

**ANÁLISE DE MARCADORES SANGUÍNEOS  
RELACIONADOS A PROGNÓSTICO EM CÂNCER  
DE RETO LOCALMENTE AVANÇADO**

**BIANCA DE CÁSSIA TRONCARELLI DE  
CAMPOS PARRA FLORES**

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

**Área de Concentração: Oncologia**

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

**Co-Orientadora: Dra. Stefanie S. Jeffrey**

**São Paulo**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Flores, Bianca de Cássia Troncarelli de Campos Parra  
**Análise de marcadores sanguíneos relacionados a prognóstico em câncer de reto localmente avançado** / Bianca de Cássia Troncarelli de Campos Parra Flores - São Paulo, 2020.  
36p.  
Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.  
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.  
Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores: 1. Neoplasias Retais/Rectal Neoplasms. 2. Células Neoplásicas Circulantes/Neoplastic Cells, Circulating. 3. Biópsia Líquida/Liquid Biopsy. 4. Neoplasias da Mama/imunologia/Breast Neoplasms/immunology. 5. Células Killer Naturais/Killer Cells, Natural. 6. Prognóstico/Prognosis

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que compreendem a importância da pesquisa científica para o desenvolvimento da humanidade e melhora da qualidade de vida. Em especial aos meus pais José e Regina e minha avó, madrinha e anjo da guarda, Antônia. Dedico minha vida a vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela inspiração e força para seguir em frente mesmo diante as adversidades. Peço que sua luz continue a me guiar.

Aos meus pais por serem minha fonte de inspiração, força, e me lembrarem todos os dias de seguir acreditando nos meus sonhos. Esta conquista é nossa. Com vocês aprendi a ser girassol... "E é por instinto que eu encontro a luz".

Aos membros do laboratório da Dra. Ludmilla Chinen pelo apoio para o seguimento das coletas e experimentos. E aos amigos do A.C.Camargo. Meu muito obrigada a todos!

Aos membros do laboratório da Dra. Stefanie Jeffrey pelo suporte científico e emocional durante todo o período que compartilhamos "fora de casa". Serei eternamente grata pela amizade e ciência!

Aos meus preciosos amigos de longa data e primos: Vivi, Raul, José, Gabi, Ariane, Hermano, Frank, Nathy, Ederson, Rafinha, Dudu, irmã flor Karol...que mesmo longe sempre estiveram pertinho. E aos amigos que me trouxeram alegria e leveza enquanto estive longe de meu porto seguro, em especial a "grande família" que formamos na Magic Community, a Lili, Thiago, Flora, Pete, Missy, Anita, Emi, Josie, Pilar, Isabel...obrigada por tornarem ensolarados mesmo os dias chuvosos.

As minhas orientadoras, Dra. Ludmilla Chinen e Dra. Stefanie Jeffrey pela confiança e inspiração! Muito obrigada pelo crescimento científico e pessoal que acredito ter tido neste período.

Agradeço muito a pós graduação da Fundação Antônio Prudente – A.C.Camargo por toda ajuda e apoio durante o período em que estive

estudando no A.C.Camargo e, principalmente, enquanto estive fora do país. Agradecimento especial a Luciana Pitombeira e Karla pelo suporte.

Um agradecimento especial aos pacientes oncológicos que mesmo diante de tantas adversidades enfrentadas no presente, aceitam colaborar com as pesquisas científicas que desenvolvemos, pelo benefício de pessoas em um futuro muitas vezes distante. Em especial a minha tia Maria Cecilia. Nosso trabalho é para vocês, e por vocês. Gratidão.

## RESUMO

Flores BCTCP. **Análise de marcadores sanguíneos relacionados a prognóstico em câncer de reto localmente avançado.** São Paulo; 2020. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Câncer colorretal (CCR) é altamente incidente; estimam-se, no Brasil, em 2016 16.660 casos novos de CCR em homens e 17.620 em mulheres, de acordo com o Ministério da Saúde. Estudos têm demonstrado que as células tumorais circulantes (CTCs) podem estar envolvidas no processo de metastatização. Desta forma, seu isolamento constitui uma estratégia potencial para o acompanhamento clínico, como método não invasivo. O presente estudo teve como objetivos: 1) Isolar e quantificar CTCs do sangue periférico de pacientes com câncer de reto localmente avançado (CRLA), estádios II e III, para correlacionar seus níveis com exames de imagem e sobrevida livre de doença; 2) Analisar nas CTCs marcadores de resistência ao tratamento (TYMS e RAD23) e correlacionar com resposta à terapia e sobrevida livre de doença. Foram analisadas amostras de 30 pacientes. As amostras foram coletadas antes da quimioterapia neoadjuvante (*baseline*) e após a mesma (*follow-up*). As CTCs foram caracterizadas nos dois momentos por imunocitoquímica com anticorpos específicos para os marcadores acima citados e por CISH, avaliando a expressão do mRNA do gene do TYMS. As contagens de CTCs diminuíram entre a primeira e a segunda coletas em pacientes exibindo resposta patológica completa (RPC;  $p = 0,02$ ) ou resposta parcial (RP;  $p = 0,01$ ). Em relação à expressão protéica, TYMS estava ausente em 100% das CTCs dos pacientes com RPC ( $p = 0,001$ ), mas foi expresso em 83% dos não respondedores na segunda coleta ( $p < 0,001$ ). Em paralelo, RAD23b foi expresso em CTCs de 75% dos não respondedores na coleta *baseline* ( $p = 0,01$ ) e em 100% dos não respondedores do *follow-up* ( $p = 0,001$ ). Surpreendentemente, 100% dos não respondedores expressaram mRNA de TYMS nos dois momentos ( $p = 0,001$ ). Além disso, TYMS / RAD23b não foram

detectadas nas CTCs de pacientes que exibiam RPC ( $p = 0,001$ ). Encontramos 83,3% de sensibilidade para o mRNA de TYMS no *baseline* ( $p = 0,001$ ) e 100% para a expressão da proteína TYMS ( $p = 0,064$ ) e RAD23B ( $p = 0,01$ ) no *follow-up*. Assim, a expressão do RNAm TYMS e / ou TYMS / RAD23b nas CTCs, bem como a cinética das CTCs, têm o potencial de prever não resposta ao tratamento neoadjuvante e evitar cirurgias radicais desnecessárias em pacientes com CRLA com RPC. Com a realização deste trabalho obtivemos uma melhor compreensão a respeito dos mecanismos que envolvem a resistência ao tratamento nos pacientes com CRLA, por meio da análise de CTCs. Auxiliados por estas análises, identificamos novos biomarcadores sanguíneos prognósticos, que poderão ser usados como instrumentos de direcionamento clínico na escolha da melhor terapêutica.

**Descritores:** Neoplasias Retais. Células Neoplásicas Circulantes. Biópsia Líquida. Neoplasias da Mama/imunologia. Células Killer Naturais. Prognóstico

## SUMMARY

Flores BCTCP. **[Analysis of prognostic-related blood markers in locally advanced rectal cancer]**. São Paulo; 2020. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Colorectal cancer (CRC) is highly incident; In Brazil, in 2016, an estimated 16,660 new cases of CRC in men and 17,620 in women, according to the Ministry of Health. Studies have shown that circulating tumor cells (CTCs) may be involved in the metastasization process. Thus, its isolation is a potential strategy for clinical follow-up as a noninvasive method. The present study aims to: 1) Isolate and quantify peripheral blood CTCs from patients with locally advanced rectal cancer (stages II and III) to correlate their levels with imaging and progression-free survival; 2) Analyze treatment resistance markers on CTCs (TYMS and RAD23), and correlate with therapy response and progression-free survival. Samples from 30 patients were analyzed. Samples were collected before and after neoadjuvant chemotherapy (follow-up). CTCs were characterized at both times by immunocytochemistry with specific antibodies to the markers mentioned above and by CISH, evaluating the expression of the TYMS gene mRNA. CTC counts decreased between the first and second collection in patients exhibiting complete pathological response (CPR;  $p = 0.02$ ) or partial response (PR;  $p = 0.01$ ). Regarding protein expression, TYMS was absent in 100% of the CTCs of patients with CPR ( $p = 0.001$ ), but was expressed in 83% of non-responders in the second collection ( $p < 0.001$ ). Meanwhile, RAD23b was expressed in CTCs of 75% of baseline non-responders ( $p = 0.01$ ) and 100% of follow-up non-responders ( $p = 0.001$ ). Surprisingly 100% of non-responders expressed TYMS mRNA at both times ( $p = 0.001$ ). In addition, TYMS / RAD23b was not detected in CTCs of patients with CPR ( $p = 0.001$ ). We found 83.3% sensitivity for TYMS mRNA at baseline ( $p = 0.001$ ) and 100% for TYMS protein expression ( $p = 0.064$ ) and RAD23B ( $p = 0.01$ ) at follow-up. Thus, TYMS mRNA and/or TYMS / RAD23b in CTCs,



as well as CTC kinetics, have the potential to predict non-response to NCRT and to avoid unnecessary radical surgery in patients with LARC and CPR. With this work we obtained a better understanding about the mechanisms involving resistance to treatment in patients with locally advanced rectal cancer, through the analysis of CTCs. With these analyzes, we identified new prognostic blood biomarkers that could be used as clinical guidance tools in choosing the best therapy.

**Key-words:** Rectal Neoplasms. Neoplastic Cells, Circulating. Liquid Biopsy. Breast Neoplasms/immunology. Killer Cells, Natural. Prognosis

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>CRLA</b>	câncer de reto localmente avançado	RPC	resposta patológica completa
<b>CTCs</b>	células tumorais circulantes		
<b>dTMP</b>	monofosfato de timidina		
	RAD23B	RAD23 homólogo B	
<b>MHC-1</b>	complexo de histocompatibilidade classe 1		
	CCR	câncer colorretal	
<b>RP</b>	resposta parcial		
<b>SLD</b>	sobrevida livre de doença		
<b>TYMS</b>	timidilato sintase		

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Câncer Colorretal .....	1
1.2	Células Tumorais Circulantes.....	3
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
2.1	Objetivos do projeto desenvolvido no A.C.Camargo Cancer Center ...	6
2.2	Objetivos do Projeto Desenvolvido em Stanford .....	6
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>7</b>
3.1	A.C.Camargo Cancer Center.....	7
3.1.1	Desenho de Estudo .....	7
3.1.2	Contagem e caracterização de CTCs.....	8
3.1.3	Padronização CISH em CTCs .....	9
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>11</b>
4.1	A.C.Camargo Cancer Center.....	11
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>31</b>

## ANEXO

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

## APÊNDICE

**Apêndice 1** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CRC) é uma doença muito heterogênea, causada pela interação de fatores genéticos e ambientais. A maioria dos CRCs são esporádicos (70% - 80%). Apenas uma pequena parcela de casos está relacionada à hereditariedade, ou polipose adenomatosa familiar (< 1%), CRC hereditário sem polipose ou Síndrome de Lynch (2% -5%) ou gene MYH associado a polipose (< 1%) (DUNLOP et al. 1997). Estima-se que cerca de 20% - 25% dos casos têm um componente hereditário associado, ainda não estabelecido e é conhecido como CRC familiar (PIÑOL et al. 2005).

O Adenocarcinoma Colorretal (CCR) representa um dos tipos de câncer com maior incidência e prevalência, juntamente com os cânceres pulmonares e mamários (FERLAY et al. 2015). Constitui também uma doença de alta taxa de mortalidade, representando a quarta neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada e a segunda maior causa de morte por câncer nos EUA. Tem-se notado atualmente, nos EUA, uma tendência de queda de incidência e mortalidade relacionadas ao CCR (queda de 2-3% ao ano nos últimos 15 anos) (SIEGEL et al. 2017).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa para 2018 é de 17.380 casos novos de CCR em homens e 18.980 em mulheres (Ministério da Saúde 2019). Ainda segundo registros do INCA,

a cidade de São Paulo apresenta taxas elevadas de incidência de câncer colorretal, representado 34,70% para homens e 35,32% para mulheres.

