Quantitative lymph node burden as a 'very-high-risk' factor identifying head and neck cancer patients benefiting from postoperative chemoradiation. **Ann Oncol** 2019; 30:76-84.

Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO ESTUDO: DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES
E SUA CORRELAÇÃO COM EVOLUÇÃO CLÍNICA EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

Investigadores Responsáveis: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

Dr. Thiago Bueno de Oliveira

Dr. Ulisses Ribaldo Nicolau

Dr. Luiz Paulo Kowalski

Dr. Marcello Ferretti Fanelli

Nome do (a) Voluntário (a) : ____

RGH:

Por favor, leia cuidadosamente este formulário, 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 formulário. A sua assinatura significa que recebeu as informações necessárias e que deseja participar deste estudo.

OBJETIVOS DO ESTUDO

Usar um equipamento laboratorial novo para detectar células tumorais circulantes (são células que se desprendem do tumor) no sangue periférico e correlacionar seus níveis com: marcadores tumorais sanguíneos, observados pelo exame de sangue que você faz a pedido do seu médico;
resposta ao tratamento (verificaremos se há diminuição dos níveis dessas células durante e após o seu tratamento);

achado de mudanças no exame de sangue que ajudem a prever a resistência a drogas usadas no seu tratamento;
tempo de vida após o tratamento.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Ao concordar em participar deste estudo, você será submetido a seis coletas de sangue (aproximadamente 8 mL) nos seguintes momentos: até 4 semanas antes do início do tratamento radioterápico, até 6 semanas após seu término e a cada 3 meses por 12 meses de seguimento.

Em paralelo à análise do sangue, o material do seu tumor primário será utilizado para análise da expressão de marcadores de resistência a drogas.

A 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. Nenhum dano imediato ou tardio, que comprometa a sua saúde, poderá ser decorrente deste estudo.

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 cuidados serão tomados para reduzir o risco, entre eles a 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, nada precisa ser feito, devendo-se 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 ainda está sendo estudada, não havendo nenhum prejuízo para o sucesso das condutas médicas outras aos quais você esteja se submetendo.

BENEFÍCIOS

Não haverá benefícios de qualquer espécie para os voluntários, 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 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 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 dos pesquisadores: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189-5000, ramal 2779).

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para os voluntários 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. Contudo, seus direitos relativos a indenizações frente aos danos previstos ou não na pesquisa estão resguardados.

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 2779). Se a pesquisadora 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 07:00 às 18:00h e de sexta- feira das 07:00 às 16:00h (Telefone 2189-5020; endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211- Liberdade- São Paulo, SP).

Você receberá cópia deste documento e o original será arquivado no prontuário do médico. Somente assine este documento se consentir integralmente com seus termos.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós lhe estimulamos a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Se tiver perguntas relacionadas aos seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo. Entendo que não serei submetido a nenhum exame adicional e não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____/_____/_____
Assinatura do (a) voluntário (a) dia mês ano

