

**AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DA CORRELAÇÃO ENTRE
CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES E CONTROLE DA
DOENÇA ENCEFÁLICA APÓS RADIOTERAPIA FOCAL DE
METÁSTASES ENCEFÁLICAS DE CÂNCER DA MAMA**

DOUGLAS GUEDES DE CASTRO

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Co-Orientador: Dr. Antônio Cássio Assis Pellizzon

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

C355 Castro, Douglas Guedes
Avaliação prospectiva da correlação entre células tumorais circulantes e controle da doença encefálica após radioterapia focal de metástases encefálicas de câncer da mama. Douglas Guedes de Castro – São Paulo, 2020.
138p.
Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores: 1. Biomarcadores Tumorais/Biomarkers, Tumor. 2. Neoplasias Cerebrais/Brain Neoplasms. 3. Células Neoplásicas Circulantes/Neoplastic Cells, Circulating. 4. Radiocirurgia/Radiosurgery.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cremilda e Otacílio, pelos ensinamentos e oportunidades.

À minha esposa, amiga e companheira, Luciana, pelo apoio e paciência.

Aos meus filhos, Camila e Felipe, pela inspiração e energia que nos move.

Aos familiares e amigos, pelo convívio e lembranças.

AGRADECIMENTOS

Meu reconhecimento e gratidão,

Às queridas pacientes, pela participação e lição de vida!

À minha orientadora, Ludmilla, pelo incentivo desde o primeiro momento, aprendizado e paciência.

Ao meu co-orientador, Cássio, pelo apoio e parceria.

Ao Vinícius, estatístico, pelo suporte e ensinamentos.

À Elena Fidarova e Eduardo Zubizarreta, pela confiança e estímulo.

Ao grupo de CTC, Ana, Alexcia, Camila, Emne e Vanessa, por todo envolvimento e cooperação.

Aos amigos e colegas do Departamento de Radioterapia, Física Médica e Enfermagem do A.C.Camargo e Oswaldo Cruz, pela colaboração e participação.

Aos colegas do grupo de Neuro-Oncologia, pelo convívio e aprendizado

A todos os colegas do Departamento de Radioterapia, do setor técnico e administrativo, que se envolveram direta ou indiretamente com a pesquisa.

Ao A.C.Camargo Cancer Center e Agência Internacional de Energia Atômica, pela oportunidade, fomento e desenvolvimento.

“The beauty of research is that you never know where it is going to lead”

Richard Roberts, Biólogo Molecular,
Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, 1993

RESUMO

Castro DG. **Avaliação prospectiva da correlação entre células tumorais circulantes e controle da doença encefálica após radioterapia focal de metástases encefálicas de câncer da mama.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

Introdução: Predizer o risco de progressão encefálica distante (PED) precoce é um recurso útil e premente para a decisão terapêutica em pacientes candidatas ao tratamento local de metástases encefálicas. Este estudo tem como objetivo analisar a correlação entre células tumorais circulantes (CTCs) e controle da doença encefálica após radioterapia estereotáctica/radiocirurgia (RTE) de metástases encefálicas de câncer da mama (ME). **Métodos:** Avaliação prospectiva de CTC antes (CTC1) e 4–5 semanas após (CTC2) a RTE de ME e suas relações com o número de lesões sugestivas de ME (NL). As CTCs foram isoladas e quantificadas pelo método ISET (Rarecells, França) e analisadas por imunocitoquímica para avaliar a expressão das proteínas COX2, EGFR, ST6GALNAC5, NOTCH1 e HER2. Sobrevida livre de progressão encefálica distante (SLPED), o objetivo primário, sobrevida livre de progressão encefálica com envolvimento difuso (SLPED-ED), definida como progressão com mais de 4 novas ME ou carcinomatose meníngea, e sobrevida global (SG) foram estimadas pelo estimador de Kaplan-Meier. Testes de log-rank foram aplicados a fim de comparar as curvas de sobrevida. Para análise multivariada dos fatores prognósticos que afetaram a SPED e SG, foi ajustado o modelo proporcional de Cox. Análise de risco competitivo para SLPED na presença do óbito foi realizada. **Resultados:** Foram incluídas 39 pacientes entre novembro de 2016 e fevereiro de 2018. A idade mediana no momento da RTE foi 54 (34-70) anos e a avaliação prognóstica graduada doença-específica (DS-GPA) foi 1,5–2 em 17,5% e 2,5–4 em 82,5% das pacientes. CTCs foram detectadas em todas as 39 pacientes antes da RTE e a CTC1 mediana foi 2 CTC/mL. Após a RTE, CTCs foram detectadas em 34 das 35 pacientes (4 mortes entre CTC1 e CTC2) e a CTC2 mediana foi 2,33 CTC/mL. Após seguimento mediano de 16,6 (IC95%: 14,8–18,4) meses, 15 pacientes evoluíram com PED, sendo 6 com progressão encefálica distante com envolvimento difuso (PED-ED), e 16 pacientes faleceram. A SLPED, SLPED-ED e SG mediana foram 15,3, 14,1 e 19,5 meses, respectivamente. A incidência cumulativa, com a morte como risco competitivo, de PED em 6 meses foi 40% nas pacientes com $CTC1 \leq 0,5$ e 8,82% nas pacientes com $CTC1 > 0,5$ CTC/mL ($p = 0,007$) e a de PED-ED em 6 meses foi 40%

nas pacientes com CTC1 $\leq 0,5$ e 0 nas pacientes com CTC1 $> 0,5$ CTC/mL ($p = 0,005$) e 25% nas pacientes com NL/CTC1 $> 6,8$ e 2,65% com NL/CTC1 $\leq 6,8$ ($p = 0,063$). Na análise multivariada, a SLPED foi inferior nas pacientes com CTC1 $\leq 0,5$ CTC/mL (HR 8,27, IC95%:2,12–32,3; $p = 0,002$) e superior nas pacientes com imunofenótipo HER2-positivo (HR 0,128, IC95%:0,025–0,534; $p = 0,013$), a SLPED-ED foi inferior nas pacientes com CTC1 $\leq 0,5$ CTC/mL (HR 10,22, IC95%:1,99–52,41; $p = 0,005$) e a SG foi superior nas pacientes com imunofenótipo HER2-positivo (HR 0,073, IC95%:0,018–0,288; $p < 0,0001$) e luminal B (HR 0,224, IC95%:0,062–0,816; $p = 0,023$) e nas pacientes com NL/CTC1 $\leq 2,2$ (HR 0,159, 95% CI 0,05–0,505; $p = 0,002$). Não houve associação entre a expressão das proteínas nas CTCs e PED e SG. **Conclusões:** CTC1 foi um fator prognóstico independente de SLPED e SLPED-ED e NL/CTC1 foi um fator prognóstico independente de SG e um potencial fator prognóstico de PED-ED em 6 meses. Estes dados sugerem que CTC1 e NL/CTC1 podem ter um papel como biomarcador da PED-ED precoce, auxiliando a definir o momento e o tipo da radioterapia de resgate a fim de otimizar o controle das ME.

Descritores: Biomarcadores Tumorais. Neoplasias Cerebrais. Células Tumorais Circulantes. Radiocirurgia.

ABSTRACT

Castro DG. [Prospective assessment of the correlation between circulating tumor cells and control of brain disease after focal radiotherapy of breast cancer brain metastases]. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

Introduction: Predicting the risk of early distant brain failure (DBF) is a useful and demanding resource for management decisions in patients who are candidates to local treatment of brain metastasis. This study aims to analyze the correlation between circulating tumor cells (CTCs) and brain disease control after stereotactic radiotherapy/radiosurgery (SRT) for breast cancer brain metastasis (BM). **Methods:** Prospective assessment of CTCs before (CTC1) and 4–5 weeks after (CTC2) SRT for BM and its relations with the number of suggestive lesions of BM (NL). CTCs were isolated and quantified by the ISET method (Rarecells, France) and analyzed by immunocytochemistry to evaluate the expression of the proteins COX2, EGFR, ST6GALNAC5, NOTCH1 e HER2. Distant brain failure-free survival (DBFFS), the primary endpoint, diffuse distant brain failure-free survival (D-DBFFS), defined as progression with more than 4 new BM or meningeal carcinomatosis, and overall survival (OS) were estimated by Kaplan-Meier estimator. Log-rank tests were applied in order to compare the survival curves. For multivariate analysis of prognostic factors that affected DBFFS and OS, the Cox proportional model was adjusted. Competing risk analysis for DBFFS in the presence of death was performed. **Results:** 39 patients were included between November 2016 and February 2018. The median age at SRT was 54 (34-70) years and the diagnosis-specific graded prognostic assessment (DS-GPA) was 1.5–2 in 17.5% and 2.5–4 in 82.5% of them. CTCs were detected in all 39 patients before SRT and the median CTC1 was 2 CTC/mL. After SRT, CTCs were detected in 34 of 35 patients (4 deaths between CTC1 and CTC2) and the median CTC2 was 2.33 CTC/mL. After a median follow-up of 16.6 (95% CI: 14.8–18.4) months, there were 15 patients with DBF, being 6 with diffuse distant brain failure (D-DBF), and 16 deaths. The median DBFFS, D-DBFFS and OS were 15.3, 14.1 and 19.5 months, respectively. The cumulative incidence, with death as competing risk factor, of DBF at 6 months was 40% in patients with $CTC1 \leq 0.5$ and 8.82% in patients with $CTC1 > 0.5$ CTC/mL ($p = 0.007$) and of D-DBF at 6 months was 40% in patients with $CTC1 \leq 0.5$ and 0 in patients with $CTC1 > 0.5$ CTC/mL ($p = 0.005$) and 25% in patients with $NL/CTC1 > 6.8$ and 2.65% with $NL/CTC1 \leq 6.8$

($p = 0.063$). On multivariate analysis, DBFFS was inferior in patients with $CTC1 \leq 0.5$ CTC/mL (HR 8.27, 95% CI 2.12–32.3; $p = 0.002$) and superior in patients with immunophenotype HER2-positive (HR 0.128, 95% CI 0.025–0.534; $p = 0.013$), D-DBFFS was inferior in patients with $CTC1 \leq 0.5$ CTC/mL (HR 10.22, 95% CI 1.99–52.41; $p = 0.005$) and OS was superior in patients with immunophenotype HER2-positive (HR 0.073, 95% CI 0.018–0.288; $p < 0.0001$) and luminal B (HR 0.224, 95% CI 0.062–0.816; $p = 0.023$) and in patients with $NL/CTC1 \leq 2.2$ (HR 0.159, 95% CI 0.05–0.505; $p = 0.002$). There was no association between protein expression in CTCs and DBF and OS. **Conclusions:** CTC1 was an independent prognostic factor of DBFFS and D-DBFFS and $NL/CTC1$ was an independent prognostic factor of OS and a potential prognostic factor of D-DBF at 6 months. These data suggest that CTC1 and $NL/CTC1$ may have a role as a biomarker of early D-DBF, helping define the timing and type of salvage radiotherapy in order to optimize the control of BM.

Keywords: Biomarkers, Tumor. Brain Neoplasms. Circulating Tumor Cells. Radiosurgery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Algoritmo para abordagem terapêutica das ME	5
Figura 2	Gráfico de box-plot mostrando a comparação entre a contagem de CTC1 e CTC2.....	23
Figura 3	Fotomicrografias de CTCs isoladas do sangue de pacientes com câncer da mama metastático	25
Figura 4	Curva de SLPED estimada pelo método de Kaplan-Meier (área cinza corresponde ao intervalo de confiança de 95%)	26
Figura 5	Análise do valor do ponto de corte para CTC1 e SLPED	27
Figura 6	SLPED atuarial estratificada por CTC1 (\leq ou $>$ 0,5 CTC/mL).....	28
Figura 7	Incidências cumulativas de PED e óbito estratificadas por CTC1 (\leq ou $>$ 0,5 CTC/mL)	29
Figura 8	Análise do valor do ponto de corte para CTC2 e SLPED	30
Figura 9	SLPED atuarial estratificada por CTC2 (\leq ou $>$ 3,75 CTC/mL)	31
Figura 10	Curva de SLPED-ED estimada pelo método de Kaplan-Meier.....	32
Figura 11	Análise do valor do ponto de corte para CTC1 e SLPED-ED.....	33
Figura 12	SLPED-ED atuarial estratificada por CTC1 (\leq ou $>$ 0,5 CTC/mL)	34
Figura 13	Incidências cumulativas de PED-ED e óbito estratificadas por CTC1 (\leq ou $>$ 0,5 CTC/mL)	35