Dentre os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da neoplasia, estão o tabagismo, sedentarismo, dieta inapropriada, obesidade e ingestão de álcool, mas o maior fator de risco é a idade (BINEFA et al. 2016). Características populacionais relacionadas a baixo desenvolvimento sócio-econômico estão associadas à maior incidência de adenocarcinoma colorretal (DOUBENI et al. 2012), o que se traduz nas diferenças geográficas encontradas.

Para decisão terapêutica da neoplasia de reto, é levada em consideração, entre outras variáveis, a localização da neoplasia, o que impacta diretamente na capacidade funcional do paciente, e inclui manter/readquirir continência anal e preservação das funções genitourinárias. Particularmente nos tumores retais distais, alcançar cura com preservação de qualidade de vida é o grande desafio (BAXTER et al. 2007).

Em relação ao tratamento da doença localizada, indica-se terapia neoadjuvante com quimioterapia - Fluoropirimidina (O'CONNELL et al. 1997; HOFHEINZ et al. 2012); e radioterapia em tumores cT3 e cT4, em pacientes com tumores distais não passíveis de ressecção local ou em qualquer cT caso exista acometimento linfonodal regional.

Sabidamente há um maior risco de recidivas locorregionais nas neoplasias de reto comparativamente com as colônicas. Isto se deve à proximidade do reto com estruturas e órgãos pélvicos, ausência de serosa envolvendo o reto e às dificuldades técnicas de se alcançar margens

cirúrgicas livres. Em função dos fatores expostos, o tratamento neoadjuvante envolve também a radioterapia.

Nos tumores localizados, após tratamento neoadjuvante, a conduta padrão é a cirurgia, mesmo nos casos de aparente resposta completa. Após cirurgia, embora com benefício controverso, ainda sugere-se tratamento adjuvante com quimioterapia por 4 meses, sendo esquemas possíveis FOLFOX (fluoropirimidina, leucovorin e oxaliplatina), XELOX (capecitabina leucovorin e oxaliplatina) ou esquemas com fluoropirimidinas isoladas (HONG et al. 2007).

## **1.2 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES**

A presença de células tumorais circulantes (CTCs) no sangue pode ser considerada como um potencial fator prognóstico (RAHBARI et al. 2012). Com relação ao câncer colorretal (CCR), sabe-se que a primeira estratégia para o tratamento desta doença é a ressecção completa da lesão, o que algumas vezes inclui ressecção dos órgãos circunvizinhos e ampla dissecação linfonodal, procedimentos que afetam a qualidade de vida dos pacientes (KATSUMATA et al. 2006). Contudo, apesar da ressecção radical, alguns pacientes apresentam recorrência, que se acredita ser devido a sítios de micrometástases residuais. Métodos diagnósticos tradicionais não são capazes de detectar CTCs presentes nestes sítios e eventualmente liberadas na circulação.

MAGNI et al. (2014) efetuaram a análise das CTCs pela metodologia

CellSearch® System, observando 85 pacientes com câncer de retolocalmente avançado antes e depois da quimio-radioterapia adjuvante (t0 e t1, respectivamente), em 7 dias e 6 meses após a cirurgia (t2 e t3, respectivamente). Os autores não encontraram diferença estatisticamente significativa entre as CTCs e as características clínico-patológicas, nem com sobrevida livre de doença (SLD). Contudo, obtiveram o seguinte dado, dos 39 pacientes com resposta completa ou parcial, 8 tinham mais do que uma CTC no t0 e negativaram no t1. Estes autores reforçaram que mais estudos com outras metodologias são necessários para termos uma melhor ideia da importância do estudo de CTCs neste grupo de pacientes.

O grupo de pesquisa com o qual este projeto foi desenvolvido obteve alguns dados interessantes com CCRm. Foram capazes de demonstrar, através da análise de 34 pacientes tratados com 5-FU, que a expressão proteica de timidilato sintase (TYMS) nas CTCs, mas não em tecidos primários ou metastáticos, foi determinante para a resistência ao tratamento (ABDALLAH et al. 2015). Foram analisados 19 pacientes com CCRm, tratados com irinotecano, para expressão de MRP-1 (*multidrug resistance protein-1*) e concluiu-se, como para TYMS, que esta expressão apenas nas CTCs, foi determinante para a progressão da doença (ABDALLAH et al. 2015). Observou-se também que não só a análise de expressão de proteínas, mas também a cinética das CTCs pode identificar pacientes potenciais não respondedores ao tratamento (SOUZA E SILVA et al. 2016). Além disso, foi relatada uma semelhança em estado de mutação KRAS entre CTCs e tumores primários de pacientes com CCRm (BUIM et al. 2015). Desta forma,

decidimos avaliar doença não metastática, para verificar se as CTCs poderiam, neste cenário, funcionar como biomarcadores de resposta ao tratamento neoadjuvante.

O gene TYMS mantém o *pool* de dTMP (monofosfato de timidina) para a replicação e reparo do DNA, e devido a esta função, tem sido de interesse como um alvo para agentes quimioterápicos do câncer (KUREMSKY et al. 2009; CONRADI et al. 2011).

A proteína de reparo por excisão ultravioleta, RAD23 homólogo B (RAD23B), que faz parte do processo de reparo por excisão nucleotídica (WATKINS et al. 1993; SCHAUBER et al. 1998), seria potencialmente induzida pelo dano genético introduzido pela radioterapia. Recentemente, verificou-se que o RAD23B está associado ao risco de recaída do câncer de mama (PÉREZ-MAYORAL et al. 2013).



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS DO PROJETO DESENVOLVIDO NO A.C.CAMARGO CANCER CENTER**

✓ Objetivo primário

Isolar e quantificar CTCs de pacientes com câncer de reto localmente avançado e correlacionar seus níveis com exames de imagem e sobrevida livre de doença.

✓ Objetivos secundários

1. Avaliar o prognóstico dos pacientes e correlacionar com as contagens de CTC;
2. Analisar expressão protéica nas CTCs de marcadores de resistência/resposta ao tratamento (TYMS) e resistência à radioterapia (RAD23B);
3. Analisar expressão gênica de TYMS nas CTCs.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 A.C.CAMARGO CANCER CENTER**

##### **3.1.1 Desenho de Estudo**

Este estudo prospectivo longitudinal foi realizado por meio de coleta de sangue total de pacientes com tumores de reto localmente avançado. Como controle negativo, foi utilizado o sangue de indivíduos saudáveis e como controle positivo, este mesmo sangue acrescido de células tumorais de reto mantidas em cultura. Todo o procedimento de identificação foi realizado por códigos, preservando a confidencialidade do paciente. A coleta de sangue ocorreu imediatamente antes do início da quimioterapia neoadjuvante para avaliação de CTCs e a segunda depois da quimioterapia neoadjuvante/antes da cirurgia. O projeto “Análise de marcadores sanguíneos relacionados a prognóstico em câncer de reto localmente avançado”, foi aprovado pelo CEP da instituição (CEP 2141/15C), como afiliado ao projeto já aprovado: “Identificação de Proteínas e Genes de Fatores de Transcrição Relacionados à Resistência a Quimioterapia e Radioterapia em Células Tumorais Circulantes de Pacientes com Câncer de Cólon e Reto Localmente Avançados” (CEP 2141/15) (Anexo 1). Os pacientes tiveram aproximadamente 10 mL de sangue coletados em cada visita, e participaram da pesquisa apenas os indivíduos que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Apêndice 1).

Em todas as coletas, o sangue dos pacientes foi processado e armazenado da maneira mais adequada e específica para cada componente, sendo: plasma (cfDNA), plaquetas (RNA), leucócitos (DNA). Além da membrana derivada da filtração pelo ISET, onde, nos *spots* fixados com formol foram realizadas as reações de imunocitoquímica e CISH; e dos *spots* não fixados obtivemos o DNA das CTCs, processos que estão descritos detalhadamente a seguir.

### **3.12 Contagem e caracterização de CTCs**

Para contagem e caracterização das CTCs, em todos os momentos da coleta de sangue, utilizamos o sistema ISET, adquirido pela nossa instituição (processo FAPESP 2012/01273-8). De forma resumida, ISET (*Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells*) constitui um método direto de obtenção 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  $\mu\text{m}$ . Desta forma, estas células podem ser eliminadas por filtração do sangue através de uma membrana de policarbonato com poros calibrados de 8  $\mu\text{m}$ . A simplicidade do método evita a perda de células raras em múltiplos passos de isolamento.

As amostras de sangue periférico do paciente são coletadas em tubos com EDTA e diluídas com ISET *Buffer*<sup>®</sup> (*RareCells Diagnostics*, Paris, França) 1:10. Após 10 minutos de incubação as amostras são depositadas em um poço de *ISET Block*<sup>TM</sup> (*RareCells Diagnostics*, Paris, França), com uma membrana de policarbonato que possui *spots* cilíndricos de 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

A amostra de sangue é filtrada por aspiração sob vácuo e, em seguida, a membrana é lavada com PBS, retirada do ISET Block® e, quando seca, armazenada a -20 ° C.

Para confirmar a existência de células nos *spots*, é realizada uma reação de imunocitoquímica com os marcadores desejados. As reações são realizadas seguindo protocolos padronizados em nosso laboratório e descritos no *paper* anexo. As lâminas são examinadas no microscópio de luz branca, BX61 - Olympus, (Tóquio, Japão) acoplado a câmera digital de alta resolução SC100-Olympus, (Tóquio, Japão). CTCs são caracterizadas de acordo com os seguintes critérios: tamanho nuclear igual ou maior que 16µm, irregularidade do contorno nuclear, presença de citoplasma visível, alta proporção núcleo- citoplasma (>0,8).

### **3.1.3 Padronização CISH em CTCs**

Seguimos o protocolo descrito por PAYNE et al. (2012). Brevemente, para o ensaio de hibridização *in situ* do RNA de CTCs (CTCscope), nós adquirimos sondas de hibridização desenhadas para o RNAm de TYMS. Para iniciar o procedimento, recortamos os *spots* contendo as células de interesse ainda presas na membrana de filtragem do ISET, e que foram fixadas em formol e secas à temperatura ambiente. As células foram tratadas com protease e em seguida incubadas com as sondas alvo a 40°C durante 3 h (ACD HybEZ™ Hybridization System). O sinal foi amplificado por uma série de eventos de hibridação de ácidos nucleicos que resultam na acumulação de um grande número de sondas oligonucleotídicas conjugadas com corantes

Alexa fluorescentes. O núcleo foi corado com 4', 6-diamidino-2-fenilindole, dicloridrato (DAPI), e o experimento foi realizado juntamente a um controle positivo (lâmina de controle foi fornecida pela empresa). As lâminas foram visualizadas em microscópio de luz branca.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 A.C.CAMARGO CANCER CENTER**

Troncarelli Flores BC, Souza E Silva V, Ali Abdallah E, Mello CAL, Gobo Silva ML, Gomes Mendes G, Camila Braun A, Aguiar Junior S, Thomé Domingos Chinen L. Molecular and Kinetic Analyses of Circulating Tumor Cells as Predictive Markers of Treatment Response in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Cells*. 2019 Jun 26;8(7). pii: E641. doi: 10.3390/cells8070641. PubMed PMID: 31247977; PubMed Central PMCID: PMC6679115.