Nome do (a) voluntário (a) - letra de forma

_____/_____/_____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____/_____/_____

(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

Apêndice 2 - Características Demográficas e Sobrevida

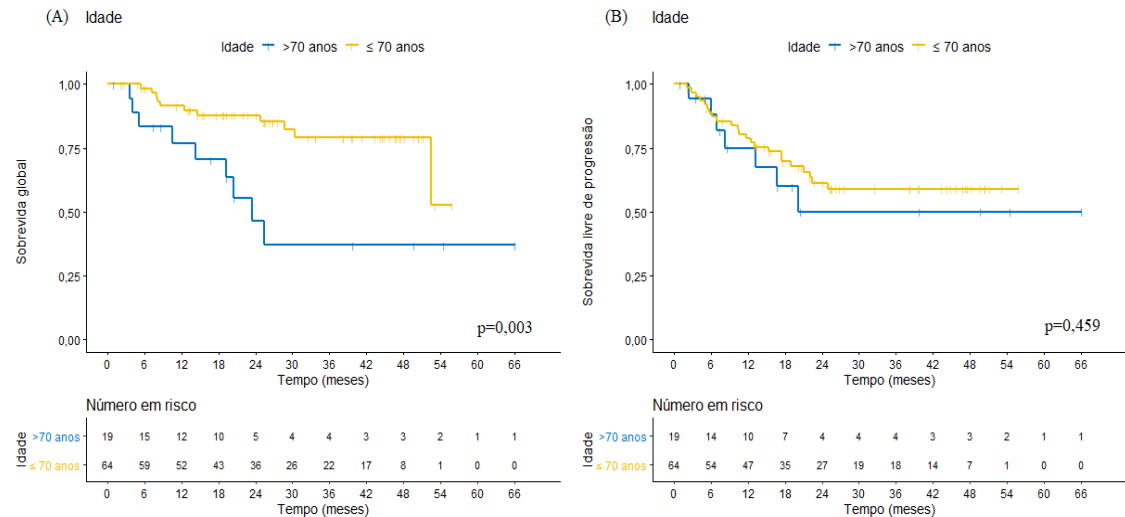


Figura 46 - Curvas de sobrevida de Kaplan Meier para idade (> 70 anos x ≤ 70 anos) e sobrevida global (A) e livre de progressão (B).

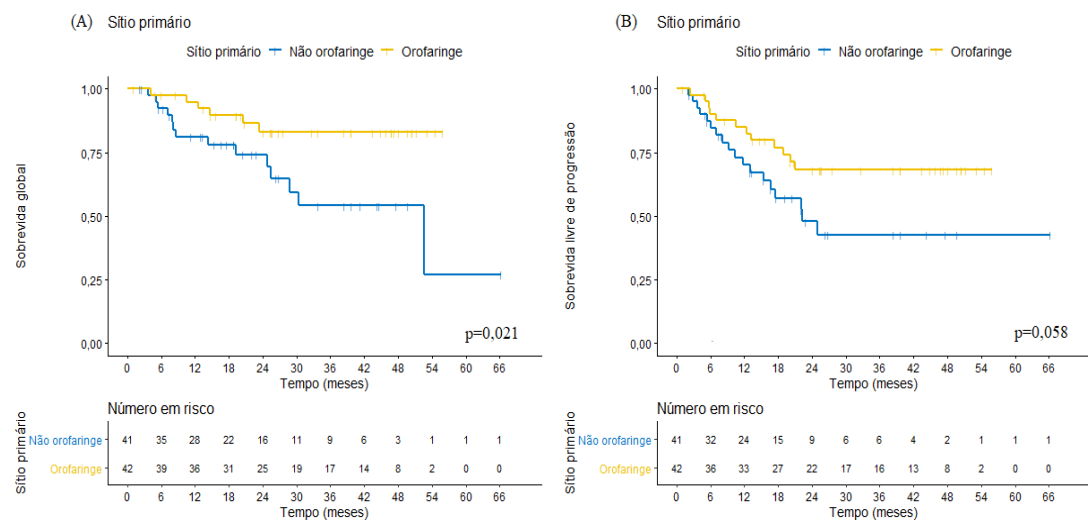


Figura 47 - Curvas de sobrevida de Kaplan Meier para sítio primário (orofaringe x não-orofaringe) e sobrevida global (A) e livre de progressão (B).

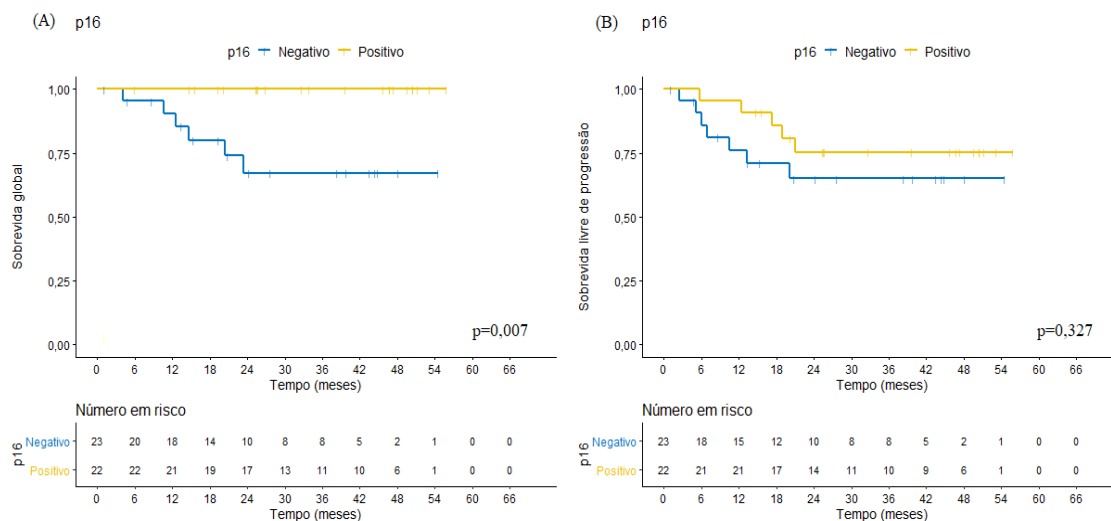


Figura 48 - Curvas de sobrevida de Kaplan Meier para status p16 (positivo x negativo ou desconhecido) e sobrevida global (A) e livre de progressão (B).