Figura 14	Análise do valor do ponto de corte para CTC2 e SLPED-ED.....	36
Figura 15	SLPED atuarial estratificada por CTC2 (\leq ou $>$ 1 CTC/mL)	37
Figura 16	Curva de SG estimada pelo método de Kaplan-Meier	38
Figura 17	Análise do valor do ponto de corte para CTC1 e SG.....	39
Figura 18	SG atuarial estratificada por CTC1 (\leq ou $>$ 0,5 CTC/mL).....	40
Figura 19	Análise do valor do ponto de corte para CTC2 e SG.....	41
Figura 20	SG atuarial estratificada por CTC2 (\leq ou $>$ 1,5 CTC/mL).....	42
Figura 21	Análise do valor do ponto de corte para CTC2/CTC1 e SLPED.....	44
Figura 22	SLPED atuarial estratificada por CTC2/CTC1 (\leq ou $>$ 0,3).....	45
Figura 23	Análise do valor do ponto de corte para CTC2/CTC1 e SLPED-ED.....	46
Figura 24	SLPED-ED atuarial estratificada por CTC2/CTC1 (\leq ou $>$ 1,5 CTC/mL)	47
Figura 25	Análise do valor do ponto de corte para CTC2/CTC1 e SG.....	48
Figura 26	SG atuarial estratificada por CTC1 (\leq ou $>$ 0,3 CTC/mL).....	49
Figura 27	SLPED atuarial estratificada pelo imunofenótipo	50
Figura 28	SLPED-ED atuarial estratificada pelo imunofenótipo.....	51
Figura 29	SG atuarial estratificada pelo imunofenótipo	52
Figura 30	Análise do valor do ponto de corte para DS-GPA e SLPED.....	53
Figura 31	SLPED atuarial estratificada pelo DS-GPA (\leq ou $>$ 3)	54

Figura 32	Análise do valor do ponto de corte para DS-GPA e SLPED-ED	55
Figura 33	SLPED-ED atuarial estratificada pelo DS-GPA (\leq ou $>$ 3,5).....	56
Figura 34	Análise do valor do ponto de corte para DS-GPA e SG.....	57
Figura 35	SG atuarial estratificada pelo DS-GPA (\leq ou $>$ 2)	58
Figura 36	Análise do valor do ponto de corte para número de metástases encefálicas e SLPED	59
Figura 37	SLPED atuarial estratificada pelo número de metástases encefálicas (\leq ou $>$ 5).....	60
Figura 38	Análise do valor do ponto de corte para número de metástases encefálicas e SLPED-ED	61
Figura 39	SLPED atuarial estratificada pelo número de metástases encefálicas (\leq ou $>$ 6).....	62
Figura 40	Análise do valor do ponto de corte para número de metástases encefálicas e SG	63
Figura 41	SG atuarial estratificada pelo número de metástases encefálicas (\leq ou $>$ 3) ..	64
Figura 42	Análise do valor do ponto de corte para NL/CTC1 e SLPED	65
Figura 43	SLPED atuarial estratificada por NL/CTC1 (\leq ou $>$ 2).....	66
Figura 44	Análise do valor do ponto de corte para NL/CTC2 e SLPED	67
Figura 45	SLPED atuarial estratificada por NL/CTC2 (\leq ou $>$ 0,1).....	68
Figura 46	Análise do valor do ponto de corte para NL/CTC1 e SLPED-ED	69

Figura 47	SLPED-PD atuarial estratificada por NL/CTC1 (\leq ou $>$ 6,8).....	70
Figura 48	Incidências cumulativas de PED-ED e óbito estratificadas por NL/CTC1 (\leq ou $>$ 6,8).....	71
Figura 49	Análise do valor do ponto de corte para NL/CTC2 e SLPED-ED	72
Figura 50	SLPED-PD atuarial estratificada por NL/CTC1 (\leq ou $>$ 0,8).....	73
Figura 51	Análise do valor do ponto de corte para NL/CTC1 e SG	74
Figura 52	SG atuarial estratificada por NL/CTC1 (\leq ou $>$ 2,2)	75
Figura 53	Análise do valor do ponto de corte para NL/CTC2 e SG	76
Figura 54	SG atuarial estratificada por NL/CTC2 (\leq ou $>$ 5,5)	77
Figura 55	SLPED atuarial estratificada pelo número de sítios metastáticos (1 ou \geq 2)	78
Figura 56	SLPED-ED atuarial estratificada pelo número de sítios metastáticos (1 ou \geq 2)	79
Figura 57	SG atuarial estratificada pelo número de sítios metastáticos (1 ou \geq 2).....	80
Figura 58	SLPED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de EFGR nas CTC1...	81
Figura 59	SLPED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de EFGR nas CTC2...	82
Figura 60	SLPED-ED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de EFGR nas CTC1	83
Figura 61	SLPED-ED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de EFGR nas CTC2	84

Figura 62	SG atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de EFGR nas CTC1	85
Figura 63	SG atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de EFGR nas CTC2	86
Figura 64	SLPED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC1	87
Figura 65	SLPED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC2	88
Figura 66	SLPED-ED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC1	89
Figura 67	SLPED-ED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC2	90
Figura 68	SG atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC1	91
Figura 69	SG atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC2	92
Figura 70	SLPED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de NOTCH1 nas CTC1	93
Figura 71	SLPED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de NOTCH1 nas CTC2	94
Figura 72	SLPED-ED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de NOTCH1 nas CTC1	95
Figura 73	SLPED-ED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de NOTCH1 nas CTC2	96
Figura 74	SG atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de NOTCH1 nas CTC1	97

Figura 75	SG atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de NOTCH1 nas CTC2	98
Figura 76	SLPED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de HER2 nas CTC1 ...	99
Figura 77	SLPED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de HER2 nas CTC2 ...	100
Figura 78	SLPED-ED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de HER2 nas CTC1	101
Figura 79	SLPED-ED atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de HER2 nas CTC2	102
Figura 80	SG atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de HER-2 nas CTC1	103
Figura 81	SG atuarial estratificada pelo <i>status</i> da expressão de HER-2 nas CTC2	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Recursive Partitioning Analysis (RPA)</i>	2
Tabela 2	<i>Graded Prognostic Assessment (GPA)</i>	3
Tabela 3	<i>Diagnosis-Specific Graded Prognostic Assessment (DS-GPA)</i>	4
Tabela 4	Descrição dos anticorpos testados nas CTCs.....	17
Tabela 5	Distribuição das frequências das variáveis qualitativas relativas às pacientes	21
Tabela 6	Distribuição das frequências de expressão dos biomarcadores nas CTC1 e CTC2.....	24
Tabela 7	Fatores Pronósticos Significativos de SLPED, SLPED-ED e SG.....	105
Tabela 8	Estimativa dos parâmetros do modelo de Cox múltiplo para SLPED	106
Tabela 9	Estimativa dos parâmetros do modelo de Cox múltiplo para SLPED-ED ..	106
Tabela 10	Estimativa dos parâmetros do modelo de Cox múltiplo para SG	107

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COX2	Ciclo-oxigenase 2
CTCs	Células tumorais circulantes
DLM	Disseminação leptomeníngea
DS-GPA	<i>Diagnosis-specific graded prognostic assessment</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EpCAM	Moléculas de adesão das células epiteliais
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPA	<i>Graded prognostic assessment</i>
HER2	<i>Human epidermal growth receptor 2notc</i>
ISSET	<i>Isolation by SizE of Tumors</i>
KPS	<i>Status de Karnofsky</i>
ME	Metástases encefálicas
NL	Número de lesões
PED	Progressão encefálica distante
PED-ED	Progressão encefálica distante com envolvimento difuso
RC	Radiocirurgia
REHF	Radioterapia estereotática hipofracionada
RM	Ressonância magnética
RPA	<i>Recursive Partitioning Analysis</i>
RR	Razão dos riscos
RTE	Radioterapia estereotática/Radiocirurgia
RTHE	Radioterapia holoencefálica
RTOG	<i>Radiation Therapy Oncology Group</i>
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
SLPE	Sobrevida livre de progressão encefálica
SLPED	Sobrevida livre de progressão encefálica distante
SLPED-ED	Sobrevida livre de progressão encefálica distante com envolvimento difuso
SLPED-OP	Sobrevida livre de progressão encefálica distante com oligoprogressão

SLPEL	Sobrevida livre de progressão encefálica local
SNC	Sistema Nervoso Central
ST6GALNAC5	α 2, 6- sialiltransferase
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TC	Tomografia computadorizada
TEM	Transição epitélio-mesenquima
VME	Velocidade de metástases encefálicas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Metástases Encefálicas	1
1.2	Modalidades de Radioterapia Focal e Controle das Metástases Encefálicas.....	6
1.3	Células Tumorais Circulantes	8
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Primário	13
2.2	Objetivos Secundários	13
3	METODOLOGIA.....	14
3.1	Desenho do Estudo	14
3.2	Aspectos Éticos.....	14
3.3	Pacientes	14
3.4	Radioterapia	15
3.5	Isolamento e Purificação das CTCs.....	15
3.6	Imunocitoquímica nas Membranas de ISET.....	16
3.7	Seguimento	17
3.8	Desfechos.....	17
3.9	Análise Estatística.....	18
3.10	Financiamento.....	19
4	RESULTADOS	20
4.1	Pacientes	20
4.2	Radioterapia	22
4.3	Células Tumorais Circulantes.....	22
4.4	Impacto Prognóstico de CTC1 e CTC2 na Sobrevida Livre de Progressão Encefálica Distante (SLPED).....	25
4.5	Impacto Prognóstico de CTC1 e CTC2 na Sobrevida Livre de Progressão Encefálica Distante com Envolvimento Difuso (SLPED-ED)	32
4.6	Impacto Prognóstico de CTC1 e CTC2 na Sobrevida Global (SG).....	38

4.7	Impacto Prognóstico de CTC1 e CTC2 na Sobrevida Livre de Progressão Encefálica Local (SLPEL)	43
4.8	Impacto Prognóstico da Variação da Quantidade de CTC1 e CTC2 (Cinética das CTCs) na SLPED	44
4.9	Impacto Prognóstico da Variação da Quantidade de CTC1 e CTC2 (Cinética das CTCs) na SLPED-ED	46
4.10	Impacto Prognóstico da Variação da Quantidade de CTC1 e CTC2 (Cinéticas da CTCs) na SG	48
4.11	Impacto Prognóstico do Imunofenótipo na SLPED.....	50
4.12	Impacto Prognóstico do Imunofenótipo na SLPED-ED.....	51
4.13	Impacto Prognóstico do Imunofenótipo na SG.....	52
4.14	Impacto Prognóstico do DS-GPA na SLPED	53
4.15	Impacto Prognóstico do DS-GPA na SLPED-ED	55
4.16	Impacto Prognóstico do DS-GPA na SG	57
4.17	Impacto Prognóstico do Número de Metástases Encefálicas na SLPED.....	59
4.18	Impacto Prognóstico do Número de Metástases Encefálicas na SLPED-ED.....	61
4.19	Impacto Prognóstico do Número de Metástases Encefálicas na SG.....	63
4.20	Impacto Prognóstico da Relação entre o Número de Lesões e CTC1 ou CTC2 na SLPED	65
4.21	Impacto Prognóstico da Relação entre o Número de Lesões e CTC1 ou CTC2 na SLPED-ED.....	69
4.22	Impacto Prognóstico da Relação entre o Número de Lesões e CTC1 ou CTC2 na SG.....	74
4.23	Impacto Prognóstico do número de Sítios Metastáticos na SLPED	78
4.24	Impacto Prognóstico do número de Sítios Metastáticos na SLPED-ED	79
4.25	Impacto Prognóstico do número de Sítios Metastáticos na SG	80
4.26	Impacto Prognóstico da Expressão de EGFR na SLPED.....	81
4.27	Impacto Prognóstico da Expressão de EGFR na SLPED-ED	83
4.28	Impacto Prognóstico da Expressão de EGFR na SG	85
4.29	Impacto Prognóstico da Expressão de ST6GALNAC5 na SLPED.....	87
4.30	Impacto Prognóstico da Expressão de ST6GALNAC5 na SLPED-ED.....	89
4.31	Impacto Prognóstico da Expressão de ST6GALNAC5 na SG.....	91
4.32	Impacto Prognóstico da Expressão de NOTCH1 na SLPED	93
4.33	Impacto Prognóstico da Expressão de NOTCH1 na SLPED-ED	95

4.34	Impacto Prognóstico da Expressão de NOTCH1 na SG	97
4.35	Impacto Prognóstico da Expressão de HER2 na SLPED	99
4.36	Impacto Prognóstico da Expressão de HER2 na SLPED-ED	101
4.37	Impacto Prognóstico da Expressão de HER2 na SG	103
4.38	Fatores Pronósticos Significativos de SLPED, SLPED-ED e SG	105
4.39	Modelo de Regressão Múltiplo para SLPED	105
4.40	Modelo de Regressão Múltiplo para SLPED-ED	106
4.41	Modelo de Regressão Múltiplo para SG	107
5	DISCUSSÃO	108
5.1	Pacientes	108
5.2	Radioterapia	108
5.3	Células Tumorais Circulantes.....	109
5.4	Sobrevida Livre de Progressão Encefálica Distante	113
5.5	Sobrevida Livre de Progressão Encefálica Distante–Envolvimento Difuso	121
5.6	Sobrevida Global	123
6	CONCLUSÕES.....	126
7	REFERÊNCIAS.....	127

ANEXO

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

APÊNDICES

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

Apêndice 2 Riscos competitivos

Apêndice 3 Riscos competitivos

Apêndice 4 Modelo de regressão PED

Apêndice 5 Modelo de regressão PED-ED

1 INTRODUÇÃO

1.1 METÁSTASES ENCEFÁLICAS

As metástases encefálicas (ME) são os tumores mais prevalentes do Sistema Nervoso Central (SNC), com proporção de 10:1 em relação aos tumores primários. Ocorrem em 20-40% dos pacientes com câncer e estão relacionadas a importante morbi-mortalidade. Os sítios originários mais frequentes de metástases para o SNC são o pulmão (cerca de 50%), mama (15-25%), melanoma (5-20%) e trato gastrointestinal (4-6%) (Patchell 2003). Em cerca de 15% dos casos, o sítio primário é indeterminado (Soffietti et al. 2006). Estima-se que aproximadamente 258.000 novos casos de ME foram diagnosticados nos Estados Unidos em 2009 (Fox et al. 2011).