Article

## Molecular and Kinetic Analyses of Circulating Tumor Cells as Predictive Markers of Treatment Response in Locally Advanced Rectal Cancer Patients

Bianca C. Troncarelli Flores <sup>1,†</sup>, Virgilio Souza e Silva <sup>2,†</sup>, Emne Ali Abdallah <sup>1</sup>, Celso A.L. Mello <sup>2</sup>, Maria Leticia Gobo Silva <sup>3</sup>, Gustavo Gomes Mendes <sup>4</sup>, Alexcia Camila Braun <sup>1</sup>, Samuel Aguiar Junior <sup>5,6</sup> and Ludmilla Thomé Domingos Chinen <sup>1,6,\*</sup>

<sup>1</sup> International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo 01508-010, Brazil

<sup>2</sup> Department of Medical Oncology, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo 01509-900, Brazil

<sup>3</sup> Department of Radiotherapy, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo 01509-900, Brazil

<sup>4</sup> Department of Radiology, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo 01509-900, Brazil

<sup>5</sup> Department of Pelvic Surgery, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo 01509-900, Brazil

<sup>6</sup> National Institute for Science and Technology in Oncogenomics and Therapeutic Innovation, São Paulo 01509-900, Brazil

\* Correspondence: ludmilla.chinen@accamargo.org.br

† These authors have contributed equally to the work.

Received: 10 May 2019; Accepted: 12 June 2019; Published: 26 June 2019



**Abstract:** Neoadjuvant chemoradiation (NCRT) followed by total mesorectal excision is the standard treatment for locally advanced rectal cancer (LARC). To justify a non-surgical approach, identification of pathologic complete response (pCR) is required. Analysis of circulating tumor cells (CTCs) can be used to evaluate pCR. We hypothesize that monitoring of thymidylate synthase (TYMS) and excision repair protein, RAD23 homolog B (RAD23B), can be used to predict resistance to chemotherapy/radiotherapy. Therefore, the aims of this study were to analyze CTCs from patients with LARC who underwent NCRT plus surgery for expression of TYMS/RAD23B and to evaluate their predictive value. Blood samples from 30 patients were collected prior to NCRT (S1) and prior to surgery (S2). CTCs were isolated and quantified by ISET<sup>®</sup>, proteins were analyzed by immunocytochemistry, and TYMS mRNA was detected by chromogenic in situ hybridization. CTC counts decreased between S1 and S2 in patients exhibiting pCR ( $p = 0.02$ ) or partial response ( $p = 0.01$ ). Regarding protein expression, TYMS was absent in 100% of CTCs from patients with pCR ( $p = 0.001$ ) yet was expressed in 83% of non-responders at S2 ( $p < 0.001$ ). Meanwhile, RAD23B was expressed in CTCs from 75% of non-responders at S1 ( $p = 0.01$ ) and in 100% of non-responders at S2 ( $p = 0.001$ ). Surprisingly, 100% of non-responders expressed TYMS mRNA at both timepoints ( $p = 0.001$ ). In addition, TYMS/RAD23B was not detected in the CTCs of patients exhibiting pCR ( $p = 0.001$ ). We found 83.3% of sensitivity for TYMS mRNA at S1 ( $p = 0.001$ ) and 100% for TYMS ( $p = 0.064$ ) and RAD23B ( $p = 0.01$ ) protein expression at S2. Thus, TYMS mRNA and/or TYMS/RAD23B expression in CTCs, as well as CTC kinetics, have the potential to predict non-response to NCRT and avoid unnecessary radical surgery for LARC patients with pCR.

**Keywords:** locally advanced rectal cancer; circulating tumor cells; RAD23B; thymidylate synthase; chemoradioresistance

### 1. Introduction

Colorectal carcinoma is one of the most commonly occurring neoplasms in the Western world. Moreover, despite improvements in treatment, colorectal carcinoma remains an important cause of

cancer-related deaths worldwide [1]. Rectal carcinoma, which accounts for approximately 30% of all primary colorectal cancers, is characterized by an anatomy and natural history that are distinct from other colonic tumors [2,3].

Neoadjuvant chemoradiation (NCRT) followed by total mesorectal excision is the standard treatment for locally advanced rectal carcinoma (LARC). NCRT is generally recommended for patients with cT3/T4 disease or lymph node involvement [4].

The absence of viable tumor cells in surgical specimens after NCRT is defined as pathological complete response (pCR). It occurs in 10–30% of patients [5] and it is associated with a better prognosis. Capecitabine and 5-fluorouracil (5-FU) are currently the most widely used radiosensitizers for NCRT. In some patients, chemoradiation induces pCR, although radical surgery is recommended for most patients [6,7].

Accurate identification of patients with pCR is necessary before pursuing a non-surgical approach. Many studies have evaluated the accuracy of the digital rectal exam and images in identifying patients with pCR [8,9]. However, the sensitivity and specificity of these methods are too low to accurately predict pCR. Molecular analyses of gene expression have also been performed and have been shown to be unsuitable for identifying patients with pCR who can be followed without radical surgery [10]. Recently, promising data have supported the use of a “watch and wait” strategy for patients who have no signs of a viable tumor in a digital rectal exam, rectoscopy (with or without biopsy), or imaging. The likelihood of tumor regrowth is minimal for these patients, and most could be cured by salvage surgery [11].

In addition, considering that the majority of patients will not respond to NCRT, it is extremely important to identify these patients, in an attempt to optimize the response to these patients. As there are no randomized phase-III studies to date, comparing this strategy with isolated induction chemoradiotherapy, it becomes fundamental to identify a biomarker capable of selecting patients for these approach [12–14].

For organ-preserving treatment strategies, the ability to identify tissues or blood biomarkers that predict NCRT response/non-response is very important. Circulating tumor cells (CTCs) are a real-time source of biomarkers, which have shown promise in facilitating the detection and monitoring of pCR and non-responder patients. It has been proposed that the identification and analysis of CTCs would facilitate investigations to understand intrinsic tumor features and characteristics of patients with pCR or non-responders so that individualized treatment strategies can be applied [15]. To date, use of CTC counts has been approved by the US Food and Drug Administration as a prognostic tool for metastatic prostate, colon, and breast cancers [16–18]. Additionally, CTC kinetics can be used to monitor tumor response to systemic treatment [19,20]. Meanwhile, molecular characterization of CTCs has facilitated studies of biomarkers, including proteins, gene expression, and chromosomal translocations [21,22].

Since only a small proportion of patients with LARC experience complete response following chemoradiation, an improved understanding of the molecular mechanisms underlying resistance to chemotherapy and radiation therapy resistance is essential. For chemotherapy, the main target of 5-FU is the enzyme thymidylate synthase (TYMS). TYMS expression analysis has been used to predict individual response to NCRT and has exhibited good prognostic value for rectal cancer recurrence [23,24]. Radiation therapy is an effective component of neoadjuvant treatment and it induces genetic damage. Consequently, the ultraviolet excision repair protein, RAD23 homolog B (RAD23B), which is part of the nucleotide excision repair process [25,26], would potentially be induced by the genetic damage introduced by radiation therapy. Recently, RAD23B was found to be associated with breast cancer relapse risk [27].

The aim of the present study was to explore the role of CTCs in patients undergoing NCRT followed by surgery for treatment of LARC. In addition, the predictive values of TYMS and RAD23B before and after NCRT were evaluated.



## 2. Methods

### 2.1. Patients and Treatment

This prospective study was conducted at the A. C. Camargo Cancer Center (São Paulo, Brazil) and was approved by the local ethics committee (2141/15C). Written informed consent was obtained from all patients prior to enrolment. Patients met the inclusion criteria for this study if they had a diagnosis of rectal cancer, as confirmed by biopsy pathology; had locally advanced disease staged as cT3–cT4 or N0–N+; and were candidates for chemoradiation therapy per institutional protocol. Patients were excluded if they had evidence of distant metastasis; a history of any surgery (e.g., colostomy) within two weeks prior to the initiation of treatment; or were taking anticoagulants at the time of the study. Cancer stage was determined with pelvic magnetic resonance imaging and chest and abdominal computed tomography.

Blood samples were collected at baseline or prior to NCRT (S1), and then prior to surgery (S2). Venous blood was collected from the antecubital vein and these samples were stored at room temperature for a maximum of 4 h prior to analysis.

Radiation therapy was applied with a three-dimensional (3D) conformal technique. A 45-Gy dose was applied in 25 fractions over the entire pelvis. In addition, a 5.4-Gy radiation boost was administered to the primary tumor and involved lymph nodes in three fractions, for a total of 50.4 Gy applied in 28 fractions. Chemotherapy regimens consisted of either intravenous 5-FU administered at a dose of 1000 mg/m<sup>2</sup> on days 1–5 during weeks 1 and 5 of radiation therapy; or oral capecitabine administered at a dose of 1650 mg/m<sup>2</sup>/d during the entire radiation treatment period. Each patient's physician determined which regimen was appropriate.

The evaluation of the response was determined by the comparative analysis of the baseline images in S1 with the images before surgery (S2). In addition, we evaluated the pathologic response in comparison to the clinical staging established by baseline images.

### 2.2. Isolation and Quantification of CTCs and Protein Analysis of TYMS and RAD

ISET<sup>®</sup> (Isolation by size of epithelial tumors) was used to quantify and analyze CTCs. Briefly, peripheral blood samples were collected from patients into EDTA tubes (8.0 mL BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) and then were homogenized at room temperature for up to 4 h. Samples were then prepared as described previously [28]. Briefly, ISET membrane spots were cut out and subjected to immunocytochemistry (ICC) with an anti-RAD23B antibody (1:100 CSB-PA019260LA01HU; CusaBio, Wuhan, People's Republic of China), an anti-TYMS antibody (1:230 WH0007298M1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and an anti-CD45 antibody (1:200 HPA000440; Sigma-Aldrich).

Selected spots from the ISET membranes were additionally subjected to a 24-well dual color ICC assay (Polink DS-RR-Hu/Ms A Kit; GBI Labs, Bothell, WA, USA). Briefly, antigen retrieval was performed by using a Dako<sup>™</sup> Antigen Retrieval Solution (Dako, Santa Clara, CA, USA). Cells were then hydrated with 1X Tris-buffered saline (TBS) for 10 min and then permeabilized with Triton X-100 for 5 min. Next, cells were rinsed with 1X TBS and incubated with 3% hydrogen peroxide in the dark for 15 min to block endogenous peroxidases. Immobilized cells on the membrane spots were incubated overnight with primary antibodies diluted in 10% fetal calf serum in TBS. To amplify primary antibody signals, the spots were incubated for 30 min with rabbit horseradish peroxidase (HRP) polymer (GBI Labs), then with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) for 10 min. After amplification, the spots were incubated with a second primary antibody for 2 h, a rabbit AP polymer (GBI Labs) for 30 min, and then GBI-Permanent Red (GBI Labs) for 10 min. The latter reagent was freshly prepared according to the manufacturer's instructions. After staining the cells with haematoxylin, specimens were examined with light microscopy (Research System Microscope BX61; Olympus, Waltham, MA, USA). CTCs were counted per 1 mL blood, as previously described by Krebs et al. [29]. CTCs were characterized according to five criteria: Negativity for CD45 staining; nucleus size >12 µm, hyperchromatic and irregular nuclei; visible cytoplasm; and a nuclear to cytoplasm ratio >80% [30]. CTCs were considered

positive for TYMS or RAD23B expression if at least one cell in a specimen stained for these markers on ICC analysis.