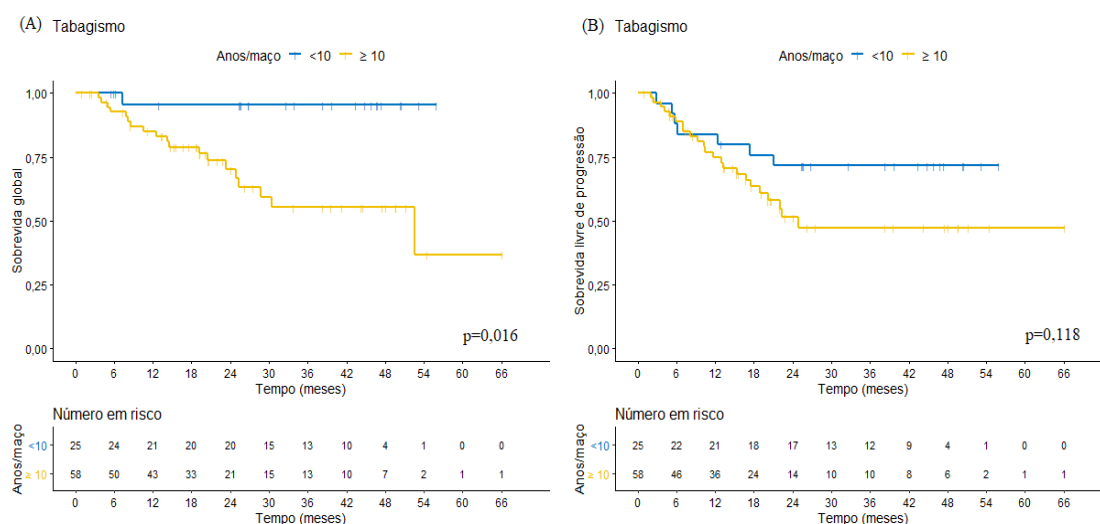


Figura 49 - Curvas de sobrevida de Kaplan Meier para status tabagismo (< 10 anos/maço x ≥ 10 anos/maço) e sobrevida global (A) e livre de progressão (B).

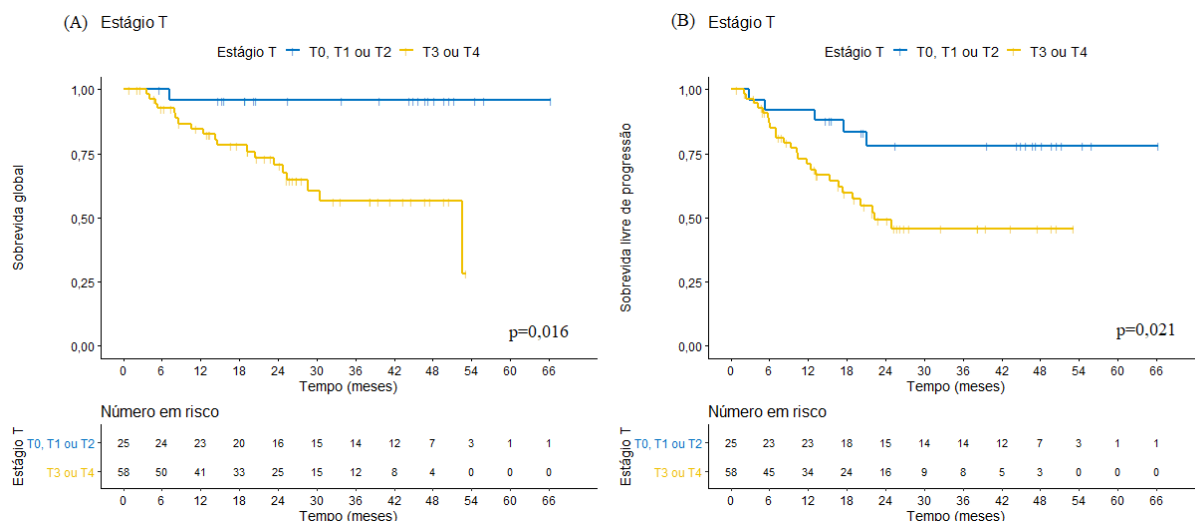


Figura 50 - Curvas de sobrevida de Kaplan Meier para estágio T (T0, T1 e T2 x T3 e T4) e sobrevida global (A) e livre de progressão (B).