Cerca de 80% das ME ocorrem no cérebro, 15% no cerebelo e 5% no tronco. No cérebro, a localização mais frequente é na transição córtico-subcortical. Metástases múltiplas ocorrem em 80-90% dos casos. Metástase única no SNC é definida quando há um foco no SNC, independente do estado da doença em outros sítios do organismo. Metástase isolada do SNC é definida quando não há outros sítios de metástase no organismo (Patchell 2003).

Relatos sugerem que a incidência de ME vem aumentando devido ao maior controle dos tumores primários e refinamento das técnicas de imagem cerebral (Wen e Loeffler 1999; Clayton et al. 2004). No câncer da mama, por exemplo, ME são cada vez mais frequentes no curso da doença metastática devido à maior expectativa de sobrevida e melhorias nos métodos de diagnóstico (Stemmler e Heinemann 2008). Pacientes com câncer da mama metastático HER2-positivo têm propensão para desenvolver mais frequentemente ME e estas ocorrem em 30-50% dos casos (Leyland-Jones 2009).

O prognóstico dos pacientes com ME é usualmente pobre e a sobrevida global (SG) mediana estimada é de 1 mês e 4-6 meses em pacientes, respectivamente, sem ou com tratamento (Zimm et al. 1981; Sundstrom et al. 1998) nos casos de pior prognóstico e até 36 meses nos casos de melhor prognóstico (Sperduto et al. 2020). Além da curta sobrevida, as ME estão associadas à deterioração neurológica e diminuição da qualidade de vida (Cruz-Muñoz e Kerbel 2011).

A definição do prognóstico de SG tem sido cada vez mais desafiadora devido à heterogeneidade dessa população. Diversos parâmetros clínicos, como idade, *performance*

status, número de metástases e situação da doença extraencefálica são relatados como fatores prognósticos relevantes. A análise desses fatores, por sua vez, tem sido utilizada na elaboração de escalas prognósticas que possam auxiliar na decisão terapêutica.

O *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) publicou e validou, na década de 90, um índice prognóstico de SG baseado na idade, *performance status de Karnofsky* (KPS), controle do tumor primário e presença ou ausência de metástases extraencefálicas. A partir desses critérios, foi possível estratificar os pacientes em três grupos com diferenças significativas de sobrevida. Conhecido como RPA (*Recursive Partitioning Analysis*), esse foi o primeiro índice prognóstico de SG para pacientes com ME (Gaspar et al. 1997) (Tabela 1).

Tabela 1 - Recursive Partitioning Analysis (RPA)

Classe	Descrição	SG mediana
I	< 65 anos, primário controlado, ausência de doença extraencefálica, KPS \geq 70	7,1 m
II	Demais	4,2 m
III	KPS < 70	2,3 m

O RPA foi validado por outros autores e, posteriormente, diferentes índices prognósticos foram elaborados com a utilização de parâmetros variados, tais como o número e volume das lesões, resposta ao uso de esteróides anteriormente à radioterapia holoencefálica (RTHE) e o intervalo entre o diagnóstico de ME e RTHE (Weltman et al. 2000).

Sperduto et al. (2008) publicaram uma análise dos dados de cinco estudos prospectivos e aleatorizados do RTOG e compararam um novo índice prognóstico, o GPA (*Graded Prognostic Assessment*), a outros três índices conhecidos, entre eles o RPA. O GPA foi definido por quatro parâmetros: idade, KPS, número de lesões e status da doença extraencefálica. Dentre os índices prognósticos, o GPA foi considerado o mais objetivo e de fácil utilização (Tabela 2).

Tabela 2 - Graded Prognostic Assessment (GPA)

Parâmetros	Score		
	0	0,5	1.0
1 – Idade	> 60	50-59	< 50
2 –KPS	< 70	70-80	90-100
3 – Número de metástases	> 3	2-3	1
4 – Metástase extraencefálica	Presente	-	Ausente
Score cumulativo	SG mediana (meses)	Número de pacientes	
0-1	2.6	143	
1.5-2	3.8	666	
3	6.9	168	
3.5-4	11	102	

Entretanto, há evidências de que os fatores prognósticos e a aplicabilidade dos índices prognósticos podem variar conforme o diagnóstico primário e, portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de índices prognósticos diagnóstico-específicos (Golden et al. 2008).

Com esse objetivo, Sperduto et al. (2010) analisaram, de maneira retrospectiva, os dados de 4259 pacientes com ME tratados em 11 instituições entre 1985 e 2007. Os fatores prognósticos e resultados por sítio primário e tratamento foram avaliados e um índice prognóstico GPA diagnóstico-específico (DS-GPA) foi elaborado (Tabela 3). Para todos os diagnósticos primários, o somatório do DS-GPA igual a 4 indica melhor prognóstico e, quando igual a 0, o pior prognóstico.

Tabela 3 - Diagnosis-Specific Graded Prognostic Assessment (DS-GPA)

Sítio primário	Fatores prognósticos	Critério de score de GPA				
		0	0,5	1		
Pulmão (Células não-pequenas)	Idade	>60	50-60	<50	-	-
	KPS	<70	70-80	90-100	-	-
	Metástase extra-encefálica	Sim	-	Não	-	-
	Número de metástases	>3	2-3	1	-	=
		0	0,5	1	1,5	2
Mama	Idade	≥60	<60	-	-	-
	KPS	≤50	60	70-80	≥90	-
	Imunofenótipo	Basal	-	LumA	Her	LumB
		0	1	2	-	-
Melanoma/ Rim	KPS	<70	70-80	90-100	-	-
	Número de metástases	> 3	2-3	1	-	-
		0	1	2	3	4
Gastrointestinal	KPS	<70	70	80	90	100

Score cumulativo	SG por sítio primário (meses)				
	Gastrointestinal	Mama	Melanoma	Pulmão	Rim
0-1	3,1	3,4	3,4	3	3,3
1,5-2	4,4	7,7	4,7	5,5	7,3
2,5-3	6,9	15,1	8,8	9,42	11,3
3,5-4	13,5	25,3	13,2	14,8	14,8

Sugere-se que a utilização de índices prognósticos de fácil aplicação deva ser considerada na seleção do tratamento mais apropriado da ME, uma vez que não se espera diferença em termos de SG entre as diversas modalidades de radioterapia, mas na sobrevida livre de progressão encefálica (SLPE) e toxicidade.

Por exemplo, se um paciente com câncer do pulmão tem um DS-GPA de 1, é provável que sobreviva menos que 3 meses e, portanto, uma abordagem que esteja associada a maior controle da possível doença microscópica disseminada no encéfalo e maiores riscos de efeitos tardios cognitivos, como a RTHE, pode ser empregada. No outro extremo, uma paciente com câncer de mama que tenha um DS-GPA de 3,5 provavelmente sobreviverá mais do que 18 meses e a decisão terapêutica ocorrerá entre os métodos de tratamento focal da ME, seja cirurgia, radiocirurgia (RC) ou radioterapia estereotática hipofracionada (REHF), a fim de se evitar toxicidade nas regiões não comprometidas, uma vez que há baixo risco de falha em outro

sítio do encéfalo devido ao controle da doença extraencefálica (Chang et al. 2009; Linskey et al. 2010).

Além dos fatores utilizados no DS-GPA, outros critérios são levados em consideração na definição da abordagem terapêutica da ME. O volume e a localização da lesão, bem como a eventual presença de efeito de massa com consequente desenvolvimento de sintomas sugestivos de hipertensão intracraniana são fatores que podem favorecer a abordagem cirúrgica inicial. Portanto, seguindo algumas recomendações de grupos cooperativos e observando a experiência institucional do A.C.Camargo Cancer Center previamente publicada, uma possível estratégia de abordagem terapêutica das pacientes ME sintomáticas está representada abaixo (Tsao et al. 2012; Kocher et al. 2014; De Azevedo Santos et al. 2015; Soffiatti et al. 2017) (Figura 1).



Figura 1 - Algoritmo para abordagem terapêutica das ME.

A utilização do tratamento sistêmico nas ME tem sido mais restrita, principalmente pela baixa taxa de resposta associada à quimioterapia com drogas tradicionais. Mais recentemente, numerosos relatos e estudos fase II têm demonstrado taxas de resposta mais acentuadas das ME a terapias-alvo e imunoterapia (Soffiatti et al. 2017).

Especificamente nas pacientes com câncer da mama, observou-se resposta objetiva das ME com a associação de capecitabina ao lapatinibe, que é um inibidor da tirosina-quinase HER1 e HER2. No estudo fase II LANDSCAPE, resposta objetiva foi relatada em 66% das 44 pacientes com ME de câncer da mama HER2-positivo (Bachelot et al. 2013).

1.2 MODALIDADES DE RADIOTERAPIA FOCAL E CONTROLE DAS METÁSTASES ENCEFÁLICAS

A radioterapia focal é uma técnica não-invasiva que utiliza localização estereotática e que emprega alta dose de radiação com precisão submilimétrica nos alvos intracranianos. Pode ser realizada em única sessão, definida como RC, e, em caso de lesões volumosas (diâmetro > 3 cm), em poucas sessões, definida como REHF (5-10 frações), proporcionando um controle local da lesão irradiada acima de 80% (Wiggenraad et al. 2011; Yamamoto et al. 2014; De Azevedo Santos et al. 2015).

A dose máxima tolerada de RC foi definida no estudo RTOG 90-05, que incluiu grupos heterogêneos de pacientes com tumores encefálicos primários ou ME previamente irradiados. As doses sugeridas foram 24 Gy para lesões com diâmetro máximo ≤ 20 mm, 18 Gy para 21-30 mm e 15 Gy para 31-40 mm (Shaw et al. 2000). A definição da dose na RTEH é proveniente da experiência publicada em poucos estudos prospectivos e retrospectivos, com dose usual de 25-30 Gy em 3-5 frações (Masucci 2018).

Embora o candidato ideal à radioterapia focal seja o paciente com doença oligometastática (até quatro lesões), tem sido cada vez mais frequente a sua utilização em pacientes com maior número de lesões, pois o melhor controle da doença extraencefálica tem proporcionado maior sobrevida e, portanto, torna-se interessante evitar a RTHE e seu potencial impacto cognitivo.

Chang et al. (2009) avaliaram a função neurocognitiva, principalmente memória e aprendizagem, em pacientes com 1-3 ME que foram aleatorizados para RC isolada ou associada à RTHE. O estudo foi interrompido precocemente, após o recrutamento de 58 pacientes, devido à análise interina que mostrou probabilidade significativamente maior de deterioração nas funções de memória e aprendizagem (declínio cognitivo de 52%) em 4 meses nos pacientes tratados com o regime combinado quando comparado aos pacientes tratados com RC (declínio cognitivo de 24%).

Com o mesmo objetivo primário, Brown et al. (2016) comparam 213 pacientes com 1-3 ME aleatorizados para RC isolada ou associada à RTHE e observaram redução significativa da deterioração cognitiva em 3 meses (63,5% versus 91,7%) e melhor qualidade de vida a favor dos pacientes submetidos à RC, mas sem diferença na SG. Yamamoto et al. (2014) compararam a utilização de RC como abordagem inicial em pacientes com única lesão, 2-4 ou 5-10 ME. Nessa série prospectiva, não houve diferença na SG mediana, de 10,8 meses, entre os grupos

com 2-4 e 5-10 lesões. Além disso, os pacientes com 5-10 lesões apresentaram resultados não inferiores aos pacientes com 1-4 lesões em termos de morte neurológica, controle local, manutenção do status neurológico e necessidade de repetição da RC por novas metástases. Kayama et al. (2018) avaliaram se RC de resgate não foi inferior à RTHE após a cirurgia em pacientes com 1-4 ME, tendo a SG como objetivo primário, e observaram que a SG mediana foi 15,6 meses em ambos os grupos. Entretanto, 16,4% dos pacientes submetidos à RTHE apresentaram alteração cognitiva grau 2-4 após 91 dias do recrutamento, enquanto 7,7% dos pacientes tratados com RC de resgate apresentaram a mesma evolução ($p = 0,048$).

A despeito dos índices prognósticos, como o DS-GPA, permitirem uma estimativa da SG e, conseqüentemente, auxiliarem na decisão do tratamento irradiante, não é possível estimar SLPE e tampouco o seu padrão de falha. Diante de um paciente com 4-10 ME, por exemplo, além do DS-GPA, procura-se verificar o controle da doença extraencefálica e a perspectiva de novas terapias sistêmicas para a definição entre RTHE e radioterapia focal. Contudo, há o risco de perda do controle da doença encefálica caso a opção seja radioterapia focal em um paciente com possíveis micrometástases presentes ou que possam surgir em curto prazo. Por outro lado, há o risco de exposição desnecessária aos efeitos cognitivos da RTHE nos pacientes que só possuam as 4-10 ME macroscópicas e doença extraencefálica controlada.