### 2.3. CTC Isolation and Immunostaining Control

Negative controls were healthy donor blood filtered by ISET<sup>®</sup>. Positive controls included healthy donor blood spiked with HCT-8 colorectal carcinoma cells. For the ICC reaction and TYMS antibody control, leukocytes from healthy filtered blood were used. According to the Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>), the latter express TYMS. As a positive control for the RAD23B antibody, HCT-8 cells were spiked in healthy donor blood and filtered on ISET<sup>®</sup>. To create a negative control for ICC, the same cell line was used without primary antibodies in order to ensure exclusion of cross-reactivity. To confirm that analyzed CTCs were not leukocytes, staining with an anti-CD45 antibody was performed.

### 2.4. Chromogenic In situ Hybridization Assay for TYMS

TYMS mRNA was detected in intact cells by using a chromogenic in situ hybridization (CISH) assay employing RNAscope Technology (ACDbio, Newark, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Cytology methods standardized by our group were also used. Briefly, one spot was cut out for each patient sample and these were placed in individual wells of a 24-well plate. The membrane spots were hydrated with 1X TBS for 5 min before being incubated in 1% formaldehyde solution for 5 min at room temperature. The spots were then rinsed 2× with distilled water before applying 5–8 drops of RNAscope Hydrogen Peroxide (ACDbio) to each spot. After incubating the samples in a humid chamber for 10 min at room temperature, the spots were washed 2× with distilled water and mounted on slides. To each slide, 3 drops of cytology pepsin were applied. After 10 min at room temperature the spots were returned to the 24-well plate, washed 2× with distilled water, then rapidly dehydrated in successive 1-min incubations with 70%, 85%, and 100% ethanol solutions. After the spots were left to air dry on the slides, 3 drops of a TYMS-specific probe were added to each spot. After 2 h at 40 °C in a HybEZ oven hybridizer (ACDbio), drops of Amp1-6 solutions were added, according to the manufacturer's protocol, with washes performed with 1X TBS. Finally, the cells were incubated with chromogen and 50% haematoxylin then placed on slides with aqueous mounting media and coverslips. The samples were inspected with brightfield microscopy (BX61-Olympus; Olympus). To classify TYMS mRNA expression, an absence or presence of staining was classified as negative or positive, respectively.

### 2.5. Statistical Analysis

Initially, a descriptive analysis was performed to obtain absolute (*n*) and relative (%) frequency distributions. To evaluate possible associations between the variables of interest, a contingency table was constructed from sample data. Chi-square tests of independence or Fisher's exact test were used, as appropriate. The level of significance was set at 5% and all statistical analyses were performed by using the SPSS program for Windows, version 25.

## 3. Results

### 3.1. Patients

Thirty patients with rectal cancer were enrolled in this study between April 2016 and January 2018. Clinical characteristics of these patients are listed in Table 1. The mean age of this cohort was 56 years (range, 34–72) and 60% of the patients were male. For 67% of the patients, their rectal tumors were located 7 cm or less from the anal verge.

The baseline (prior to NCRT) T stage was cT2 for 4 patients (13%), cT3 for 21 patients (70%), and cT4 for 5 patients (17%). Baseline N stage was cN0 for 22 patients (73%) and cN+ for 8 patients (27%). The mean time to surgery completion following NCRT was 77 days. Pathologic T stage was

pT0 for 6 patients (20%), pT1 for 5 patients (17%), pT2 for 7 patients (23%), pT3 for 9 patients (30%), and pT4 for 2 patients (7%). Pathologic N stage was pN0 for 21 patients (70%), pN1 for 6 patients (20%), and pN2 for 2 patients (7%). One patient (3%) exhibited disease progression during NCRT. Complete pathologic response after preoperative therapy was detected in 6 patients (20%), while 7 patients (23%) had their tumors down-staged (ypT1-2N0).

**Table 1.** Patient characteristics.

Characteristics	N (%)
Average age (min–max), years	56 (34–72)
Gender	
Male	18 (60)
Female	12 (40)
Tumor distance from the anal verge	
≤7 cm	20 (67)
>7 cm	10 (33)
Clinical T baseline stage	
T2	04 (13)
T3	21 (70)
T4	05 (17)
Clinical N baseline stage	
N0	22 (73)
N+	08 (27)
Pathological T stage	
T0	06 (20)
T1–T2	12 (40)
T3–T4	11 (37)
DP	1 (3)
Pathological N stage	
N0	21 (70)
N1–N2	08 (27)
DP	01 (3)
Average time (min–max) of completion of RDT for surgery (days)	77 (50–143)

Abbreviations: DP: Disease Progression; RDT: radiotherapy.

All patients were treated with 25 fractions of 45 Gy to the pelvis with a 3D conformal technique. In addition, a 5.4-Gy radiation boost was applied to the primary tumor. There were no treatment delays or interruptions that lasted more than two days. Twenty-six patients (86.7%) received intravenous 5-FU and four patients (13.3%) received capecitabine. The main treatment toxicities were grade 1 or 2 diarrhea in 10 patients (33%) and grade 1 or 2 oral mucositis in 8 patients (27%). No grade 3 or 4 toxicities were reported. There were also no differences in adverse events between the two chemotherapy groups.

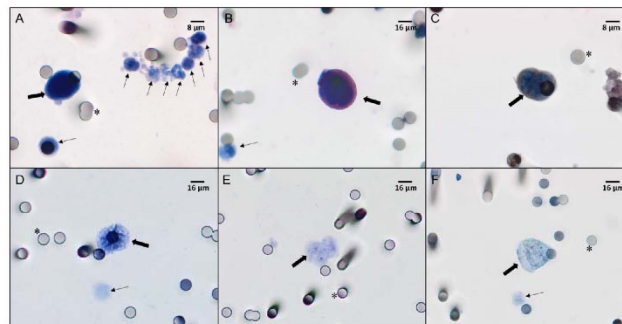
### 3.2. CTCs

CTCs were detected at S1 in all 30 patients of our cohort, and at S2 in 24 patients (Figure 1A,D). The mean CTC concentrations were 6 cells/mL at S1 and 3.5 cells/mL at S2. Kinetic analyses showed that CTC levels were increased in 3 patients, decreased in 22 patients, and remained unchanged in 5 patients. The mean CTC count per mL was 3.1 for those with pCR, 2.5 for those exhibiting a partial response (PR), and 2.9 for those with non-responsive tumors. Patients exhibiting pCR and PR showed a decrease in CTC kinetics (calculated as: CTC baseline [CTC1] × CTC post-CRT [CTC2]) during treatment ( $P = 0.02$  and  $P = 0.01$ , respectively; Table 2).

**Table 2.** Kinetic counts of circulating tumor cells (CTCs) between baseline (CTC1) and post-neoadjuvant chemoradiation (NCRT) (CTC2) time points.

9	Patient ID	CTCs/mL before NCRT	CTCs/mL after NCRT	Kinetics of CTC1 vs. CTC2	
CR	8	3	1	>	$P = 0.02$
	11	4	1	>	
	18	1	0	>	
	21	4	0	>	
	25	4	2	>	
	27	3	2	>	
PR	3	5	5	=	$P = 0.01$
	4	3	2	>	
	7	3	2	>	
	9	1	0	>	
	10	0	1	<	
	13	1	1	=	
	15	2	0	>	
	16	2	0	>	
	23	2	1	>	
	24	6	3	>	
	29	3	0	>	
30	2	2	=		
NR	1	3	4	<	$P = 0.07$
	2	3	2	>	
	5	1	1	=	
	6	1	1	=	
	12	1	4	<	
	14	2	1	>	
	17	3	1	>	
	19	4	2	>	
	20	5	1	>	
	22	8	4	>	
26	2	1	>		
28	2	1	>		

Abbreviations: NCRT: Neoadjuvant chemoradiotherapy; CR: Complete response; PR: Partial response; NR: No response.



**Figure 1.** Immunostaining (A–C) and chromogenic in situ hybridization (CISH) (D–F) of CTCs from locally advanced rectal cancer (LARC) patients. (A) CTCs and leukocytes visualized with haematoxylin-eosin staining ( $\times 40$  magnification). (B) CTCs stained with an anti-thymidylate synthase (TYMS) antibody, visualized with Permanent Red, and counterstained with haematoxylin ( $\times 40$  magnification). (C) CTCs stained with an anti-RAD23B antibody, visualized with 3,3-diaminobenzidine (DAB), and counterstained with haematoxylin ( $\times 60$  magnification). (D) CTCs negative for TYMS mRNA and counterstained with haematoxylin ( $\times 40$  magnification). (E) CTCs with a low TYMS mRNA signal (normal expression) counterstained with haematoxylin ( $\times 40$  magnification). (F) CTCs with a high TYMS mRNA signal (overexpression) counterstained with haematoxylin ( $\times 40$  magnification). All images were analyzed on a Research System Microscope BX61 (Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera (SC100-Olympus). Thick arrows indicate CTCs, thin arrows indicate leukocytes, and asterisks indicate  $8 \mu\text{m}$  pores of the ISET<sup>®</sup> membranes.

### 3.3. TYMS and RAD23B

At baseline, TYMS-positive CTCs were detected in 7 patients (23.5%) by ICC (Figure 1B) and in 21 patients (70%) by CISH (Figure 1E,F). RAD23B-positive CTCs were detected in 13 patients (43.3%) by ICC (Figure 1C).

After chemoradiation, TYMS-positive CTCs were detected in 10 patients (41.6%) by ICC, while TYMS mRNA was detected in 16 patients (61.5%) by CISH. RAD23B-positive CTCs were detected in 14 patients (58.3%).

Baseline TYMS mRNA and RAD23B-positive CTCs were associated with poor clinical response. For example, all 12 patients with non-responsive tumors had TYMS mRNA detected in their CTCs by CISH. In contrast, 83.5% of patients with pCR did not have CTCs expressing TYMS mRNA ( $P = 0.001$ ; Table 3). At S1, RAD23B-positive CTCs were detected in 33% of patients with pCR, in 16% of patients with PR, and in 75% of patients exhibiting no response ( $P = 0.01$ ). Thus, there was no association between detection of TYMS expression in CTCs by ICC and response type in S1 (Table 3). To confirm the value of these proteins as biomarkers, we compared these found with the most used clinical parameter, which is pathological response of the primary tumor. We found, for TYMS mRNA, 83.3% sensitivity, 83.3% specificity, and 95.2% positive predictive value (PPV) ( $p = 0.001$ ) (supplementary table).

**Table 3.** Expression profiles of RAD23B and TYMS proteins and TYMS mRNA.

		CR	PR	NR	
Before NCRT	CISH +	16.5	66.5	100	$P = 0.001$
	(TYMS) −	83.5	33.5	0	
	TYMS +	16.5	25	25	$P = 1.0$
	(protein) −	83.5	75	75	
	RAD +	33.5	16.5	75	$P = 0.01$
	(protein) −	66.5	83.5	25	
After NCRT	CISH +	25	30	100	$P = 0.001$
	(TYMS) −	75	70	0	
	TYMS +	0	0	83.5	$P = 0.0001$
	(protein) −	100	100	16.5	
	RAD +	0	25	100	$P = 0.0001$
	(protein) −	100	75	0	

Abbreviations: NCRT: Neoadjuvant chemoradiotherapy; CR: Complete response; PR: Partial response; NR: No response.