Tabela 21 - Características demográficas dos pacientes e sobrevida global para população total do estudo (n=83).

Característica	SG Mediana (meses)	SG 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
Idade				
> 70 anos	23,4	46,3	3,52 (2,55-8,61)	0,006
≤ 70 anos	NA	87,8		
Sítio Primário				
Orofaringe	NA	83,1	0,32 (0,12-0,84)	0,021
Não orofaringe	52,5	74,2		
p16				
Positivo	NA	100	*	0,007
Negativo/Desconhecido	NA	67,2		
Tabagismo				
≥ 10 anos/maço	52,5	70,2	11,86 (1,57-89,11)	0,016
< 10 anos/maço	NA	95,5		
Sexo				
Masculino	NA	78,5	0,73 (0,21-2,50)	0,627
Feminino	NA	78,6		
Estágio T				
T0 / T1 / T2	NA	95,8	0,08 (0,01-0,62)	0,016
T3 / T4	NA	70,5		
Estágio N				
N0 / N1/ N2a / N2b	NA	81,3	0,79 (0,32-1,91)	0,604
N2c / N3	NA	75,3		
AJCC				
III	NA	74,3	0,94 (0,31-2,84)	0,919
IVA / IVB	NA	79,6		

* Regressão de Cox não é factível pois não ocorreu nenhum evento no braço p16 positivo.

NA: não alcançada

Tabela 22 - Características demográficas dos pacientes e sobrevida livre de progressão para população total do estudo (n=83).

Característica	SLP Mediana (meses)	SLP 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
Idade				
> 70 anos	NA	50	1,37 (0,58-3,22)	0,460
≤ 70 anos	NA	61,3		
Sítio Primário				
Orofaringe	NA	68,2	0,49 (0,23-1,02)	0,058
Não orofaringe	22,3	47,9		
p16				
Positivo	NA	75,4	0,56 (0,17-1,77)	0,327
Negativo/Desconhecido	NA	65,1		
Tabagismo				
≥ 10 anos/maço	24,9	51,4	1,98 (0,84-4,65)	0,116
< 10 anos/maço	NA	71,6		
Sexo				
Masculino	NA	61,9	0,79 (0,30-2,08)	0,643
Feminino	NA	58,5		
Estágio T				
T0 / T1 / T2	NA	78,2	0,32 (0,12-0,84)	0,021
T3 /T4	22,3	49,0		
Estágio N				
N0 / N1/ N2a / N2b	NA	63,2	0,69 (0,33-1,41)	0,313
N2c / N3	NA	53,7		
AJCC				
III	NA	53,2	1,33 (0,50-3,47)	0,560
IVA / IVB	NA	59,6		

NA: não alcançada

Características Demográficas e Sobrevida

Tabela 23 - Regressão de Cox para sobrevida global e livre de progressão considerando as variáveis contínuas (idade em anos e tabagismo em anos/maço) para população total do estudo (n=83).

Sobrevida Global			Sobrevida Livre de Progressão		
Variável	HR (IC95%)	p	Variável	HR (IC95%)	p
Idade	1,06 (1,01-1,11)	0,011	Idade	1,01 (0,98-1,05)	0,338
Tabagismo	1,08 (1,00-1,16)	0,051	Tabagismo	1,04 (0,96-1,12)	0,299

Apêndice 3 - Características demográficas e sobrevida na população submetida a tratamento definitivo

Tabela 24 - Características demográficas dos pacientes e sobrevida global para população submetida a tratamento definitivo (n=67).

Característica	SG Mediana (meses)	SG 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
Idade				
> 70 anos	20,4	28,7	5,75 (2,05-16,09)	0,001
≤ 70 anos	NA	87,3		
Sítio Primário				
Orofaringe	NA	83	0,30 (0,10-0,84)	0,023
Não orofaringe	NA	62,8		
p16				
Positivo	NA	100	*	0,004
Negativo/Desconhecido	NA	64		
Tabagismo				
≥ 10 anos/maço	NA	63,9	*	0,003
< 10 anos/maço	NA	100		
Sexo				
Masculino	NA	73,6	0,68 (0,24-1,91)	0,465
Feminino	NA	83,3		
Estágio T				
T0 / T1 / T2	NA	100	*	0,003
T3 /T4	NA	64,4		
Estágio N				
N0 / N1/ N2a / N2b	NA	75	0,96 (0,35-2,67)	0,949
N2c / N3	NA	77,1		
AJCC				
III	NA	73,8	0,82 (0,26-2,58)	0,736
IVA / IVB	NA	76,3		
QT Indução				
Sim	NA	83,6	0,50 (0,17-1,47)	0,213
Não	NA	68,6		

NA: não alcançada

Tabela 25 - Características demográficas dos pacientes e sobrevida livre de progressão para população submetida a tratamento definitivo (n=67).