Com o intuito de estimar o risco de surgimento de novas ME após a RC, Ayala-Peacock et al. (2017) desenvolveram e validaram um nomograma a partir dos dados de 1354 pacientes tratados com RC isolada para novas ME entre 2000 e 2013 em oito instituições acadêmicas. Número de ME, mínima dose marginal prescrita de RC e sítio primário foram os principais fatores preditivos de novas ME em 3, 6 e 9 meses após a RC e a indicação de RTHE de resgate após a RC variou de 5-20% entre as instituições. Além disso, foi possível identificar um limiar de risco dobrado para a necessidade de RTHE precoce, 3 meses após a RC. A identificação dos pacientes sob maior risco de falha encefálica precoce e consequente necessidade de RTHE de resgate permitiria ponderar a indicação de RTHE em lugar da RC desde o momento inicial, com potencial otimização do controle da doença encefálica.

Press et al. (2017) criaram um nomograma para estimar o risco de progressão encefálica distante precoce (≤ 6 meses) após a RC e validaram em 247 pacientes com 388 ME submetidos à RC entre 2010 e 2013. Identificaram quatro fatores de risco, conferindo 1 ponto assinalado a cada um dos fatores: ausência de RTHE prévia, ME originárias de câncer da mama ou melanoma, múltiplas ME e volume total de ME $< 1,3 \text{ cm}^3$. O grupo de baixo risco (0-1 ponto) teve um risco significativamente menor de progressão encefálica distante precoce em relação ao grupo de alto risco (3-4 pontos), com 22,6% *versus* 44% ($p = 0,004$). Também houve uma

tendência para maior indicação de RTHE de resgate no grupo de alto risco, quando comparado ao de baixo risco, mas sem significância estatística.

Portanto, os métodos atuais da avaliação clínica, imagenológica e mesmo a junção dessas informações em escalas prognósticas não oferecem uma definição adequada da biologia e heterogeneidade tumoral, bem como da presença de micrometástases, limitando a possibilidade de estimar o risco de doença metastática. Nesse contexto, a existência de um marcador prognóstico do potencial de progressão metastática teria aplicação impactante na prática clínica, principalmente se restrito a um sítio tumoral primário específico e considerando-se as suas respectivas peculiaridades.

1.3 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

As células tumorais circulantes (CTCs) são originárias do tumor primário e presentes em número escasso na corrente sanguínea, de onde podem migrar para órgãos distantes, como o cérebro, pulmão ou fígado. Representam a principal causa de doença intratável e são consideradas essenciais para a formação de metastases (Cristofanilli et al. 2004; Mego et al. 2011; Alix-Panabières et al. 2012; Zhang et al. 2013).

Ashworth (1869) foi o primeiro a descrever as CTCs, após observar células na corrente sanguínea de aspecto idêntico àsquelas do tumor primário em um homem com câncer metastático. Todavia, o isolamento e a caracterização das CTCs representam um desafio técnico, uma vez que o número de CTCs geralmente é de 1-10 por mL de sangue, comparado a alguns milhões de leucócitos e poucos bilhões de hemácias (Yu et al. 2011). Algumas técnicas desenvolvidas, principalmente na última década, tornaram possível detectar e quantificar as CTCs (Giuliano et al. 2014).

A análise das CTCs de maneira isolada, célula a célula, requer três etapas: enriquecimento ou purificação, detecção de célula única e caracterização molecular. As técnicas de purificação são divididas entre antígeno-dependentes, baseados na expressão de marcadores na superfície celular, e antígeno-independentes, baseados, por exemplo, no tamanho, densidade ou deformabilidade das células. Após a purificação, técnicas de fluorescência, microdissecção por captura a laser e micromanipulação manual ou automatizada podem ser utilizadas para detectar a célula. A caracterização molecular é definida por técnicas que permitem a análise do DNA, RNA, proteínas e metabólitos da célula isolada (Keller e Pantel 2019).

A maioria dos métodos para análise das CTCs utiliza técnica antígeno-dependente baseada em seleção imuno-magnética de CTCs com expressão de marcadores epiteliais. O

único método de detecção de CTCs aprovado pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), o *CellSearch* (Menarini Silicon Biosystems, EUA), é baseado na separação de células expressoras das moléculas de adesão das células epiteliais (EpCAM). Contudo, esses métodos são inadequados para detectar CTCs sem expressão epitelial como, por exemplo, células cujos fenótipos foram alterados pelo processo de transição epitélio-mesênquima (TEM) ou que tenham a característica de célula-tronco (Bielciková et al. 2017).

Um dos métodos antígeno-independentes utilizados é baseado no tamanho das CTCs. Vona et al. (2000) desenvolveram o método ISET (*Isolation by Size of Tumors*; Rarecells Diagnostics, França), que é caracterizado pela separação de células com diâmetro maior que 11 µm, incluídas as CTC nesse grupo, dos leucócitos (eritrócitos são lisados). Posteriormente, as CTC purificadas são coradas e contadas precisamente após avaliação citopatológica e, então, podem receber a caracterização molecular por diferentes técnicas (Paterlini-Brechot e Benali 2007).

Farace et al. (2011) realizaram uma comparação direta dos métodos *CellSearch* e ISET em 60 pacientes com câncer metastático da mama, próstata e pulmão. Observaram resultados concordantes em 55% das pacientes com câncer da mama, 60% dos pacientes com câncer da próstata e 20% dos pacientes com câncer do pulmão. A discordância dos resultados, principalmente nos pacientes com câncer do pulmão, pode ser explicada pela limitação do método antígeno-dependente, que só detecta CTCs com expressão de marcadores epiteliais. Portanto, o método ISET pode ser mais acurado para detecção das CTCs e, conseqüentemente, apresentar maior poder preditivo e prognóstico, o que necessita ser avaliado em séries com maior número de pacientes. Sendo a única plataforma aprovada pela FDA para a detecção das CTCs, a maioria dos estudos publicados utiliza o método *CellSearch*. Vários estudos seminais com esse método demonstraram que o número de CTCs, a partir de um valor de corte determinado, foi fator prognóstico de sobrevida global (Krebs et al. 2010). Contudo, a utilização de diferentes plataformas, com técnicas dependentes ou independentes dos marcadores epiteliais e conseqüente alteração no número de CTCs detectadas, pode levar à definição de valores de corte variáveis nos diferentes estudos.

O potencial de indicações clínicas de análises das CTCs é abrangente e elas podem ser utilizadas como fator prognóstico de sobrevida e progressão de doença em doença inicial e metastática, fator preditivo de resposta a tratamentos locais e sistêmicos, avaliação de doença residual após tratamento, definição da periodicidade de exames de seguimento e método diagnóstico pouco invasivo. Mais recentemente, diversos estudos mostraram o valor

prognóstico das CTCs e sua associação com o volume e potencial doença metastática (Cristofanilli et al. 2004; Smerage et al. 2014).

Giordano et al. (2013) desenvolveram e validaram um nomograma que combinou a quantidade basal de CTCs a outros fatores prognósticos a fim de avaliar o desfecho de pacientes com câncer da mama metastático antes do tratamento inicial. A utilização das CTCs como variável contínua no nomograma possibilitou estimar a SG e sobrevida livre de progressão (SLP), suportar decisões terapêuticas e estratificar as pacientes em grupos de risco para ensaios clínicos.

No entanto, a caracterização das CTCs que induzem metástases permanece indefinida, muito devido à dificuldade de definição de plataformas para captura dessas células e à heterogeneidade fenotípica das mesmas. A eventual correlação entre CTCs e incidência de ME poderia auxiliar na indicação da radioterapia focal em pacientes com doença oligometastática (até quatro lesões) ou não tão disseminada (até dez lesões) no encéfalo. Porém, há raros estudos que avaliam esses cenários.

Em um estudo prospectivo envolvendo 112 pacientes com diagnóstico de câncer do pulmão de pequenas células estágio clínico III, as CTCs foram quantificadas através do sistema *CellSearch* (Menarini Silicon Biosystems, EUA) antes do início e após o primeiro e quarto ciclos de quimioterapia. Observou-se que o número de CTCs antes do tratamento foi fator prognóstico independente de SLP e que pacientes com valor acima de 218 por 7,5 mL de sangue apresentaram significativa redução da SLP e SG. Em casos com número de CTC maior que 218, os autores sugerem que a dose de RTHE profilática de 30 Gy em 15 frações seja insuficiente (Fu et al. 2014).

Pierga et al. (2013) avaliaram o impacto das CTCs no desfecho das pacientes com ME de câncer da mama HER2-positivo tratadas com lapatinibe e capecitabina, sem RTHE, em um estudo fase II (*LANDSCAPE trial*). As CTCs foram avaliadas antes do início do tratamento e 21 dias após, por meio do sistema *CellSearch* (Menarini Silicon Biosystems, EUA). Verificou-se que a taxa de resposta objetiva no SNC foi significativamente maior (80% *versus* 21%, $p = 0,01$) em pacientes sem evidência de CTCs no dia 21 quando comparada às pacientes com CTCs. A SG em 1 ano foi de 83,9% em pacientes sem CTC no dia 21 e 42,9% nas pacientes com CTCs ≥ 1 ($p = 0,02$). Este foi o primeiro estudo a demonstrar a correlação entre a mensuração precoce das CTCs e resposta das ME à terapia dirigida a pacientes com HER-2 positivo.

Portanto, infere-se que a quantificação das CTCs talvez possa ser utilizada como um biomarcador de ME em pacientes com câncer da mama. Contudo, faz-se necessário descobrir

também um marcador nessas células que indique sua migração preferencial para esse sítio, o que seria útil não só como ferramenta diagnóstica, mas também como perspectivas de novas abordagens terapêuticas.

Acredita-se que a frações de CTCs que extravasem e sejam capazes de gerar metástases distantes tenham passado pela TEM, o que resulta na regulação negativa de marcadores de células epiteliais, como a E-caderina, claudinas, citoqueratinas e EpCAM (Siewerts et al. 2009; Konigsberg et al. 2011; Pecot et al. 2011) e na regulação positiva de marcadores mesenquimais, associados à TEM, como vimentina, Twist, N-Caderina (Zhang et al. 2013; Chinen et al. 2014). Vários grupos relataram também que CTCs podem expressar marcadores de células tronco tumorais (Siewerts et al. 2009; Mego et al. 2010; Konigsberg et al. 2011), no entanto, não está claro se CTCs que já não expressam EpCAM são metástase-competentes.

O arraste das CTCs para a circulação e sua chegada em tecidos-alvo constitui um dos passos limitantes para a metástase (Felding-Habermann et al. 1996). Para identificar os determinantes moleculares que medeiam o arraste e extravasamento de células neoplásicas de mama para o cérebro, Bos et al. (2009) aplicaram expressão genômica comparativa em modelos experimentais. Os resultados apontaram algumas moléculas como mediadoras da passagem da célula tumoral através da barreira hematoencefálica, tais como: ciclo-oxigenase 2 (COX2), EGFR (*epidermal growth factor receptor*) e α 2, 6- sialiltransferase (ST6GALNAC5). Pode ser que COX2 aumente a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, enquanto a ativação autócrina do EGFR das células tumorais da mama pelo seu ligante promova a capacidade de invasão destas células. A expressão de ST6GALNAC5 pode estar ligada ao aumento da adesão das células ao endotélio cerebral (como observado *in vitro*), levando conseqüentemente ao aumento das ME, como visto *in vivo*. Ainda não está claro se outros tipos de tumores que metastatizam para o cérebro utilizam ST6GALNAC5 para facilitar a sua entrada no SNC.

Zhang et al. (2013) conseguiram desenvolver linhagens celulares a partir de CTCs provenientes de três pacientes com câncer da mama e ME. Identificaram uma potencial assinatura de desenvolvimento de ME em CTCs EpCAM-negativas com expressão de HER2/EGFR/NOTCH1/heparanase. A capacidade de invasão e a competência metastática das células positivas para esses marcadores foram testadas *in vivo*. As CTCs que expressavam essa assinatura foram altamente invasivas e capazes de gerar ME e pulmonares quando implantadas em camundongos.

Portanto, o aumento da expectativa de sobrevida das pacientes com câncer da mama metastático associado à maior disponibilidade e acesso a métodos mais acurados de diagnóstico por imagem têm tornado mais frequente a detecção de ME.

Paralelamente, o surgimento e refinamento das escalas prognósticas de SG e SLPE possibilitam a seleção de pacientes que têm potencial benefício com as diferentes modalidades de radioterapia, seja focal ou holoencefálica. A decisão entre essas abordagens, por sua vez, segue a estratégia de priorizar a radioterapia focal e protelar a RTHE a fim de evitar o seu impacto cognitivo, mas indicá-la no momento oportuno para a otimização do controle da doença encefálica.

Embora os índices prognósticos de SG estejam cada vez mais específicos, com avaliação de aspectos moleculares do sítio primário, não é possível estimar SLPE e tampouco o seu padrão de falha. Por sua vez, os nomogramas para estimativa de risco de progressão encefálica precoce não são doença-específicos.