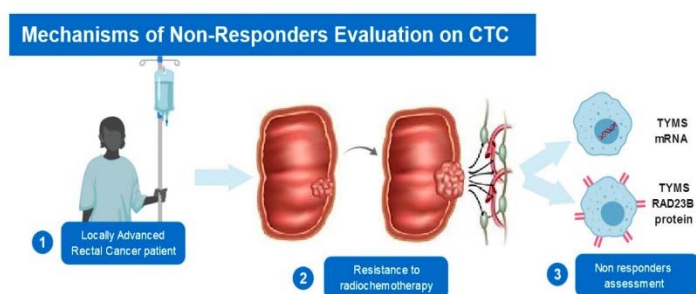
Post-chemoradiation analyses (S2) showed that expression of TYMS and RAD23B in CTCs strongly correlates with poor response. For example, TYMS-positive CTCs were not detected in the patients with pCR or pPR, yet they were detected in 83% of non-responsive patients ( $P < 0.001$ ; Table 3). Furthermore, TYMS mRNA expression at S2 correlated with response, with TYMS mRNA detected in all of the patients exhibiting no response ( $P = 0.001$ ). We found, for TYMS protein, 100% sensitivity, 50% specificity, and 100% positive predictive value (PPV) ( $p = 0.064$ ). For RAD23B, the values were: 100% sensitivity, 70% specificity, and 100% positive predictive value (PPV) ( $p = 0.01$ ) (supplementary table).

Lastly, we found that expression of TYMS and RAD23B in CTCs was strongly predictive of response type. For example, after NCRT, TYMS<sup>−</sup>/RAD23B<sup>−</sup> CTCs were detected in 100% of the pCR patients, in 83.5% of the PR patients, and in none of the NR patients. However, TYMS<sup>+</sup>/RAD23B<sup>+</sup> CTCs were not detected in patients with pCR or PR, and yet were detected in 83.5% of patients with no response ( $P = 0.001$ ). At S1, CTCs expressing TYMS and RAD23B did not correlate with response type ( $P = 0.1$ ; Table 4). Meanwhile, expression of TYMS mRNA determined which patients did not respond to chemoradiotherapy at S1 and S2 (Figure 2).

**Table 4.** Correlation between RAD and TYMS protein expression profiles.

Profile	CR %	PR %	NR %	
TYMS-/RAD-	50	66.5	16.5	Before NCRT $P = 0.1$
TYMS+/RAD+	0	8.5	16.5	
TYMS+/RAD-	50	25	67	
TYMS-/RAD+				
TYMS-/RAD-	100	83.5	0	After NCRT $P = 0.001$
TYMS+/RAD+	0	0	83.5	
TYMS+/RAD-	0	16.5	16.5	
TYMS-/RAD+				

Abbreviations: NCRT: Neoadjuvant chemoradiotherapy; CR: Complete response; PR: Partial response; NR: No response.



**Figure 2.** Scheme demonstrating both methodologies used to select responders and non-responders to neoadjuvant chemoradiotherapy: mRNA detected by CISH and protein expression detected by immunocytochemistry (ICC).

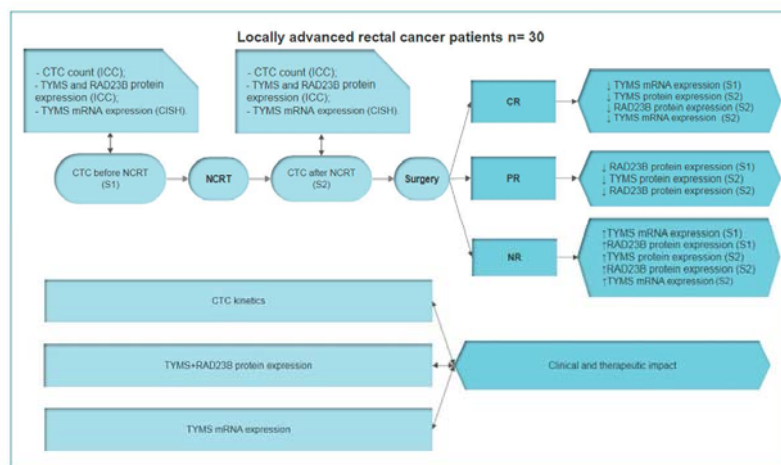
#### 4. Discussion

LARC treatment generally consists of NCRT followed by total mesorectal excision. For high-risk patients, postoperative adjuvant chemotherapy may additionally be considered [31]. The ability to identify patients who have undergone complete eradication of a tumor following NCRT is crucial. In the current study, we prospectively demonstrated a strong correlation between expression of TYMS and RAD23B by CTCs in patients with LARC and pCR following NCRT.

Among the 50–60% of patients with LARC who respond to NCRT (i.e., their tumors are down-staged following treatment), many exhibit improved survival. It has been reported that pCR after NCRT is associated with improved cancer outcome and significantly decreased rates of local recurrence. Conversely, the 40% non-response rate after NCRT [31] represents heterogeneity in response to standard treatment [32,33]. For the latter, new therapeutic strategies, avoidance of toxicity associated with ineffective treatment, and novel neoadjuvant chemotherapeutic options are needed [34,35]. In addition, the identification of biomarkers would facilitate the creation of individualized treatment plans.

The ability to identify tumors that do not respond to radiotherapy is useful for helping patients avoid radiation side effects such as fibrosis, fecal and bladder incontinence, diarrhea, dysuria, and myelosuppression [36,37]. This knowledge would also facilitate discussions regarding alternate approaches, such as more potent neoadjuvant multi-agent chemotherapy strategies or a rationale for foregoing radiation therapy. There are several studies that have discussed these considerations, although robust biomarkers that will predict non-responders of NCRT with high accuracy still need to be identified [37–39]. In the present study, we were able to identify NCRT non-responders at S1 by detecting TYMS mRNA. Thus, it is possible that detection of TYMS mRNA in CTCs could represent a valuable tool in identifying non-responder patients prior to the start of NCRT. Furthermore, detection of

RAD23B expression could make this patient selection process more accurate. It is well-established that RAD23B is involved in DNA repair following radiation damage, and its identification in CTCs can guide treatment plans. In the present study, 75% of non-responding tumors expressed this protein on CTCs before NCRT. Furthermore, when both RAD23B and TYMS protein expression on CTCs were detected after NCRT, 100% of patients with pCR did not express either protein. Meanwhile, 83.5% of patients with non-responsive tumors expressed both proteins and the remaining 16.5% expressed at least one of these proteins. In addition, *TYMS* mRNA expression after NCRT showed high positivity for non-responders (100%) and was not related to protein expression (Figure 3). For the seven patients who presented discordant mRNA/protein positivity at S1 (Supplementary Table S1), they exhibited a correspondence between *TYMS* gene expression and TYMS protein expression at S2. Chemotherapeutic agents have previously been associated with changes in gene expression. In addition, post-transcriptional mechanisms for blocking protein synthesis have been characterized [40–42]. For 5-FU, there are several papers that describe this correlation [43,44]. The present results support the hypothesis that CTC analysis can be a useful tool for identifying patients who will respond to chemoradiotherapy. As a result, a “watch and wait” strategy becomes an option to be considered in addition to radical surgery.



**Figure 3.** Summary of methodologies, analyses, and results in the present study. Patients were enrolled prior to the start of NCRT. Blood was collected to perform CTC counts and molecular analyses. At baseline, complete response (CR) correlated with low levels of *TYMS* mRNA. In contrast, NR correlated with high levels of *TYMS* mRNA and RAD23B protein expression. Blood samples were collected again during follow-up after NCRT. CTC analyses showed that CR correlated to low levels of *TYMS* mRNA and RAD23B protein expression, while NR correlated to high levels of *TYMS* mRNA and RAD23B/*TYMS* protein expression. CTC kinetics also correlated to pathological response. Based on these results, *TYMS* mRNA and RAD23B and *TYMS* protein expression appear to have a clinical and therapeutic impact in LARC patients. Abbreviations: CR: Complete response; LARC: Locally advanced rectal cancer; NCRT: Neoadjuvant chemoradiotherapy; NR: No response; PR: Partial response.

Our analysis of RAD23B and *TYMS* expression showed similar profiles for these two proteins. Based on the different protein patterns for *TYMS* in relation to pCR and PR at S1 and S2, we decided to further examine the mRNA expression of *TYMS* with RNA hybridization assays performed in situ with CTCs. All of the CTCs from non-responding patients expressed *TYMS* mRNA at both S1 and

S2. Thus, this assay exhibited high sensitivity and specificity for identifying LARC patients who are predicted to be non-responders to radiochemotherapy.

After NCRT, TYMS expression exhibited a strong correlation with *TYMS* mRNA (kappa value 0.6;  $P = 0.003$ ) in absence of response to treatment. This second assay at S2 cost less to perform besides the possibility of performing more than one protein per time on the CTCs isolated by ISET® methodology. Furthermore, we previously showed that elevated TYMS expression in CTCs was associated with poor prognosis among patients with metastatic colorectal cancer [26].

TYMS, a downstream target molecule of 5-FU, plays a key role in DNA synthesis. The enzyme catalyzes deoxyuridine monophosphate methylation to produce deoxythymidine triphosphate, and subsequently, thymidylate. Increased TYMS expression is thought to be responsible for 5-FU resistance in patients with colorectal cancer [42,43]. Meanwhile, RAD23B is a member of the nucleotide excision repair system, which stabilizes the xeroderma pigmentosum complementation group C (XPC) protein and potentiates its interaction with damaged DNA [45]. XPC subsequently initiates nucleotide excision repair. It is not clear why increased production of RAD23B protein was observed in CTCs from non-responders to NCRT in the present study. A possible hypothesis is that increased levels of this repair protein during treatment make it difficult to eliminate cancer cells by NCRT, a strategy that is based on inducing apoptosis as a result of DNA damage.

A treatment approach that deserves discussion in the context of our study is the “watch and wait” strategy. For the patients whose tumors respond completely to NCRT (as evidenced by radiologic, clinical, and endoscopic evaluations), a “watch and wait” strategy may allow patients to avoid the morbidity, mortality, and functional consequences of radical surgical treatment. A recently published meta-analysis of 880 patients who were monitored with a “watch and wait” strategy showed that the strategy can be safely incorporated into a multidisciplinary management plan for the treatment of patients with rectal cancer who achieve pCR after neoadjuvant treatment [12,46–48]. Therefore, identification of a biomarker that can predict pCR to NCRT treatment prior to treatment, or in the early stages of treatment, would be of great clinical utility in combination with commonly used clinical parameters.

In the present study, it was observed that 100% of patients who responded to NCRT did not express TYMS or RAD23B proteins on their CTCs at the beginning of their follow-up monitoring. This lack of protein expression in CTCs is consistent with imaging and kinetic studies that have showed a reduction or elimination of CTCs post NCRT. Furthermore, we observed that CTC kinetics correlated with disease outcome for our patients with LARC. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate this result. The observed decrease in CTC levels during treatment in our cases involving complete or partial responses further support the use of CTC analyses to predict response to NCRT.

In summary, our results provide valuable data regarding two potential biomarkers of chemoradiation resistance in patients undergoing neoadjuvant treatment for LARC. Despite the small sample size of our study, CTC kinetics, as well as *TYMS* mRNA and/or RAD23B/TYMS protein expression in CTCs, were found to strongly correlate with pCR. Further studies are needed to validate these findings with a larger patient cohort. If CTC analysis proves useful in predicting pCR with high accuracy, many patients may be spared radical surgery for rectal cancer treatment. In addition, biomarker and kinetic analyses of CTCs may identify potential non-responders to treatment with NCRT, thereby identifying a need to evaluate other forms of therapy for these patients.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/7/641/s1>, Table S1: table of sensitivity, specificity and predictive values of biomarkers evaluated.

**Author Contributions:** B.C.T.F.: conception/design, data analysis and interpretation, collection and/or assembly of data, manuscript writing; V.S.e.S.: conception/design, provision of study material or patients, collection and/or assembly of data, manuscript writing; E.A.A.: data analysis and interpretation; C.A.L.M.: provision of study material or patients; M.L.G.S.: data analysis and interpretation; G.G.M.: data analysis and interpretation; A.C.B.: data analysis and interpretation; S.A.J.: conception/design; L.T.D.C.: conception/design, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript.