Característica	SLP Mediana (meses)	SLP 2 anos (%)	HR (IC 95%)	p
Idade				
> 70 anos	20,1	43,4	2,11 (0,81-5,46)	0,122
≤ 70 anos	NA	65,1		
Sítio Primário				
Orofaringe	NA	68,1	0,55 (0,23-1,28)	0,168
Não orofaringe	22,3	44,7		
p16				
Positivo	NA	75,4	0,50 (0,15-1,58)	0,240
Negativo/Desconhecido	NA	61,5		
Tabagismo				
≥ 10 anos/maço	NA	53,6	2,04 (0,75-5,55)	0,164
< 10 anos/maço	NA	74,4		
Sexo				
Masculino	NA	60,6	0,80 (0,27-2,38)	0,697
Feminino	NA	63,6		
Estágio T				
T0 / T1 / T2	NA	87,4	0,15 (0,03-0,68)	0,014
T3 /T4	22,3	48,6		
Estágio N				
N0 / N1/ N2a / N2b	NA	63,3	1,35 (0,58-3,13)	0,482
N2c / N3	NA	59,4		
AJCC				
III	NA	52,4	1,04 (0,38-2,82)	0,937
IVA / IVB	NA	63,3		
QT Indução				
Sim	NA	59	1,21 (0,52-2,80)	0,656
Não	NA	62,7		

NA: não alcançada

Tabela 26 - Regressão de Cox para sobrevida global e livre de progressão considerando as variáveis contínuas (idade em anos e tabagismo em anos/maço) para população submetida a tratamento definitivo (n=67).

Sobrevida Global			Sobrevida Livre de Progressão		
Variável	HR (IC95%)	p	Variável	HR (IC95%)	p
Idade	1,08 (1,03-1,14)	0,003	Idade	1,03 (0,99-1,07)	0,133
Tabagismo	1,16 (1,05-1,28)	0,006	Tabagismo	1,10 (0,99-1,21)	0,085

Apêndice 4 - Características demográficas de acordo com realização ou não de quimioterapia de indução

Tabela 27 - Características demográficas dos pacientes e realização ou não de quimioterapia de indução na população submetida a tratamento definitivo (n=67).

Característica	QT Indução		p
	Sim n (%)	Não n (%)	
Sítio Primário			
Orofaringe	23 (69,7)	18 (52,9)	0,212
Não orofaringe	10 (30,3)	16 (47,1)	
Status p16			
Positivo	14 (60,9)	8 (42,1)	0,352
Negativo / Desconhecido	9 (39,1)	11 (57,9)	
Tabagismo			
≥ 10 anos/maço	18 (54,5)	28 (82,4)	0,029
< 10 anos/maço	15 (45,5)	6 (17,6)	
Sexo			
Masculino	25 (75,8)	30 (88,2)	0,311
Feminino	8 (24,2)	4 (11,8)	
Estágio T			
T0, T1 ou T2	7 (21,2)	12 (35,3)	0,314
T3 ou T4	26 (78,8)	22 (64,7)	
Estágio N			
N0 ou N1	3 (9,1)	18 (52,9)	<0,001
N2 ou N3	30 (90,9)	16 (47,1)	
Estágio N			
≤ N2b	7 (21,2)	27 (79,4)	<0,001
N2c ou N3	26 (78,8)	7 (20,6)	
AJCC			
III	0	14 (41,2)	<0,001
IVA ou IVB	33 (100)	20 (58,8)	

NA: não alcançada

Tabela 28 - Características demográficas dos pacientes e realização ou não de quimioterapia de indução na população submetida a tratamento definitivo (n=67).