Portanto, essas evidências sugerem a possibilidade da utilização da avaliação precoce das CTCs como ferramenta prognóstica do controle da doença encefálica no câncer da mama. Adicionalmente, consideramos que as CTCs podem auxiliar na decisão mais apropriada do momento e modalidade de radioterapia para o controle da doença encefálica. Com o intuito de testarmos nossa hipótese, avaliamos, de maneira prospectiva, os níveis de CTCs antes (inicial) e após (final) a radioterapia focal e os correlacionamos com os desfechos da doença encefálica. Avaliamos, também, a correlação com potenciais marcadores da capacidade de invasão cerebral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Realizar análise quantitativa de CTCs antes (CTC1) e após (CTC2) a radioterapia focal, em única ou múltiplas frações, nas metástases encefálicas de pacientes com câncer da mama e correlacionar com a sobrevida livre de progressão encefálica distante.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar a correlação entre a quantidade de CTC1 e CTC2 com a sobrevida livre de progressão encefálica distante com envolvimento difuso, sobrevida global e livre de progressão encefálica local.
- Avaliar a correlação entre variação da quantidade de CTC1 e CTC2 (cinética das CTCs) com sobrevida livre de progressão encefálica distante, e progressão encefálica distante com envolvimento difuso e sobrevida global.
- Avaliar a correlação entre o imunofenótipo, DS-GPA, número de metástases encefálicas, isoladas ou relacionadas a CTC1 e CTC2, e número de sítios metastáticos com a sobrevida livre de progressão encefálica distante, livre de progressão encefálica distante com envolvimento difuso e sobrevida global.
- Avaliar a correlação entre a expressão de moléculas mediadoras da passagem das CTCs através da barreira hemato-encefálica (COX2, EGFR e ST6GALNAC5), marcadoras da TEM (NOTCH1) e HER2 com a sobrevida livre de progressão encefálica distante, livre de progressão encefálica distante com envolvimento difuso e sobrevida global.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo prospectivo, unicêntrico, desenvolvido no Departamento de Radioterapia e Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do A.C.Camargo Cancer Center (nº 2258/16), em 04/10/16, e o registro no sítio *ClinicalTrials.gov* (identificador NCT02941536), o estudo foi iniciado (Anexo 1). Todas as pacientes foram esclarecidas quanto aos objetivos, métodos e riscos associados à participação na pesquisa e incluídas somente após concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Apêndice 1).

3.3 PACIENTES

Pacientes com idade mínima de 18 anos e indicação de radioterapia focal, RC ou RTEHF, por ME de câncer da mama de qualquer imunofenótipo foram convidadas a participar do estudo. Os quatro imunofenótipos clínicos foram definidos como luminal A, caracterizado por forte expressão dos receptores de estrógeno e progesterona, ausência de expressão do HER2 e baixo índice mitótico; luminal B, caracterizado por expressão menos intensa dos receptores de estrógeno e progesterona em relação ao luminal A, ausência de expressão do HER2 e alto índice mitótico; HER2-positivo, caracterizado pela expressão do HER2; triplo negativo, caracterizado pela ausência de expressão dos receptores de estrógeno e progesterona e do HER2.

Os critérios de exclusão restringiram a participação de pacientes gestantes, submetidas à RTHE há menos de 30 dias da coleta de CTC1 ou terapia sistêmica há menos de 7 dias da coleta de CTC1 ou CTC2.

3.4 RADIOTERAPIA

A radioterapia focal foi realizada em pacientes com ME presentes ou ressecadas e indicada, prioritariamente, àquelas com doença oligometastática no encéfalo; múltiplas lesões (> 4 ME) e expectativa de sobrevida, determinada pelo DS-GPA, acima de 6 meses ou histórico de RTHE prévia.

O planejamento da radioterapia envolveu a confecção de máscara estereotática termoplástica rígida, realização de tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) do encéfalo, esta com aquisição volumétrica e utilização de contraste endovenoso.

Pacientes portadoras de lesões volumosas, com diâmetro máximo acima de 30 mm, ou em áreas eloquentes que limitassem a administração de RC a 15 Gy, foram submetidas à RTEHF. A RTEHF foi realizada com dose de 25-30 Gy em cinco frações e a RC em dose única de 16-24 Gy, cuja descrição técnica no A.C.Camargo Cancer Center foi previamente publicada (De Azevedo Santos et al. 2015). A dose foi prescrita no volume-alvo de planejamento, que foi definido com uma margem de 1 e 2 mm sobre a lesão ou cavidade cirúrgica no caso de RC e RTEHF, respectivamente.

Todas as pacientes foram posicionadas com localização estereotática confirmada por *cone beam* TC e tratadas no acelerador linear com colimador de múltiplas microfolhas de 2,5 mm e fótons de energia 6 MV com intensidade modulada em campos estáticos ou arcos volumétricos até 1 semana após a realização da TC e RM do encéfalo de planejamento.

3.5 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS CTC

A coleta de CTC1 foi oportunamente feita no mesmo dia da realização da RM do encéfalo para o planejamento da radioterapia focal e a CTC2 entre 4-5 semanas após a radioterapia, também oportunamente no mesmo dia da primeira RM do encéfalo de seguimento.

Amostras de 10 mL sangue coletadas em tubos de EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) foram processadas dentro de 4 horas, diluídas a 1:10 em tampão de lise de eritrócitos e filtradas no sistema ISET. O método ISET isola as CTCs intactas do sangue pela filtração direta através de uma membrana de policarbonato com poros cilíndricos de 8 µm de diâmetro e sem o uso de anticorpos, pois explora o maior tamanho das CTCs em relação aos leucócitos.

Após a filtração, as membranas foram lavadas com PBS (*phosphate buffered saline*), secas à temperatura ambiente, protegidas da luz e estocadas a -20° C até o momento da análise.

3.6 IMUNOCITOQUÍMICA NAS MEMBRANAS DE ISET

Para a realização da imunocitoquímica e análise de expressão proteica, os *spots* das membranas foram cortados e colocados em placas de 24 poços. Cada *spot* foi hidratado com TBS (*tris-buffered saline*) por 10 minutos. As células foram permeabilizadas com TBS 0.2% Triton X-100 por 5 minutos à temperatura ambiente. Após uma nova lavagem com TBS, as membranas foram incubadas por 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, com uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio, e lavadas novamente com TBS. Em seguida, os anticorpos pesquisados foram aplicados aos *spots* e incubados por 1 hora. Para o controle negativo, o anticorpo primário foi omitido. A revelação foi feita com *Dual long system* HRP (Dako™) e pelo cromógeno Diaminobenzidina 3,3' (DAB) (Dako™). Para leitura, os *spots* foram corados com hematoxilina por 1 minuto e aderidos às lâminas com meio de aquoso.

Para a realização da dupla marcação imunocitoquímica, o mesmo protocolo descrito acima foi realizado. No entanto, após a utilização do DAB, realizou-se uma incubação de 1 hora com o segundo anticorpo primário, seguida por outra incubação de 20 minutos com o *Rabbit/Mouse* (LINK) (Kit Envision™ G/2 System/AP). Após lavagem com TBS, o *spot* foi incubado por 30 minutos com *AP Enzyme (Enhancer)*. O segundo anticorpo foi revelado por *Permanent Red*. Para finalizar, o *spot* foi corado com hematoxilina. Os anticorpos utilizados nessa dupla marcação imunocitoquímica foram anticorpos anti-CD45 (1:100 – CusaBio, Polyclonal antibody, Lot: G0227Y). Com o anticorpo anti-CD45, espera-se uma marcação em leucócitos, excluindo a possibilidade de reação inespecífica e confirmando que as células marcadas pelos demais anticorpos não são leucócitos.

Os anticorpos utilizados para avaliar a expressão de COX2, EGFR, ST6GALNAC5, NOTCH1, HER2 e CD45 estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Descrição dos anticorpos testados nas CTC

Anticorpo	Marca	Referência	Lote	Diluição	Linhagem de padronização
COX2	CusaBio	CSB-PA001764	G0213Y	1:100	HUVEC (endotelial)
EGFR	CusaBio	CSB-PA007479GA01HU	Y311212	1:50	FaDu (carcinoma escamoso)
STGAL	CusaBio	CSB-PA022765GA01HU	G0207G	1:50	PC3 (próstata)
NOTCH1	CusaBio	CSB-PA084572	G0508A	1:100	HCT8 (cólon)
HER2	CusaBio	CSB-PA084572	G0207S	1:50	SKBR3 (mama)
CD45	CusaBio	CSB-PA010546	F12122Y	1:100	Leucócitos

As CTCs foram caracterizadas de acordo com os seguintes critérios: ausência da expressão de CD45, tamanho nuclear igual ou maior que 12 μm , irregularidade do contorno nuclear, presença de citoplasma visível e alta proporção núcleo-citoplasma ($> 0,5$), de acordo com o descrito por Krebs et al. (2012). Quando faltaram qualquer dos critérios descritos, as células foram classificadas como atípicas. Os resultados foram dados em número de CTC por mL de sangue.

3.7 SEGUIMENTO

O controle clínico-radiológico foi realizado com anamnese, exame físico e RM do encéfalo, sendo a primeira avaliação realizada entre 4-5 semanas após a radioterapia. A partir de então, as avaliações ocorreram a cada 3 meses no primeiro ano e a cada 4 meses durante o segundo ano após o tratamento.

3.8 DESFECHOS

Nos objetivos primários e secundários, a SLPE foi diferenciada entre local e distante (SLPEL e SLPED). SLPEL foi caracterizada conforme os critérios da RANO (*Response Assessment in Neuro-Oncology*), sendo que progressão de doença local foi definida como aumento de pelo menos 20% na soma do maior diâmetro em relação ao nadir (Lin et al. 2015). SLPED foi definida como ausência de novas lesões encefálicas adicionais às existentes no momento da radioterapia e estratificada entre oligoprogressão, com até quatro lesões (SLPED-OP) ou envolvimento difuso, mais de quatro lesões ou disseminação leptomeníngea (SLPED-ED).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em se tratando de um estudo descritivo e exploratório, o tamanho amostral foi obtido a partir da relação sugerida de 15 eventos de progressão encefálica distante (PED) por variável de interesse (CTC) (Halabi e Owzar 2010). Tendo em vista a estimativa de que os eventos ocorram em metade das participantes da pesquisa no período avaliado bem como a possibilidade de desistência ou perda de seguimento, um total de 40 pacientes foi definido como o tamanho amostral.

Inicialmente, realizou-se uma análise descritiva dos dados e, para as variáveis qualitativas, as frequências absolutas e relativas foram calculadas. Para as variáveis de natureza quantitativa, as medidas-resumo, como média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão foram obtidas.

As taxas de SLPE e SG foram estimadas inicialmente a partir do estimador de Kaplan-Meier (1958). Em ambas as situações, as curvas de sobrevivência foram comparadas em relação àquelas pacientes com ou sem CTC inicial. A SLPEL e SLPED atuarial foram também estimadas e o tempo foi obtido a partir da data da radioterapia focal à data de última RM (se resposta parcial, completa ou doença estável) ou para a data da RM que mostrar progressão. A SG foi calculada a partir do dia da radioterapia focal até a data da morte ou a data da última avaliação clínico-radiológica.

Testes de log-rank foram aplicados a fim de comparar as curvas de sobrevida. A fim de determinar um valor de ponto de corte para CTC1 e CTC2 em relação aos desfechos de interesse, o método proposto por Lausen e Schumacher (1992) foi aplicado. Essa proposta visa obter o valor de ponto de corte (*cut-off*) otimizado para discriminar as curvas de sobrevivência.

O modelo de riscos proporcionais de Cox (1972) foi ajustado aos dados para descrever a relação entre as variáveis independentes e o tempo até o óbito ou progressão. Todas as variáveis com valor p inferior a 0,10 no modelo de Cox simples foram consideradas no modelo de Cox múltiplo, sendo que outras variáveis poderiam ser incluídas de acordo com a relevância clínica. As variáveis do modelo de regressão de Cox múltiplo foram selecionadas a partir do método de *stepwise backward* (teste da razão de verossimilhança) com p de entrada de 0,05 e remoção de 0,10. Em todos os modelos, a suposição de riscos proporcionais foi avaliada por meio dos resíduos de Schoenfeld (1982) e por meio de um teste global (Grambsch e Therneau 1994). Em todos os casos, temos evidências de que o efeito das covariáveis são constantes ao longo do tempo. Posteriormente, o modelo de Fine-Gray (1999) foi ajustado aos dados considerando PED e PED-ED como desfechos na presença do óbito como risco competitivo.

Esse modelo de riscos proporcionais de subdistribuição foi ajustado aos dados a fim de investigar os efeitos das variáveis independentes na ocorrência desses eventos.

O nível de significância adotado foi de 5%. Assim, resultados cujos valores p foram menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. O software IBM SPSS versão 24 e o software livre R versão 3.5 foram utilizados nas análise dos dados. A Tabela com as variáveis analisadas esta no Apêndice 2.

3.10 FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela Agência Internacional de Energia Atômica (contrato de pesquisa nº 20541).

4 RESULTADOS

4.1 PACIENTES

Durante o período de 23/11/16 a 07/02/18, 40 pacientes foram convidadas a participar do estudo e 39 foram incluídas e tratadas (uma paciente retirou o consentimento por impossibilidade de prosseguir o tratamento na instituição).

A idade mediana foi 54 (34-70) anos e o imunofenótipo do câncer da mama foi HER2-positivo em 20 (51%), luminal B em 12 (31%) e triplo negativo em 7 (18%) pacientes. A distribuição das frequências das demais variáveis qualitativas das pacientes está descrita na Tabela 5.

Foram irradiadas 119 lesões e o número mediano de ME tratada por paciente foi 2 (1-15), sendo que o volume mediano das mesmas foi 0,9 cc (0,027-39,18).