**Funding:** Funding was received from the Public Ministry of Brazil (TAC-MP- PAJ no. 000968.2012.10.000/0) and the National Institute for Science and Technology in Oncogenomics and Therapeutic Innovation (INCT FAPESP/CNPq 2014/50943-1).

**Acknowledgments:** We thank the Public Ministry (TAC-MP- PAJ no. 000968.2012.10.000/0), the National Institute for Science and Technology in Oncogenomics and Therapeutic Innovation (INCT FAPESP/CNPq 2014/50943-1), and the São Paulo Research Foundation (2016/18786-9) for financial support for this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no potential conflicts of interest.

## References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Cravo, M.; Rodrigues, T.; Ouro, S.; Ferreira, A.; Féria, L.; Maio, R. Management of rectal cancer: Times they are changing. *GE Port. J. Gastroenterol.* **2014**, *21*, 192–200. [[CrossRef](#)]
3. Gaertner, W.B.; Kwaan, M.R.; Madoff, R.D.; Melton, G.B. Rectal cancer: An evidence-based update for primary care providers. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 7659–7671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Li, Y.; Wang, J.; Ma, X.; Tan, L.; Yan, Y.; Xue, C.; Hui, B.; Liu, R.; Ma, H.; Ren, J. A Review of Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2016**, *12*, 1022–1031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ryan, J.E.; Warrier, S.K.; Lynch, A.C.; Ramsay, R.G.; Phillips, W.A.; Heriot, A.G. Predicting pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer: a systematic review. *Colorectal Dis.* **2016**, *18*, 234–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Zou, X.-C.; Wang, Q.-W.; Zhang, J.-M. Comparison of 5-FU-based and Capecitabine-based Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Patients With Rectal Cancer: A Meta-analysis. *Clin. Colorectal Cancer* **2017**, *16*, e123–e139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Schmoll, H.-J.; Haustermans, K.; Price, T.J.; Nordlinger, B.; Hofheinz, R.; Daisne, J.-F.; Janssens, J.; Brenner, B.; Schmidt, P.; Reinel, H.; et al. Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with capecitabine +/- oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: Final results of PETACC-6. *JCO* **2018**, *36*, 3500. [[CrossRef](#)]
8. Pozo, M.E.; Fang, S.H. Watch and wait approach to rectal cancer: A review. *World J. Gastrointest. Surg.* **2015**, *7*, 306–312. [[CrossRef](#)]
9. Vojtišek, R.; Korčáková, E.; Maňan, J.; Šorejs, O.; Finek, J. Neoadjuvant chemoradiotherapy of the rectal carcinoma - The correlation between the findings on the restaging multiparametric 3T MRI scanning and the surgical findings. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **2017**, *22*, 265–276. [[CrossRef](#)]
10. Molinari, C.; Matteucci, F.; Caroli, P.; Passardi, A. Biomarkers and Molecular Imaging as Predictors of Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Patients With Locally Advanced Rectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **2015**, *14*, 227–238. [[CrossRef](#)]
11. van der Valk, M.J.M.; Hilling, D.E.; Bastiaannet, E.; Meershoek-Klein Kranenbarg, E.; Beets, G.L.; Figueiredo, N.L.; Habr-Gama, A.; Perez, R.O.; Renehan, A.G.; van de Velde, C.J.H.; et al. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWW): an international multicentre registry study. *Lancet* **2018**, *391*, 2537–2545. [[PubMed](#)]
12. Fernandez-Martos, C.; Garcia-Albeniz, X.; Pericay, C.; Maurel, J.; Aparicio, J.; Montagut, C.; Safont, M.J.; Salud, A.; Vera, R.; Massuti, B.; et al. Chemoradiation, surgery and adjuvant chemotherapy versus induction chemotherapy followed by chemoradiation and surgery: long-term results of the Spanish GCR-3 phase II randomized trial. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 1722–1728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cercek, A.; Roxburgh, C.S.D.; Strombom, P.; Smith, J.J.; Temple, L.K.F.; Nash, G.M.; Guillem, J.G.; Paty, P.B.; Yaeger, R.; Stadler, Z.K.; et al. Adoption of Total Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *JAMA Oncol.* **2018**, *4*, e180071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yamashita, K.; Matsuda, T.; Hasegawa, H.; Mukohyama, J.; Arimoto, A.; Tanaka, T.; Yamamoto, M.; Matsuda, Y.; Kanaji, S.; Nakamura, T.; et al. Recent advances of neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: Future treatment perspectives. *Ann. Gastroenterol. Surg.* **2019**, *3*, 24–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Sun, W.; Li, G.; Wan, J.; Zhu, J.; Shen, W.; Zhang, Z. Circulating tumor cells: A promising marker of predicting tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemo-radiation therapy. *Oncotarget* **2016**, *7*, 69507–69517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Cristofanilli, M.; Hayes, D.F.; Budd, G.T.; Ellis, M.J.; Stopeck, A.; Reuben, J.M.; Doyle, G.V.; Matera, J.; Allard, W.J.; Miller, M.C.; et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1420–1430. [[CrossRef](#)]
17. Cohen, S.J.; Punt, C.J.A.; Iannotti, N.; Saidman, B.H.; Sabbath, K.D.; Gabrail, N.Y.; Picus, J.; Morse, M.; Mitchell, E.; Miller, M.C.; et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3213–3221. [[CrossRef](#)]
18. León-Mateos, L.; Vieito, M.; Anido, U.; López López, R.; Muínelo Romay, L. Clinical Application of Circulating Tumour Cells in Prostate Cancer: From Bench to Bedside and Back. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1580. [[CrossRef](#)]
19. Souza E Silva, V.; Chinen, L.T.D.; Abdallah, E.A.; Damascena, A.; Paludo, J.; Chojniak, R.; Dettino, A.L.A.; de Mello, C.A.L.; Alves, V.S.; Fanelli, M.F. Early detection of poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer: tumor kinetics evaluated by circulating tumor cells. *Oncol. Targets Ther.* **2016**, *9*, 7503–7513. [[CrossRef](#)]
20. Yan, W.-T.; Cui, X.; Chen, Q.; Li, Y.-F.; Cui, Y.-H.; Wang, Y.; Jiang, J. Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis. *Sci Rep* **2017**, *7*, 43464. [[CrossRef](#)]
21. Benini, S.; Gamberi, G.; Cocchi, S.; Garbetta, J.; Alberti, L.; Righi, A.; Gambarotti, M.; Picci, P.; Ferrari, S. Detection of circulating tumor cells in liquid biopsy from Ewing sarcoma patients. *Cancer Manag. Res.* **2018**, *10*, 49–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Pantel, K.; Alix-Panabières, C. Liquid biopsy and minimal residual disease—latest advances and implications for cure. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
23. Kuremsky, J.G.; Tepper, J.E.; McLeod, H.L. Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2009**, *74*, 673–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Conradi, L.-C.; Bleckmann, A.; Schirmer, M.; Sprenger, T.; Jo, P.; Homayounfar, K.; Wolff, H.A.; Rothe, H.; Middel, P.; Becker, H.; et al. Thymidylate synthase as a prognostic biomarker for locally advanced rectal cancer after multimodal treatment. *Ann. Surg. Oncol.* **2011**, *18*, 2442–2452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Watkins, J.F.; Sung, P.; Prakash, L.; Prakash, S. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 7757–7765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Schaubert, C.; Chen, L.; Tongaonkar, P.; Vega, I.; Lambertson, D.; Potts, W.; Madura, K. Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* **1998**, *391*, 715–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Pérez-Mayoral, J.; Pacheco-Torres, A.L.; Morales, L.; Acosta-Rodríguez, H.; Matta, J.L.; Dutil, J. Genetic polymorphisms in RAD23B and XPC modulate DNA repair capacity and breast cancer risk in Puerto Rican women. *Mol. Carcinog.* **2013**, *52*, E127–E138. [[CrossRef](#)]
28. Abdallah, E.A.; Fanelli, M.F.; Buim, M.E.C.; Machado Netto, M.C.; Gasparini Junior, J.L.; Souza E Silva, V.; Dettino, A.L.A.; Mingues, N.B.; Romero, J.V.; Ocea, L.M.M.; et al. Thymidylate synthase expression in circulating tumor cells: a new tool to predict 5-fluorouracil resistance in metastatic colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* **2015**, *137*, 1397–1405. [[CrossRef](#)]
29. Krebs, M.G.; Hou, J.-M.; Sloane, R.; Lancashire, L.; Priest, L.; Nonaka, D.; Ward, T.H.; Backen, A.; Clack, G.; Hughes, A.; 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*, 306–315. [[CrossRef](#)]
30. Khoja, L.; Backen, A.; Sloane, R.; Menasce, L.; Ryder, D.; Krebs, M.; Board, R.; Clack, G.; Hughes, A.; Blackhall, F.; et al. A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 508–516. [[CrossRef](#)]
31. Sung, S.; Son, S.H.; Park, E.Y.; Kay, C.S. Prognosis of locally advanced rectal cancer can be predicted more accurately using pre- and post-chemoradiotherapy neutrophil-lymphocyte ratios in patients who received preoperative chemoradiotherapy. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Powell, A.A.; Talasaz, A.H.; Zhang, H.; Coram, M.A.; Reddy, A.; Deng, G.; Telli, M.L.; Advani, R.H.; Carlson, R.W.; Mollick, J.A.; et al. Single Cell Profiling of Circulating Tumor Cells: Transcriptional Heterogeneity and Diversity from Breast Cancer Cell Lines. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e33788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Greenbaum, A.; Martin, D.R.; Bocklage, T.; Lee, J.-H.; Ness, S.A.; Rajput, A. Tumor Heterogeneity as a Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Franke, A.J.; Parekh, H.; Starr, J.S.; Tan, S.A.; Iqbal, A.; George, T.J. Total Neoadjuvant Therapy: A Shifting Paradigm in Locally Advanced Rectal Cancer Management. *Clin. Colorectal Cancer* **2018**, *17*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Garcia-Aguilar, J.; Chen, Z.; Smith, D.D.; Li, W.; Madoff, R.D.; Cataldo, P.; Marcet, J.; Pastor, C. Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Ann. Surg.* **2011**, *254*, 486–492, discussion 492–493. [[CrossRef](#)]
36. Santos, M.D.; Silva, C.; Rocha, A.; Nogueira, C.; Castro-Poças, F.; Araujo, A.; Matos, E.; Pereira, C.; Medeiros, R.; Lopes, C. Predictive clinical model of tumor response after chemoradiation in rectal cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 58133–58151. [[CrossRef](#)]
37. Sun, Y.; Wu, X.; Zhang, Y.; Lin, H.; Lu, X.; Huang, Y.; Chi, P. Pathological complete response may underestimate distant metastasis in locally advanced rectal cancer following neoadjuvant chemoradiotherapy and radical surgery: Incidence, metastatic pattern, and risk factors. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
38. Gotanda, K.; Hirota, T.; Matsumoto, N.; Ieiri, I. MicroRNA-433 negatively regulates the expression of thymidylate synthase (TYMS) responsible for 5-fluorouracil sensitivity in HeLa cells. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 369. [[CrossRef](#)]
39. Kwon, M.J.; Soh, J.S.; Lim, S.-W.; Kang, H.S.; Lim, H. HER2 as a limited predictor of the therapeutic response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. *Pathol.-Res. Pract.* **2019**, *215*, 910–917. [[CrossRef](#)]
40. Kaneno, R.; Shurin, G.V.; Kaneno, F.M.; Naiditch, H.; Luo, J.; Shurin, M.R. Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. *Cell Oncol. (Dordr)* **2011**, *34*, 97–106. [[CrossRef](#)]
41. Lee, S.-C.; Xu, X.; Lim, Y.-W.; Iau, P.; Sukri, N.; Lim, S.-E.; Yap, H.L.; Yeo, W.-L.; Tan, P.; Tan, S.-H.; et al. Chemotherapy-induced tumor gene expression changes in human breast cancers. *Pharmacogenet. Genomics* **2009**, *19*, 181–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Negrei, C.; Hudita, A.; Ginghina, O.; Galateanu, B.; Voicu, S.N.; Stan, M.; Costache, M.; Fenga, C.; Drakoulis, N.; Tsatsakis, A.M. Colon Cancer Cells Gene Expression Signature As Response to 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, and Folinic Acid Treatment. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Tang, M.; Lu, X.; Zhang, C.; Du, C.; Cao, L.; Hou, T.; Li, Z.; Tu, B.; Cao, Z.; Li, Y.; et al. Downregulation of SIRT7 by 5-fluorouracil induces radiosensitivity in human colorectal cancer. *Theranostics* **2017**, *7*, 1346–1359. [[CrossRef](#)]
44. Liang, X.; Shi, H.; Yang, L.; Qiu, C.; Lin, S.; Qi, Y.; Li, J.; Zhao, A.; Liu, J. Inhibition of polypyrimidine tract-binding protein 3 induces apoptosis and cell cycle arrest, and enhances the cytotoxicity of 5-fluorouracil in gastric cancer cells. *Br. J. Cancer* **2017**, *116*, 903–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ng, J.M.Y.; Vermeulen, W.; van der Horst, G.T.J.; Bergink, S.; Sugawara, K.; Vrieling, H.; Hoeijmakers, J.H.J. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 1630–1645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Xu, W.; Jiang, H.; Zhang, F.; Gao, J.; Hou, J. MicroRNA-330 inhibited cell proliferation and enhanced chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer by directly targeting thymidylate synthase. *Oncol. Lett.* **2017**, *13*, 3387–3394. [[CrossRef](#)]
47. Bunick, C.G.; Miller, M.R.; Fuller, B.E.; Fanning, E.; Chazin, W.J. Biochemical and structural domain analysis of xeroderma pigmentosum complementation group C protein. *Biochemistry* **2006**, *45*, 14965–14979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Rushworth, D.; Mathews, A.; Alpert, A.; Cooper, L.J.N. Dihydrofolate Reductase and Thymidylate Synthase Transgenes Resistant to Methotrexate Interact to Permit Novel Transgene Regulation. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 22970–22976. [[CrossRef](#)]