Característica	QT Indução		RT Inicial		p
	Média (DP)	Variação	Média (DP)	Variação	
Idade (anos)	56,2 (7,4)	38-71	64,8 (11,4)	42-83	0,001
Carga tabágica (anos/maço)	26,1 (33,3)	0-150	43,2 31,1	0-120	0,033

Apêndice 5 - Expressão de biomarcadores nas CTCs em relação a realização ou não de quimioterapia de indução

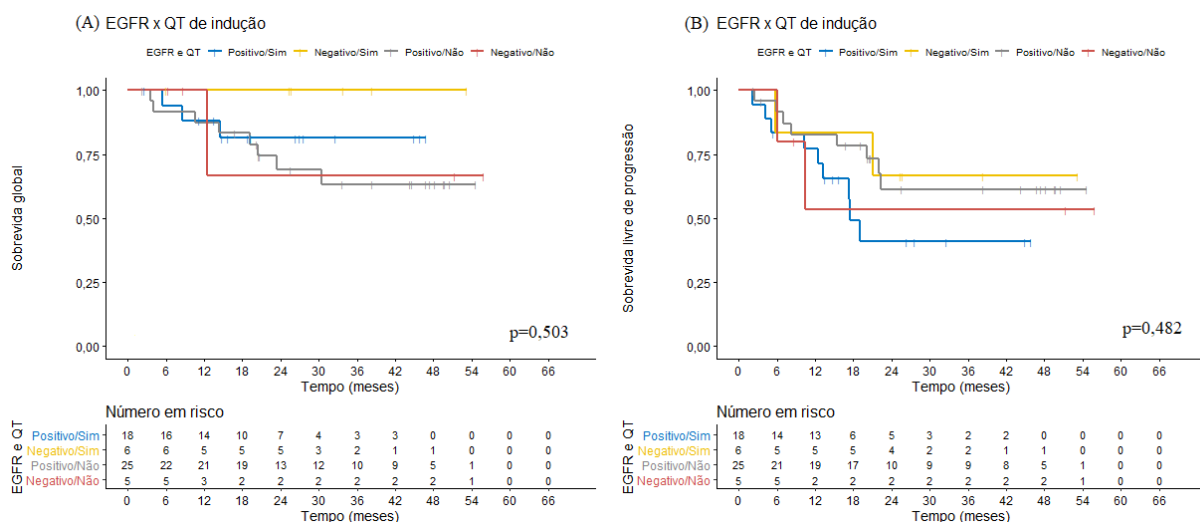


Figura 51 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e livre de progressão (B) correlacionando a expressão de EGFR em CTCs *baseline* e a realização ou não de QT de indução.

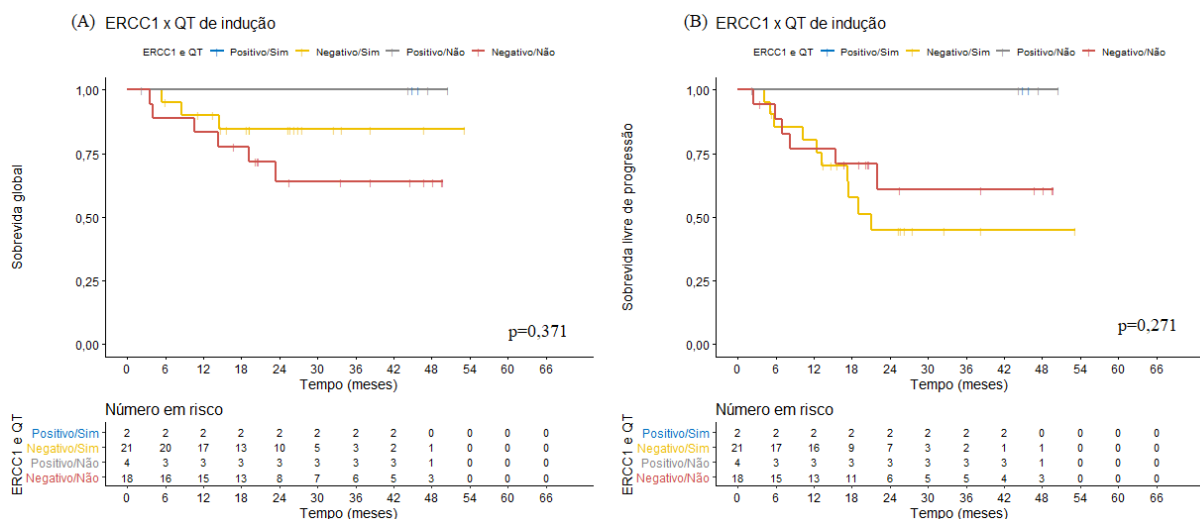


Figura 52- Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e livre de progressão (B) correlacionando a expressão de ERCC1 em CTCs *baseline* e a realização ou não de QT de indução.