Radionecrose foi observada e caracterizada por RM com espectroscopia e perfusão em uma única paciente, assintomática, com imunofenótipo HER2-positivo e histórico de três RC prévias. A lesão surgiu na região parietal direita cerca de 3 meses após RTEHF com dose de 30 Gy em cinco frações em duas lesões contíguas e reduziu de maneira significativa após tratamento com quatro ciclos de bevacizumabe.

Tabela 5 - Distribuição das frequências das variáveis qualitativas relativas às pacientes.

Variável	Categoria	n	%
<i>Status</i> de Karnofsky	70	4	10,0
	80	3	8
	90	24	61,5
	100	8	20,5
	Total	39	100
Doença extra-encefálica	Ausente	6	15
	Presente	33	85
	Total	39	100
DS-GPA	1	1	2,5
	1,5	2	5
	2	4	10
	2,5	1	2,5
	3	5	13
	3,5	22	57
	4	4	10
Total	39	100	
Tratamento prévio	Cirurgia e RTHE	1	2,5
	Cirurgia e RC	1	2,5
	Cir., RTHE e RTEHF	1	2,5
	Cirurgia	5	13
	RTHE	4	10
	RC	6	15
	RTEHF	1	2,5
	RTHE e RC	2	5
	Nenhum	18	47
Total	39	100	

RC (radiocirurgia); RTEHF (radioterapia estereotáctica hipofracionada); RTHE (radioterapia holoencefálica)

4.2 RADIOTERAPIA

A modalidade de radioterapia focal mais utilizada foi a RC, realizada em 27 pacientes (69,2%); as demais 12 pacientes (30,8%) receberam RTEHF em cinco frações. A dose média prescrita foi 20 Gy (15-22) com RC e 27,5 Gy (25-30) com RTEHF.

Radioterapia adjuvante foi realizada em quatro cavidades cirúrgicas de quatro pacientes. RTEHF foi a única modalidade adjuvante realizada, com dose de 25 Gy em cinco frações.

4.3 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

A taxa de detecção de CTC1 foi 100% nas 39 pacientes e de CTC2 foi 97% (34/35) nas 35 pacientes (4 pacientes faleceram entre CTC1 e CTC2).

O número mediano da contagem de CTC1 foi 2 células/mL (0,25 - 20,5) e de CTC2 foi 2,33 células/mL (0-13), sem diferença significativa na contagem de CTCs entre os dois momentos nas 35 pacientes ($p = 0,357$), conforme demonstrado na Figura 2.

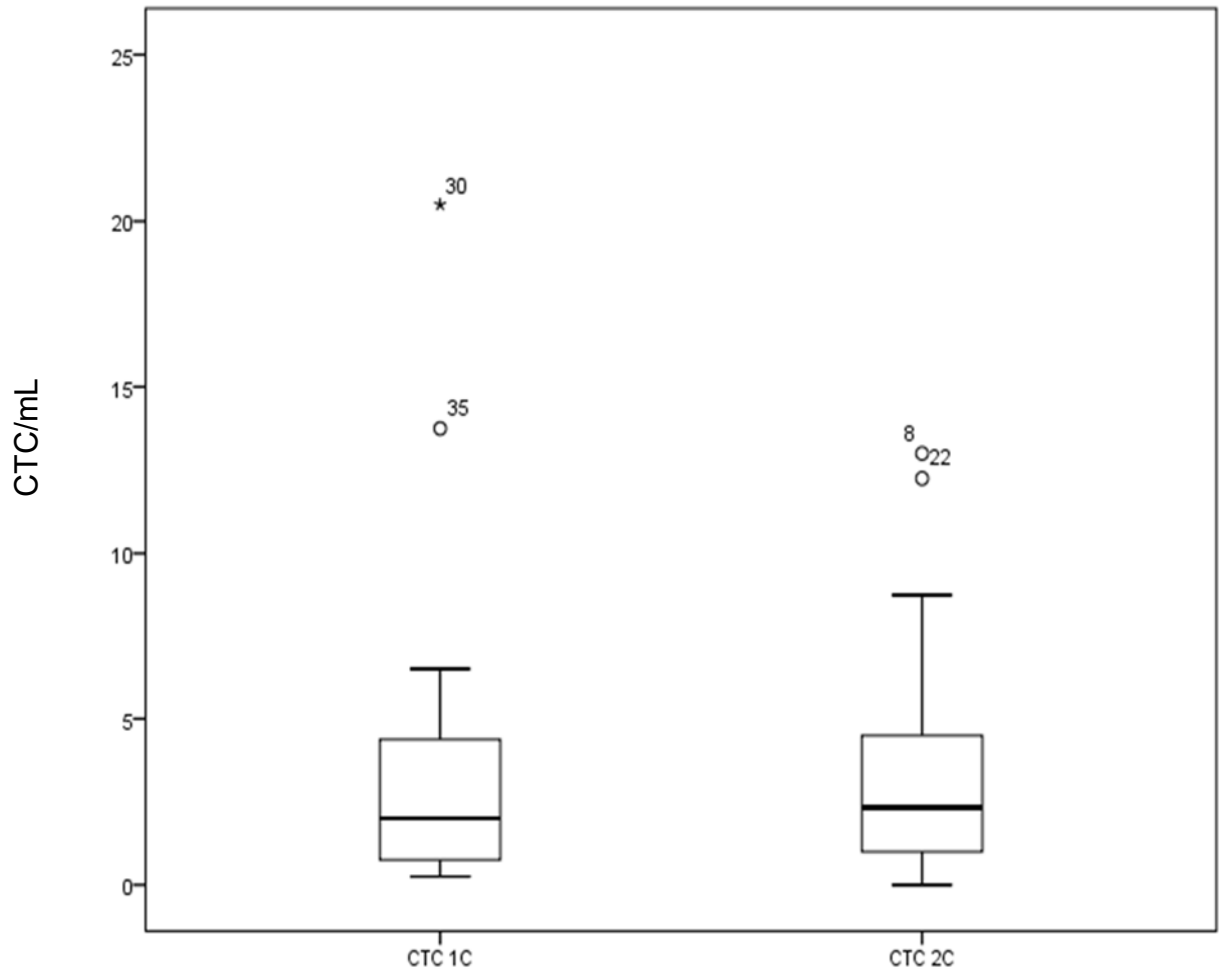


Figura 2 - Gráfico de box-plot mostrando a comparação entre a contagem de CTC1 e CTC2.

As frequências de expressão, por imunocitoquímica, dos biomarcadores COX2, EGFR, ST6GALNAC5, NOTCH1 e HER2 nas CTC1 e CTC2 estão demonstradas na Tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição das frequências de expressão dos biomarcadores nas CTC1 e CTC2.

Biomarcadores	CTC1			CTC2		
	Categoria	n	%	Categoria	n	%
COX2	Negativo	1	3,6	Negativo	1	2,5
	Positivo	27	96,4	Positivo	24	96
	Total	28	100	Total	25	100
EGFR	Negativo	22	78,6	Negativo	9	50
	Positivo	6	21,4	Positivo	9	50
	Total	28	100	Total	18	100
ST6GALNAC5	Negativo	12	46,2	Negativo	6	33,3
	Positivo	14	53,8	Positivo	12	66,7
	Total	26	100	Total	18	100
NOTCH1	Negativo	13	40,6	Negativo	11	40,7
	Positivo	19	59,4	Positivo	16	59,3
	Total	32	100	Total	27	100
HER2	Negativo	29	90,6	Negativo	19	70,4
	Positivo	3	9,4	Positivo	8	29,6
	Total	32	100	Total	27	100

Todas as pacientes com CTCs detectáveis foram avaliadas para cada um dos biomarcadores. Entretanto, nem todas as pacientes tinham CTCs nos *spots* quando da leitura de alguns dos biomarcadores. Por esse motivo, o número de pacientes testadas variou de 18 a 32 (Figura 3).

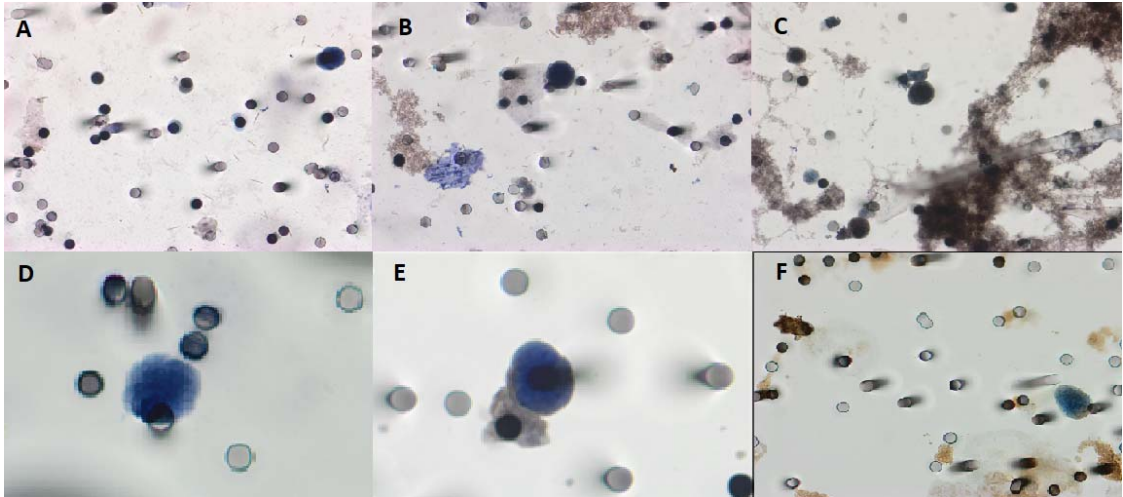


Figura 3 - Fotomicrografias de CTCs isoladas do sangue de pacientes com câncer da mama metastático. Observam-se as CTCs marcadas para diversos biomarcadores e os poros da membrana de policarbonato com 8 μm de diâmetro. A) NOTCH1; B) ST6GALNAC5; C) COX2; D) CTC com expressão negativa e corada somente com hematoxilina e eosina; E) HER2; F) EGFR.

Em relação à expressão do HER2 nas CTCs, houve discordância em relação ao imunofenótipo do tumor primário em 15 das 32 pacientes testadas na coleta inicial: 14 das 15 pacientes com imunofenótipo HER2-positivo tiveram expressão negativa e 1 das 17 sem imunofenótipo HER2-positivo teve expressão positiva do HER2 nas CTC. Dentre as 27 pacientes testadas na coleta final, houve discordância em 14 delas: 12 das 14 pacientes com imunofenótipo HER2-positivo tiveram expressão negativa e 2 das 13 sem imunofenótipo HER2-positivo tiveram expressão positiva do HER2 nas CTCs.

4.4 IMPACTO PROGNÓSTICO DE CTC1 E CTC2 NA SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO ENCEFÁLICA DISTANTE (SLPED)

Dentre as 39 pacientes tratadas, 36 foram avaliáveis para SLPED, com um seguimento mediano de 14,6 meses (IC95%: 11,1–18,1). A SLPED mediana foi 15,3 meses (IC95%: 12,2– não atingida) (Figura 4).

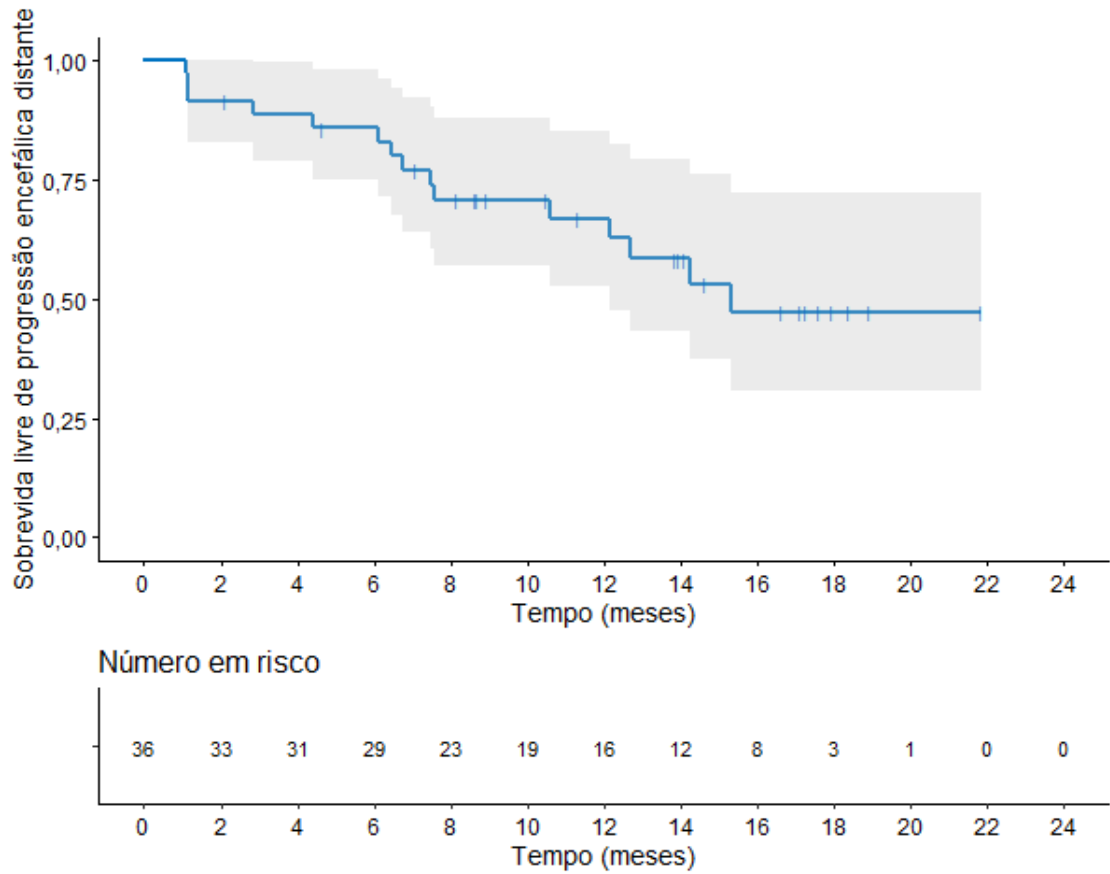


Figura 4 - Curva de SLPED estimada pelo método de Kaplan-Meier (área cinza corresponde ao intervalo de confiança de 95%).