## 5 DISCUSSÃO

O tratamento do CRLA consiste em QRTn seguido de excisão total mesorretal. Para pacientes de alto risco, a quimioterapia adjuvante pós-operatória também pode ser considerada (SUNG et al. 2017). A capacidade de identificar pacientes que foram submetidos à erradicação completa de um tumor após a NCRT é crucial. No presente estudo, demonstramos prospectivamente uma forte correlação entre a expressão de TYMS e RAD23B nas CTCs em pacientes com CRLA e resposta completa após QRTn.

Entre os 50-60% dos pacientes com LARC que respondem à QRTn (ou seja, seus tumores são reduzidos após o tratamento), muitos apresentam melhor sobrevida. Foi relatado que a RC após a QRTn está associada a melhor resposta e taxas significativamente menores de recorrência local. Por outro lado, a taxa de não resposta de 40% após a QRTn (SUNG et al. 2017) representa heterogeneidade em resposta ao tratamento padrão (POWELL et al. 2012; GREENBAUM et al. 2019). Para este último, são necessárias novas estratégias terapêuticas, prevenção da toxicidade associada ao tratamento ineficaz e novas opções quimioterápicas neoadjuvantes (GARCIA-AGUILAR et al. 2011; FRANKE et al. 2018). Além disso, a identificação de biomarcadores facilitaria a criação de planos de tratamento individualizados.

A capacidade de identificar tumores que não respondem à radioterapia é útil para ajudar os pacientes a evitar efeitos colaterais da radiação, como fibrose, incontinência fecal e da bexiga, diarreia, disúria e mielossupressão

(SANTOS et al. 2017; SUN et al. 2019). Esse conhecimento também facilitaria discussões sobre abordagens alternativas, como estratégias de quimioterapia neoadjuvante mais potente com múltiplos agentes ou uma justificativa para a radioterapia anterior. Existem vários estudos que discutiram essas considerações, embora biomarcadores robustos que predizem não respondedores da QRTn com alta precisão ainda precisam ser identificados (GOTANDA et al. 2013; KWON et al. 2019; SUN et al. 2019). No presente estudo, conseguimos identificar os não respondedores da QRTn na primeira coleta, detectando o mRNA do TYMS. Assim, é possível que a avaliação da expressão gênica de TYMS diretamente nas CTCs possa representar uma ferramenta valiosa na identificação de pacientes não respondedores, antes do início da QRTn. Além disso, a detecção da expressão de RAD23B pode tornar esse processo de seleção de pacientes mais preciso. Está bem estabelecido o envolvimento da proteína RAD23B no reparo do DNA após danos causados pela radiação, e sua identificação nas CTCs pode orientar os planos de tratamento. No presente estudo, 75% dos tumores que não responderam, expressaram essa proteína nas CTCs antes da QRTn. Além disso, quando a expressão das proteínas RAD23B e TYMS nas CTCs foi detectada após a NCRT, 100% dos pacientes com RC não expressaram nenhuma das proteínas. Enquanto isso, 83,5% dos pacientes com tumores não responsivos expressavam ambas as proteínas e os 16,5% restantes expressavam pelo menos uma dessas proteínas. Além disso, a expressão do RNAm do TYMS após a NCRT mostrou alta positividade para não respondedores (100%) e não estava relacionada à expressão da proteína. Para os sete pacientes que

apresentaram positividade discordante para mRNA/proteína na coleta 1, eles apresentaram uma correspondência entre a expressão do gene TYMS e a expressão da proteína TYMS na coleta 2. Os agentes quimioterapêuticos foram previamente associados a alterações na expressão gênica. Além disso, mecanismos pós-transcricionais para bloquear a síntese proteica foram caracterizados (LEE et al. 2009; NEGREI et al. 2016; KANENO et al. 2019). Diversos trabalhos descrevem essa correlação com o 5-FU (LIANG et al. 2017; TANG et al. 2017). Os presentes resultados sustentam a hipótese de que a análise da CTC pode ser uma ferramenta útil para identificar pacientes que responderão à quimiorradioterapia. Como resultado, a estratégia de “watch and wait” se torna uma opção a ser considerada além da cirurgia radical.

Após a NCRT, a expressão protéica de TYMS exibiu uma forte correlação com o mRNA de TYMS (valor kappa 0,6; P = 0,003) na ausência de resposta ao tratamento. Além disso, mostramos anteriormente que a expressão elevada de TYMS nas CTCs estava associada a um mau prognóstico entre pacientes com câncer colorretal metastático (SCHAUBER et al. 1998).

TYMS, uma molécula alvo de 5-FU, desempenha um papel fundamental na síntese de DNA. A enzima catalisa a metilação do monofosfato de desoxiuridina para produzir trifosfato de desoxitimidina e, posteriormente, timidilato. Pensa-se que o aumento da expressão de TYMS seja responsável pela resistência à 5-FU em pacientes com câncer colorretal (NEGREI et al. 2016; TANG et al. 2017). Enquanto isso, o RAD23B é um

membro do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos, que estabiliza a proteína do grupo C de complementação com xeroderma pigmentoso (XPC) e potencializa sua interação com o DNA danificado (NG et al. 2003). O XPC inicia subsequentemente o reparo por excisão de nucleotídeo. Não está claro por que foi observado aumento da produção da proteína RAD23B em CTCs de não respondedores a QRTn no presente estudo. Uma hipótese possível é que níveis aumentados dessa proteína de reparo durante o tratamento dificultem a eliminação das células cancerígenas pela QRTn, uma estratégia baseada na indução de apoptose como resultado de danos no DNA.

Uma abordagem de tratamento que merece discussão no contexto de nosso estudo é a estratégia “watch and wait”. Para os pacientes cujos tumores respondem completamente a QRTn (como evidenciado por avaliações radiológicas, clínicas e endoscópicas), a estratégia de “watch and wait” pode reduzir a morbidade, a mortalidade e as conseqüências funcionais do tratamento cirúrgico radical. Uma meta-análise recentemente publicada de 880 pacientes que foram monitorados utilizando a estratégia de “watch and wait” mostrou que a estratégia pode ser incorporada com segurança a um plano de gerenciamento multidisciplinar para o tratamento de pacientes com câncer retal que atingem a RC após tratamento neoadjuvante (BUNICK et al. 2006; RUSHWORTH et al. 2015; FERNANDEZ-MARTOS et al. 2015). Portanto, a identificação de um biomarcador que possa prever a resposta completa dos pacientes para a QRTn antes do tratamento, ou nos estágios iniciais do tratamento, seria de grande utilidade clínica em combinação com parâmetros clínicos comumente usados.

No presente estudo, observou-se que 100% dos pacientes que responderam a QRTn não expressaram proteínas TYMS ou RAD23B em suas CTCs no início do acompanhamento. Essa falta de expressão de proteínas nos CTCs é consistente com estudos de imagem e cinéticos que mostraram uma redução ou eliminação dos CTCs após a QRTn. Além disso, observamos que a cinética da CTC se correlacionou com o resultado da doença em nossos pacientes com CRLA. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a demonstrar esse resultado. A diminuição observada nos níveis de CTC durante o tratamento em nossos casos, envolvendo respostas completas ou parciais, apoia ainda mais o uso de análises de CTC para prever a resposta ao QRTn.

Em resumo, nossos resultados fornecem dados valiosos sobre dois biomarcadores potenciais de resistência à quimiorradiação em pacientes submetidos a tratamento neoadjuvante para CRLA. Apesar do pequeno tamanho da amostra de nosso estudo, a cinética da CTC, bem como a expressão do mRNA do TYMS e / ou da proteína RAD23B / TYMS nas CTCs, mostrou forte correlação com o RC. Mais estudos são necessários para validar esses achados com uma coorte maior de pacientes. Se a análise das CTCs se mostrar útil na previsão de RC com alta precisão, muitos pacientes podem ser poupados de uma cirurgia radical para tratamento do câncer retal. Além disso, análises de biomarcadores e cinética das CTCs podem identificar potenciais não respondedores ao tratamento com QRTn, identificando, assim, a necessidade de avaliar outras formas de terapia para esses pacientes.



## 6 CONCLUSÃO

- ✓ Encontramos dois potenciais biomarcadores de resistência à quimiorradiação em pacientes submetidos a tratamento neoadjuvante para LARC, TYMS e RAD23b, expressos em CTCs;
- ✓ Apesar do pequeno tamanho amostral de nosso estudo, a cinética da CTC, bem como a expressão do mRNA do TYMS e/ou das proteínas RAD23B/TYMS apresentaram forte correlação com a resposta completa dos pacientes ao tratamento. Mais estudos são necessários para validar esses achados com uma coorte maior de pacientes.
- ✓ Caso a análise das CTCs, com estudos mais amplos, mostre-se útil, prevendo resposta completa com alta precisão, muitos pacientes podem ser poupados de uma cirurgia radical para tratamento do câncer retal. Além disso, as análises de biomarcadores e cinética das CTCs podem identificar potenciais não respondedores ao tratamento com NCRT, identificando assim a necessidade de avaliar outras formas de terapia para esses pacientes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Baxter NN, Hartman LK, Tepper JE, et al. Postoperative irradiation for rectal cancer increases the risk of small bowel obstruction after surgery. **Ann Surg** 2007; 245:553-9.