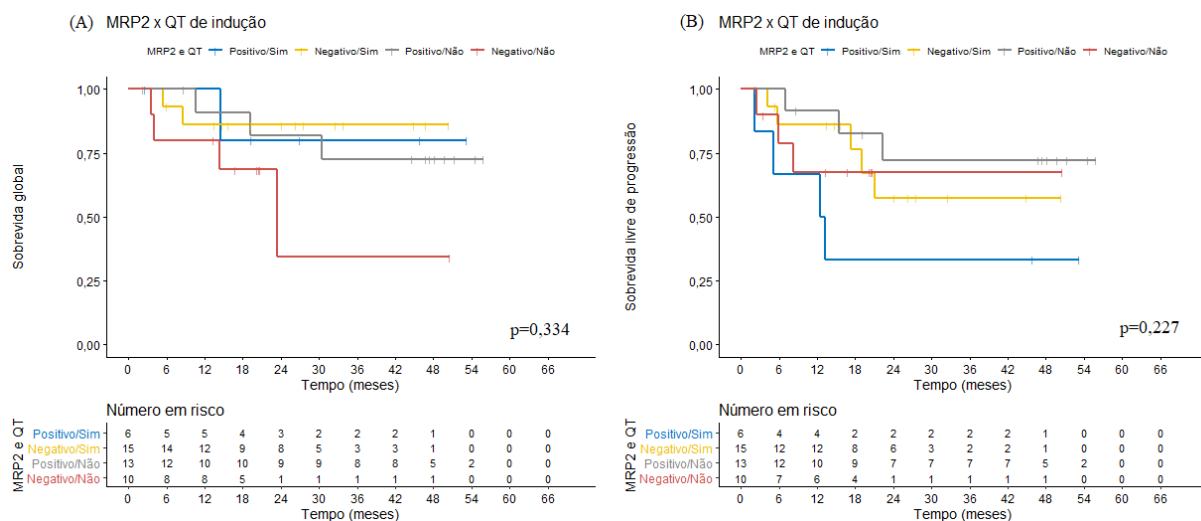


Figura 53 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e livre de progressão (B) correlacionando a expressão de MRP-2 em CTCs *baseline* e a realização ou não de QT de indução.

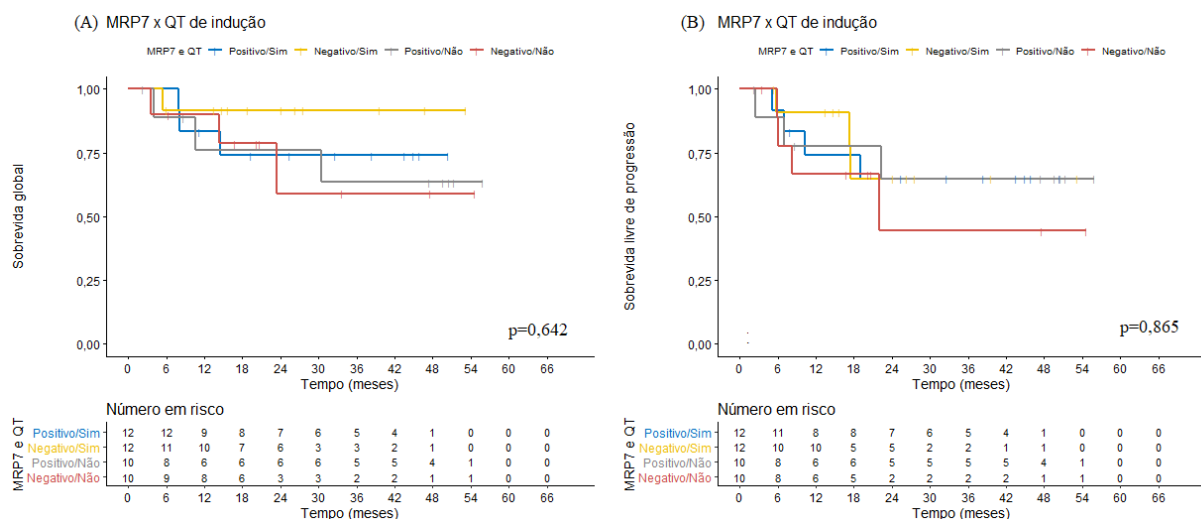


Figura 54 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e livre de progressão (B) correlacionando a expressão de MRP-7 em CTCs *baseline* e a realização ou não de QT de indução.