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte do valor de CTC1 e CTC2 para análise da correlação com SLPED. O valor do ponto de corte sugerido para CTC1 foi 0,5 CTC/mL (Figura 5).

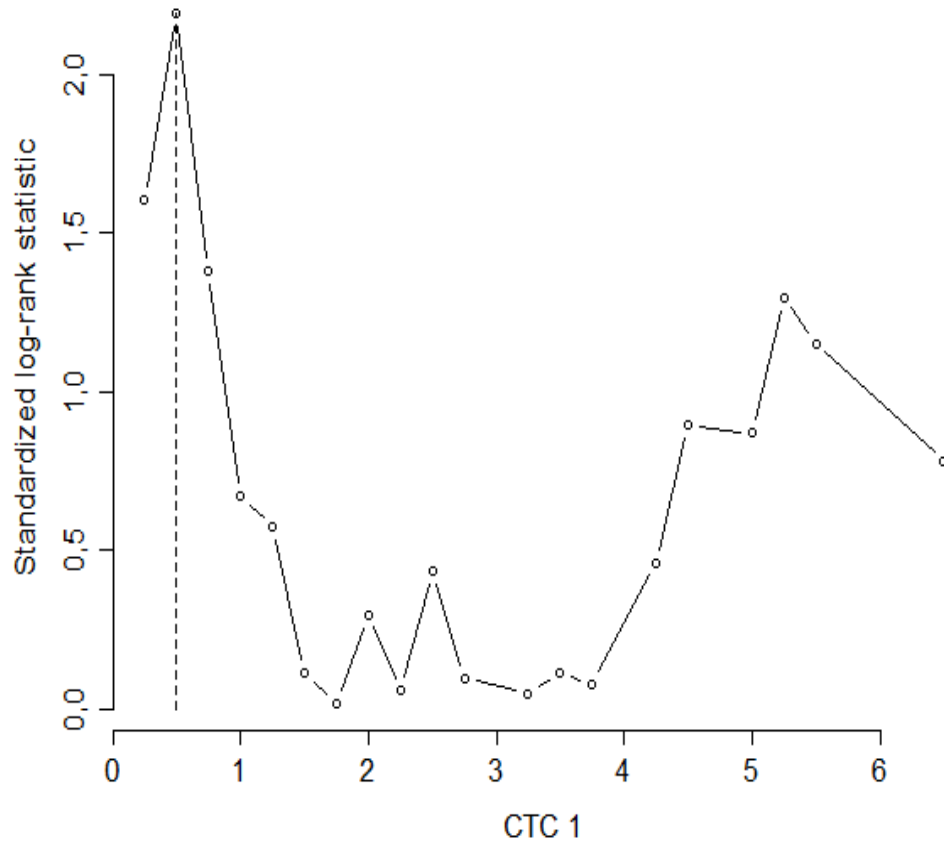


Figura 5 - Estimativa do ponto de corte para CTC1 e SLPED.

A SLPED mediana foi 6 meses nas pacientes com CTC1 $\leq 0,5$ CTC/mL e não atingida nas pacientes com CTC1 $> 0,5$ CTC/mL (HR = 4,97; IC95%:1,48–16,69; p = 0,0041) (Figura 6).

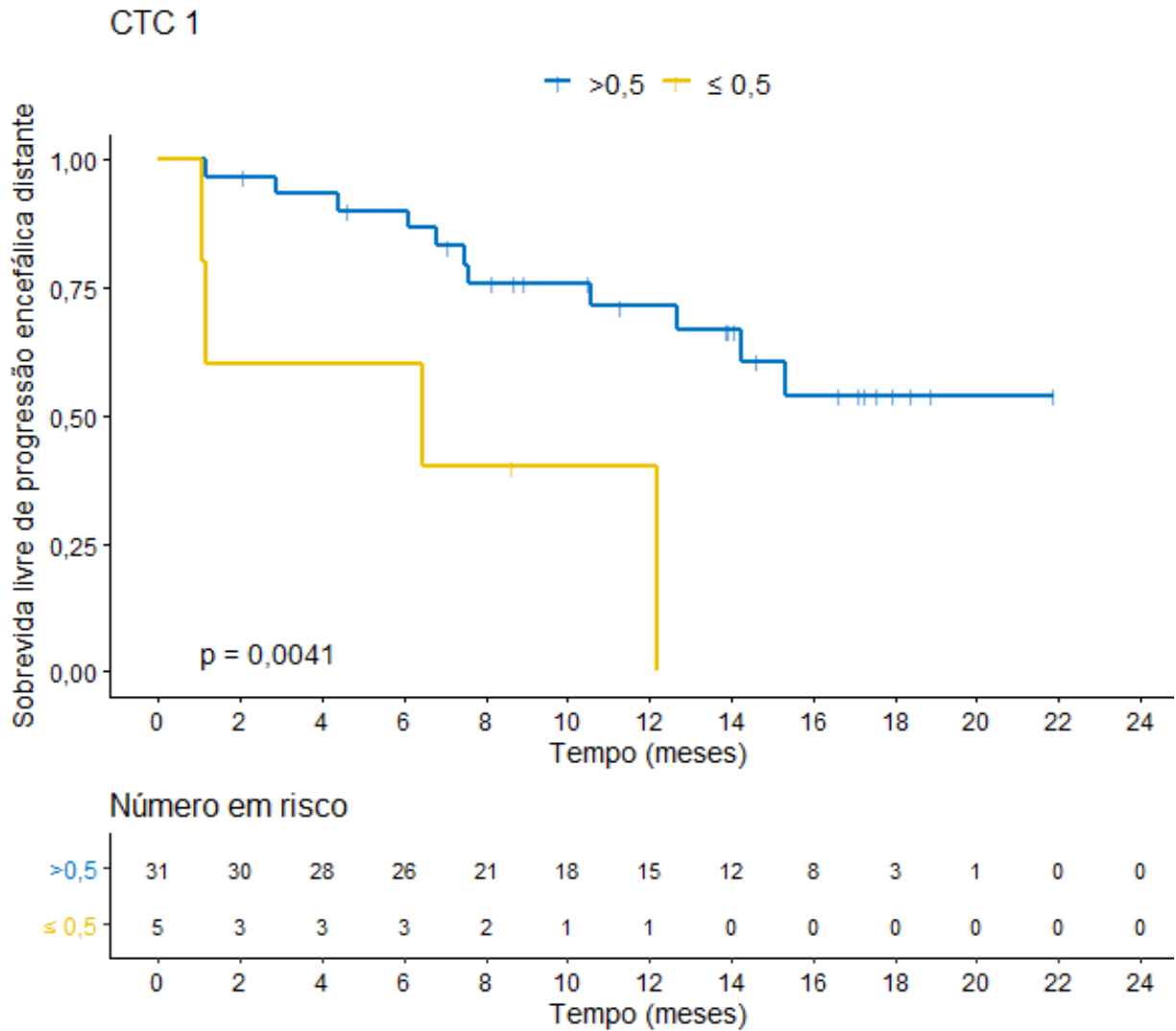


Figura 6 - SLPED atuarial estratificada por CTC1 (\leq ou $> 0,5$ CTC/mL).

A incidência cumulativa de progressão encefálica distante (PED) aos 6 meses, tendo o óbito como risco competitivo, foi de 40% nas pacientes com $CTC1 \leq 0,5$ CTC/mL e 8,82% nas pacientes com $CTC1 > 0,5$ CTC/mL ($p = 0,007$) (Figura 7).

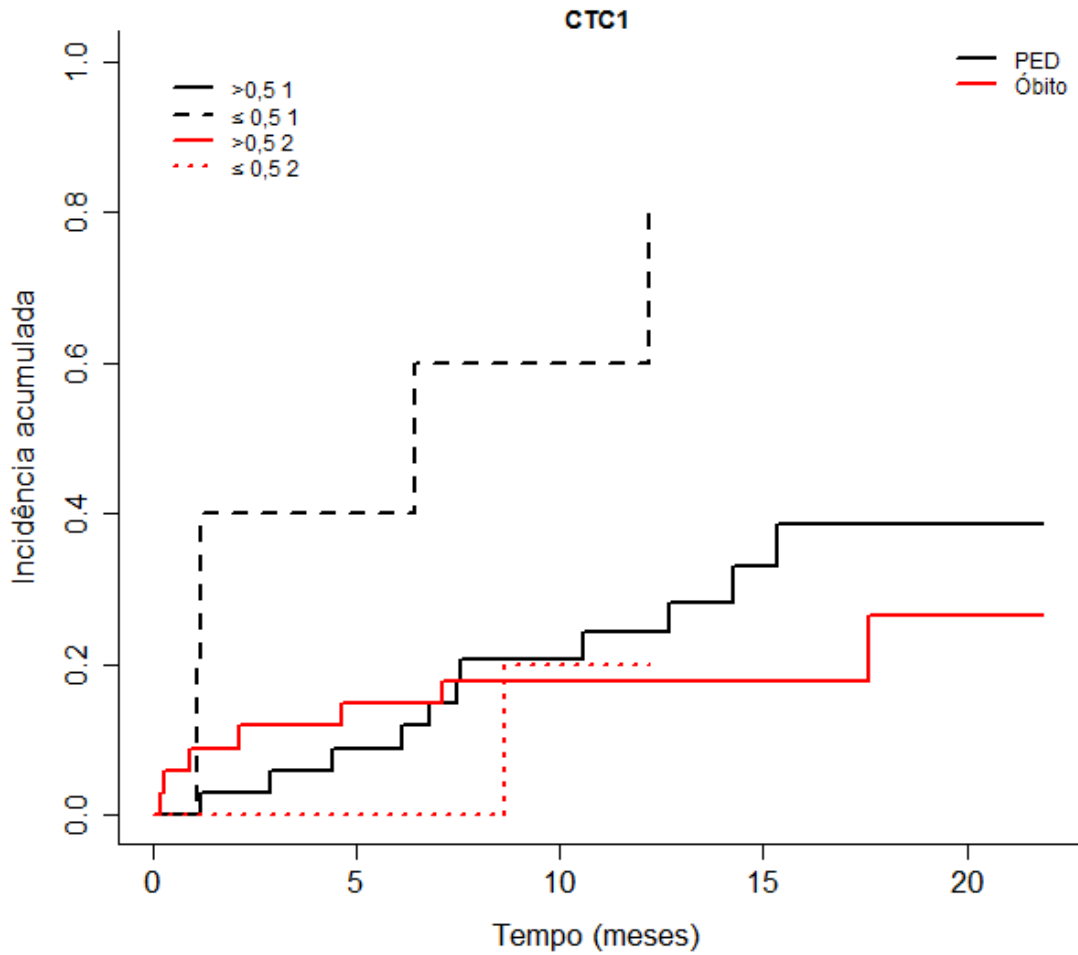


Figura 7 - Incidências cumulativas de PED e óbito estratificadas por CTC1 (\leq ou $>$ 0,5 CTC/mL).

O valor do ponto de corte sugerido pelo teste de Lausen e Schumacher para CTC2 foi 3,75 CTC/mL (Figura 8).

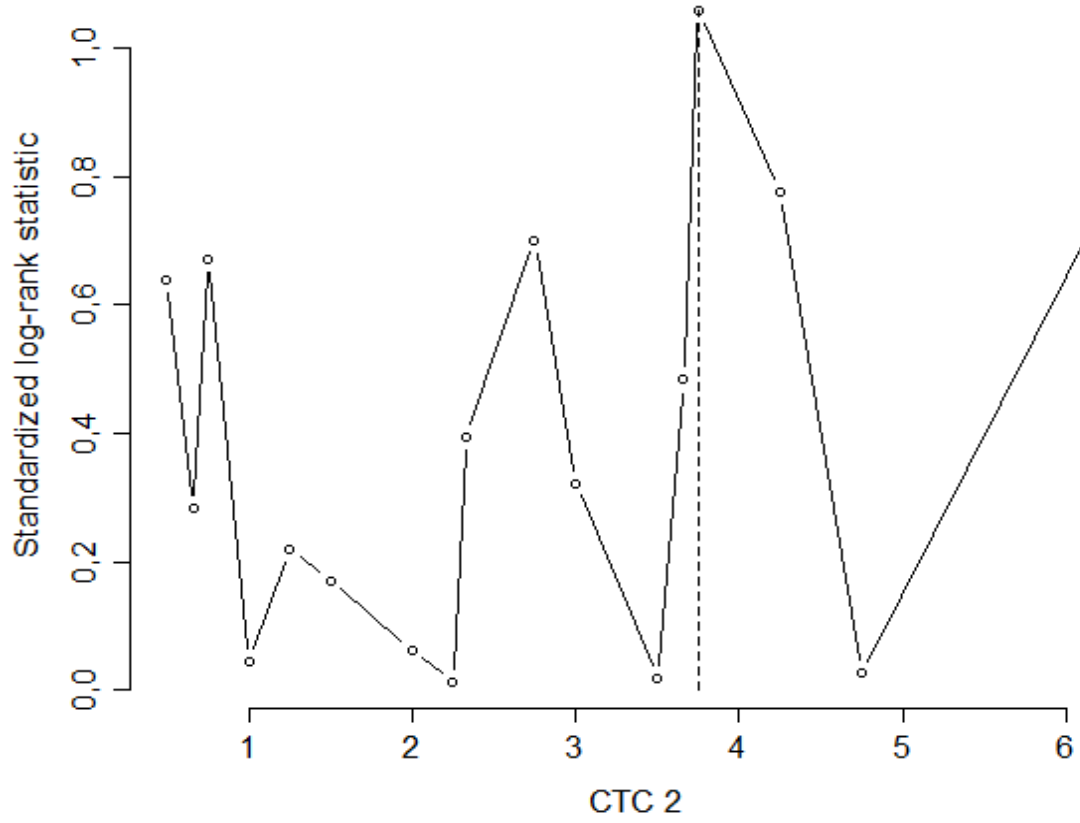


Figura 8 - Estimativa do ponto de corte para CTC2 e SLPED.