Binefa G, Garcia M., Milà N, et al. Colorectal cancer screening programme in Spain: results of key performance indicators after five rounds (2000–2012). **Sci Rep** 2016; 6:19532.

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.

Bunick CG, Miller MR, Fuller BE, Fanning E, Chazin WJ. Biochemical and structural domain analysis of xeroderma pigmentosum complementation group C protein. **Biochemistry** 2006; 45:14965-79.

Conradi L-C, Bleckmann A, Schirmer M, et al. Thymidylate synthase as a prognostic biomarker for locally advanced rectal cancer after multimodal treatment. **Ann Surg Oncol** 2011; 18:2442-52.

Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer. **Cancer** 2012; 118:3636-44.

Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. **Hum Mol Genet** 1997; 6:105-10.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** 2015; 136:E359-E86.

Fernandez-Martos C, Garcia-Albeniz X, Pericay C, et al. Chemoradiation, surgery and adjuvant chemotherapy versus induction chemotherapy followed by chemoradiation and surgery: long-term results of the Spanish GCR-3 phase II randomized trial. **Ann Oncol** 2015; 26:1722-8.

Franke AJ, Parekh H, Starr JS, Tan SA, Iqbal A, George TJ Jr. Total neoadjuvant therapy: a shifting paradigm in locally advanced rectal cancer management. **Clin Colorectal Cancer** 2018, 17:1-12.

Garcia-Aguilar J, Chen Z, Smith DD, et al. Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. **Ann Surg** 2011, 254:486-92.

Gotanda K, Hirota T, Matsumoto N, Ieiri I. MicroRNA-433 negatively regulates the expression of thymidylate synthase (TYMS) responsible for 5-fluorouracil sensitivity in HeLa cells. **BMC Cancer** 2013; 13:369.

Greenbaum A, Martin DR, Bocklage T, Lee J-H, Ness SA, Rajput A. Tumor heterogeneity as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer. **Clin Colorectal Cancer** 2019; 18:102-9.

Hofheinz RD, Wenz F, Post S, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2012; 13:579-88.

Hong S, Bardwell WA, Natarajan L, et al. Correlates of physical activity level in breast cancer survivors participating in the Women's Healthy Eating and Living (WHEL) Study. **Breast Cancer Res Treat** 2007; 101:225-32.

Kaneno R, Shurin GV, Kaneno FM, Naiditch H, Luo J, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. **Cell Oncol (Dordr)** 2011, 34:97-106.

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

Kuremsky JG, Tepper JE, McLeod HL. Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2009; 74:673-88.

Kwon MJ, Soh JS, Lim SW, Kang HS, Lim H. HER2 as a limited predictor of the therapeutic response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. **Pathol Res Pract** 2019, 215:910-7.

Lee SC, Xu X, Lim YW, et al. Chemotherapy-induced tumor gene expression changes in human breast cancers. **Pharmacogenet Genomics** 2009; 19:181-92.

Liang X, Shi H, Yang L, et al. Inhibition of polypyrimidine tract-binding protein 3 induces apoptosis and cell cycle arrest, and enhances the cytotoxicity of 5-fluorouracil in gastric cancer cells. **Br J Cancer** 2017; 116:903-11.

Magni E, Botteri E, Ravenda PS, et al. Detection of circulating tumor cells in patients with locally advanced rectal cancer undergoing neoadjuvant therapy followed by curative surgery. **Int J Colorectal Dis** 2014; 29:1053-9.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2018 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2019.

Negrei C, Hudita A, Ginghina O, et al. Colon cancer cells gene expression signature as response to 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, and folinic acid treatment. **Front Pharmacol** 2016; 7:172.

Ng JMY, Vermeulen W, van der Horst GTJ, et al. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. **Genes Dev** 2003; 17:1630-45.

O'Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ, et al. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. **J Clin Oncol** 1997; 15:246-50.

Payne RE, Wang F, Su N, et al. Viable circulating tumour cell detection using multiplex RNA in situ hybridisation predicts progression-free survival in metastatic breast cancer patients. **Br J Cancer** 2012; 106:1790-7.

Pérez-Mayoral J, Pacheco-Torres AL, Morales L, Acosta-Rodríguez H, Matta JL, Dutil J. Genetic polymorphisms in RAD23B and XPC modulate DNA repair capacity and breast cancer risk in Puerto Rican women. **Mol Carcinog** 2013; 52:E127-E38.

Piñol V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **JAMA** 2005; 293:1986-94.

Powell AA, Talasz AH, Zhang H, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. **PLoS ONE** 2012; 7:e33788.

Rahbari NN, Bork U, Kircher A, et al. Compartmental differences of circulating tumor cells in colorectal cancer. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:2195-202.

Rushworth D, Mathews A, Alpert A, Cooper LNJ. Dihydrofolate reductase and thymidylate synthase transgenes resistant to methotrexate interact to permit novel transgene regulation. **J Biol Chem** 2015; 290:22970-6.

Santos MD, Silva, C, Rocha A, et al. Predictive clinical model of tumor response after chemoradiation in rectal cancer. **Oncotarget** 2017; 8:58133-51.

Schauber C, Chen L, Tongaonkar P, et al. Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. **Nature** 1998; 391:715-8.

Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF, et al. Colorectal cancer incidence patterns in the United States, 1974-2013. **J Natl Cancer Inst** 2017; 109:djw322.

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

Sun Y, Wu X, Zhang Y, et al. Pathological complete response may underestimate distant metastasis in locally advanced rectal cancer following neoadjuvant chemoradiotherapy and radical surgery: incidence, metastatic pattern, and risk factors. **Eur J Surg Oncol** 2019; 45:1225-31.

Sung S, Son SH, Park EY, Kay CS. Prognosis of locally advanced rectal cancer can be predicted more accurately using pre-and post-chemoradiotherapy neutrophil-lymphocyte ratios in patients who received preoperative chemoradiotherapy. **PLoS ONE** 2017; 12:e0173955.

Tang M, Lu X, Zhang C, et al. Downregulation of SIRT7 by 5-fluorouracil induces radiosensitivity in human colorectal cancer. **Theranostics** 2017; 7:1346-59.

Watkins JF, Sung P, Prakash L, Prakash S. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. **Mol Cell Biol** 1993; 13:7757-65.

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



Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP

São Paulo, 16 de maio de 2016.

À  
**Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen**

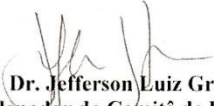
**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2141/15**  
**“Identificação de Proteínas e Genes de Fatores de Transcrição Relacionados à Resistência a Quimioterapia e Radioterapia em Células Tumorais Circulantes de Pacientes com Câncer de Cólon e Reto Localmente Avançados”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de 10/05/2016, após analisarem a resposta da recomendação da CONEP, realizada no Parecer 1.488.670, datado de 13/04/2016, **tomaram conhecimento e aprovaram** o seguinte documento:

- Carta resposta, datada de 18/04/2016;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão III, datado de 18/04/2016.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses.**

Atenciosamente,

  
**Dr. Jefferson Luiz Gross**  
**1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

1/1





## APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **09/08/2016**, **aprovaram** a realização do projeto afiliado nº **2141/15C** intitulado: “**Câncer de Reto Localmente Avançado: Identificação de Proteínas Relacionadas à Resistência a Radio/Quimioterapia e Análise Molecular de Fatores Sanguíneos**”, o qual está vinculado ao projeto temático nº **2141/15**, intitulado: “**Identificação de Proteínas e Genes de Fatores de Transcrição Relacionados à Resistência a Quimioterapia e Radioterapia em Células Tumerais Circulantes de Pacientes com Câncer de Cólon e Reto Localmente Avançados**”.

**Pesquisador responsável:** Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen

**Aluna:** Ana Bianca de Cássia Troncarelli de Campos Parra Flores (Doutorado).

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

São Paulo, 16 de agosto de 2016.

Atenciosamente,

**Dra. Sandra Caires Serrano**  
**2ª Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa**

1/1

## Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE



### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **NOME DO ESTUDO: IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E GENES DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO RELACIONADOS À RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA E RADIOTERAPIA EM CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON E RETO ESTÁDIOS II E III**

Investigador Responsável: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

#### **Nome do (a) Voluntário**

(a): \_\_\_\_\_

RGH: \_\_\_\_\_

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

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

#### **OBJETIVOS DO ESTUDO**

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

- recorrência tumoral local/à distância;
- resposta ao tratamento (verificaremos se há diminuição dos níveis dessas células durante e após o seu tratamento);

- expressão de genes e proteínas de resistência a drogas (ERCC1, resistência a derivados de platina e TYMS, resistência a 5-fluorouracil, tratamentos comumente utilizados), genes de invasão tumoral (TGF $\beta$ , MMP2, MMP9), proliferação (Ki-67) e dormência celular ( $\beta$ -gal), que poderiam auxiliar no acompanhamento do câncer;
- sobrevida livre de progressão;
- tempo de vida após o tratamento.

## **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

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

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

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

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

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

## **RISCOS**

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

Os riscos a que você estará sujeito são os riscos inerentes a qualquer punção venosa como: dor local no ato da punção, sangramento no local, hematoma e raramente flebite (infecção na veia puncionada), mas isto será

evitado pela limpeza adequada do local de punção e realização do procedimento por profissional capacitado. Apesar de raro, pode ser que ocorra equimose (quando o sangue sai para a pele, resultando em uma mancha azul ou púrpura, redonda não elevada ou irregular) após a coleta de sangue. Caso isso aconteça com você, não há nada a ser feito, a não ser esperar que desapareça (desaparece em até 7 dias).

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

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

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

## **BENEFÍCIOS**

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

## **MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES**

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

## **ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS**

Os pesquisadores também se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo, porém, por se tratar

de nova tecnologia, os resultados não poderão indicar cura ou piora do seu quadro, pois ainda não temos valores de referência para estabelecer uma comparação. Contato da pesquisadora: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189-5000 ramal 2776).

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

## **CUSTOS**

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

## **CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS**

Seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos neste estudo. Os dados obtidos pela análise do seu sangue são confidenciais, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante ainda que informações do registro médico sejam utilizadas para publicação.

## **BASES DA PARTICIPAÇÃO**

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

## **SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE**

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

## **ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS RELACIONADOS À PESQUISA**

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

## **ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PACIENTE SUJEITO À PESQUISA**

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

## **INFORMAÇÕES SOBRE NOMES, TELEFONES E ENDEREÇOS PARA CONTATOS**

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

O Comitê de Ética em Pesquisa é uma comissão composta por médicos, enfermeiras, farmacêuticos, biólogos, psicólogos, fisioterapeutas, pesquisadores e membros da comunidade. Utiliza mecanismos, ferramentas e instrumentos próprios de inter-relação, num trabalho cooperativo que visa, especialmente, à proteção dos participantes de pesquisa do Brasil, de forma coordenada e descentralizada por meio de um processo de acreditação.

O termo é elaborado em duas vias e rubricado em todas as páginas,

sendo uma via retida com o pesquisador responsável e outra com a instituição.

Você receberá uma via deste documento. 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 via assinada deste formulário de consentimento.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
 Assinatura do (a) voluntário (a) dia mês ano

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
 Assinatura do (a) voluntário (a) letra de forma dia mês ano

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
 Assinatura do (a) voluntário (a) letra de forma 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 do (a) voluntário (a) letra de forma dia mês ano