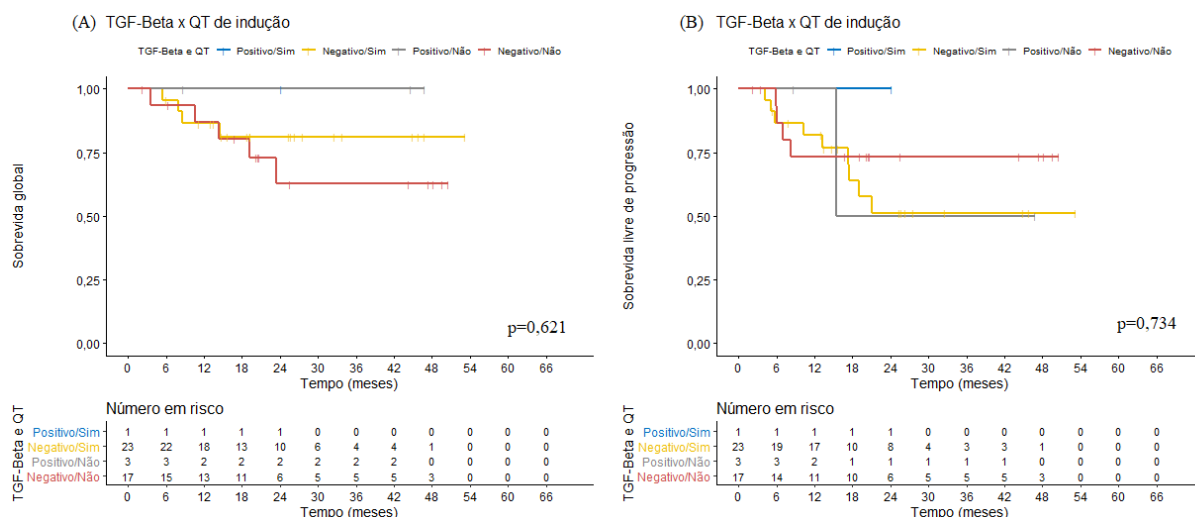


Figura 55 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e livre de progressão (B) correlacionando a expressão de TGF- β R em CTCs *baseline* e a realização ou não de QT de indução.

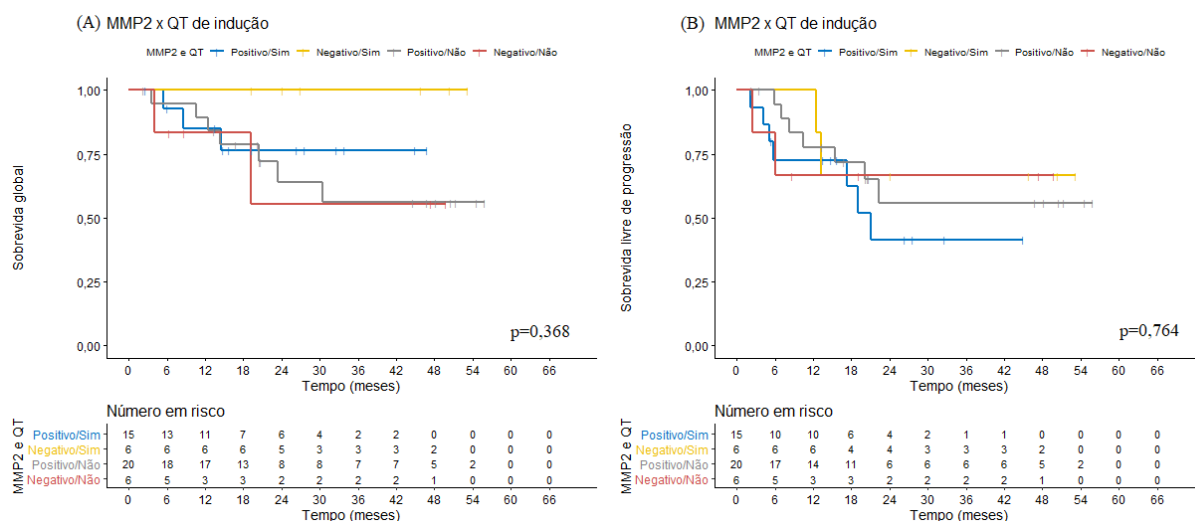


Figura 56 - Curvas de Kaplan Meier para sobrevida global (A) e livre de progressão (B) correlacionando a expressão de MMP2 em CTCs *baseline* e a realização ou não de QT de indução.