A SLPED mediana foi 13 meses nas pacientes com $CTC2 \leq 3,75$ CTC/mL e não atingida em pacientes com $CTC2 > 3,75$ CTC/mL (HR = 1,89; IC95%:0,53–6,74; p = 0,31) (Figura 9).

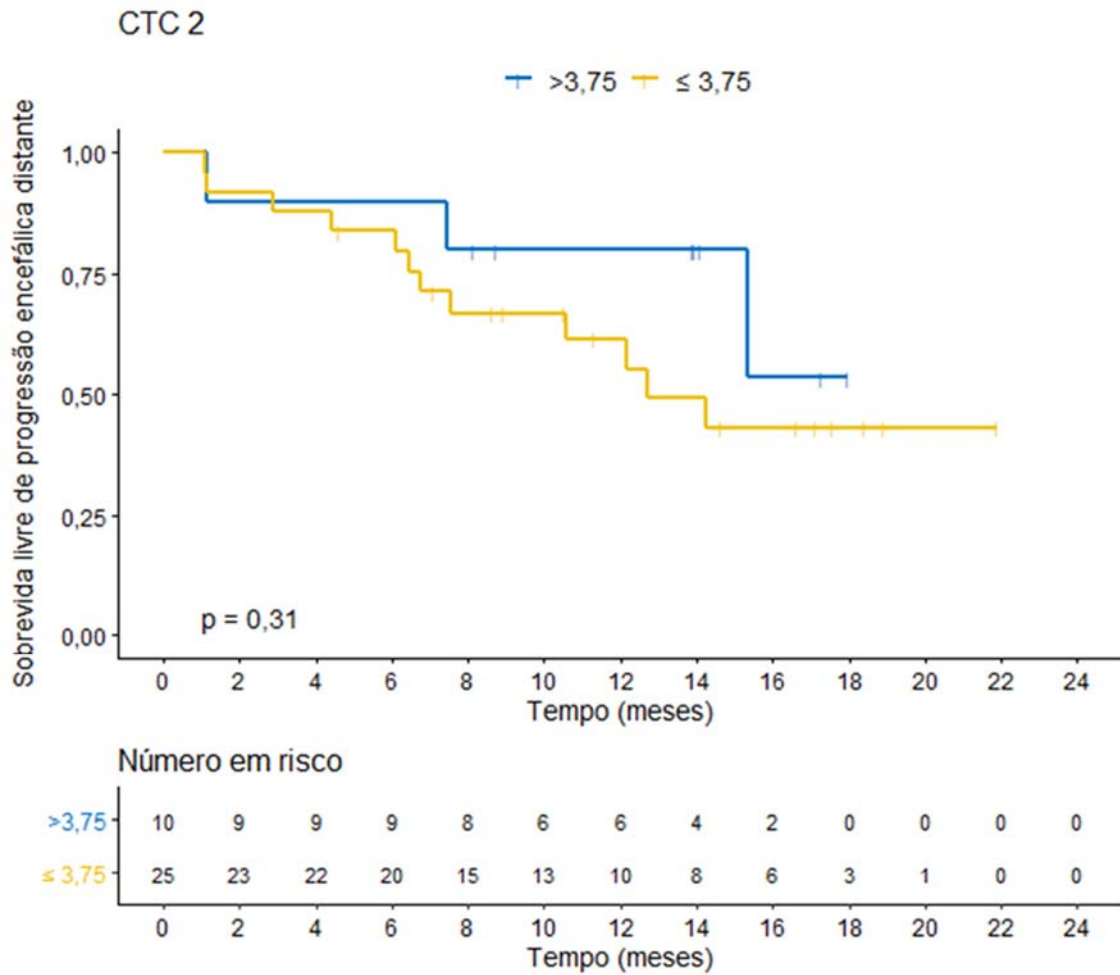


Figura 9 - SLPED atuarial estratificada por CTC2 (\leq ou $>$ 3,75 CTC/mL).

4.5 IMPACTO PROGNÓSTICO DE CTC1 E CTC2 NA SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO ENCEFÁLICA DISTANTE COM ENVOLVIMENTO DIFUSO (SLPED-ED)

Dentre as 39 pacientes tratadas, 36 foram avaliáveis para SLPED-ED, com um seguimento mediano de 14,1 meses (IC95%: 11,1–18,1). A SLPED-ED mediana não foi atingida (Figura 10).

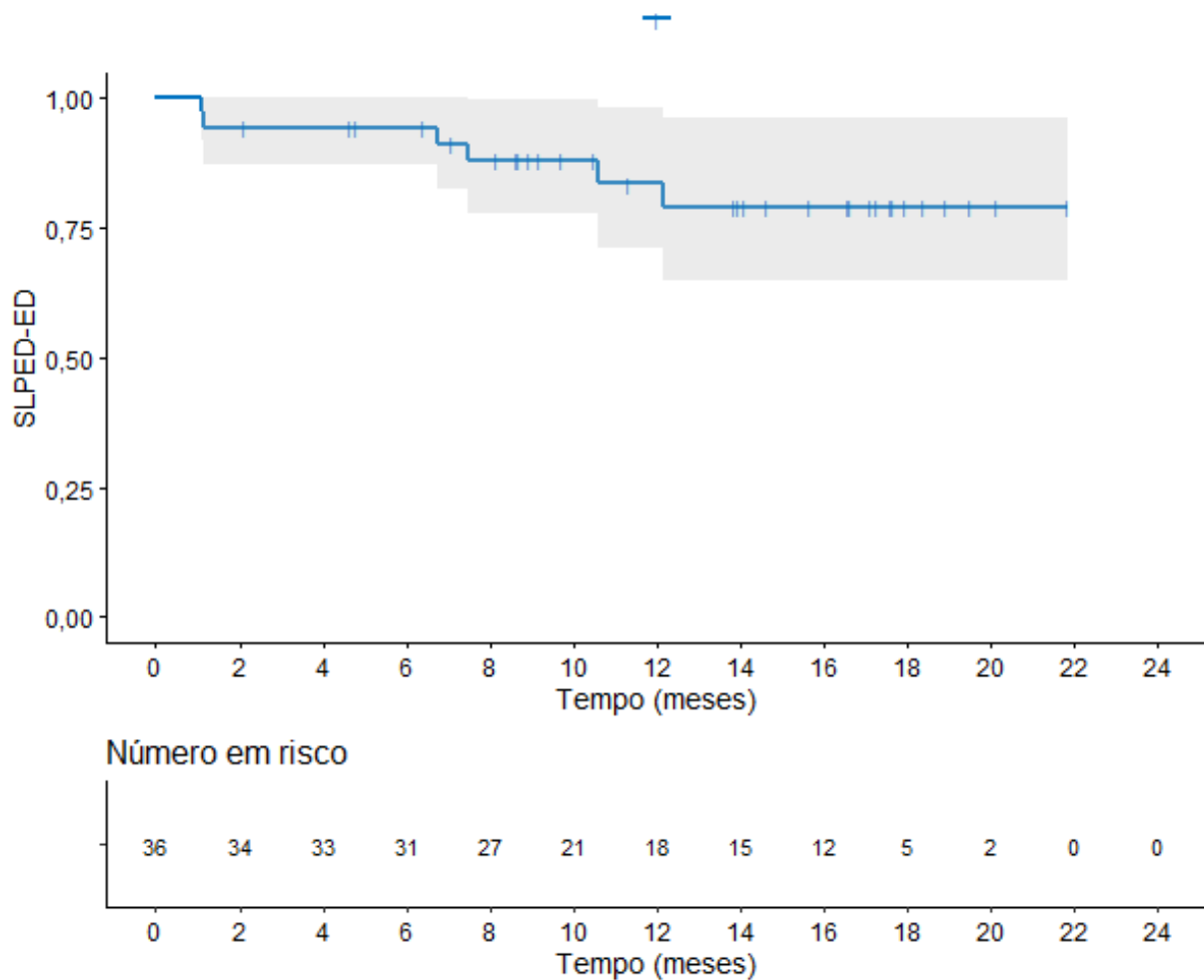


Figura 10 - Curva de SLPED-ED estimada pelo método de Kaplan-Meier.

Dentre as 15 pacientes que evoluíram com progressão encefálica distante durante o período de seguimento, seis (40%) apresentaram envolvimento difuso, sendo três pacientes com disseminação leptomeníngea (DLM) e três com mais de quatro novas ME.

O tempo médio para progressão encefálica distante com envolvimento difuso foi 6,2 meses (1-12) e o tratamento de resgate foi realizado em 4 pacientes: RC em uma paciente,

reirradiação com RTHE e dose de 20 Gy em 10 frações em duas pacientes com mais de quatro novas lesões e RTHE com 30 Gy em 10 frações em uma paciente com DLM.

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte do valor de CTC1 e CTC2 para análise da correlação com SLPED-ED. O valor de corte sugerido para CTC1 foi 0,5 CTC/mL (Figura 11).

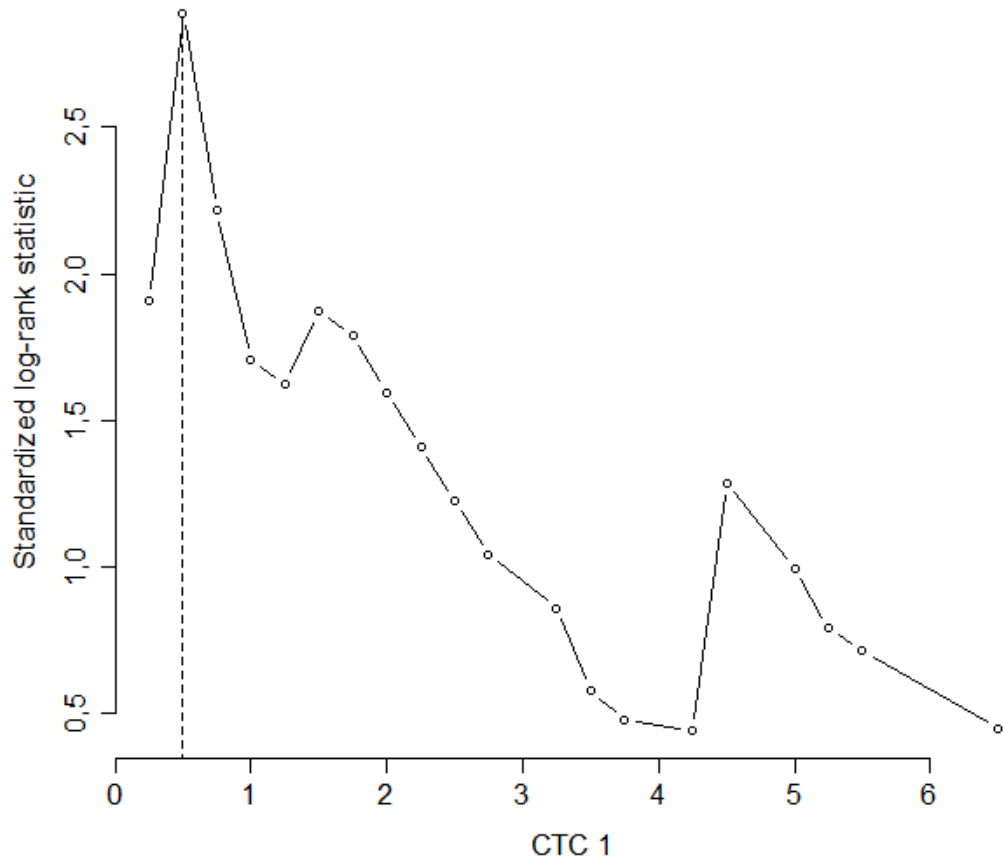


Figura 11 - Estimativa do ponto de corte para CTC1 e SLPED-ED.

A SLPED-ED mediana foi 6 meses nas pacientes com CTC1 $\leq 0,5$ CTC/mL e não atingida pacientes com CTC1 $> 0,5$ CTC/mL (HR = 10,22; IC95%:1,99–52,4; p = 0,005) (Figura 12).

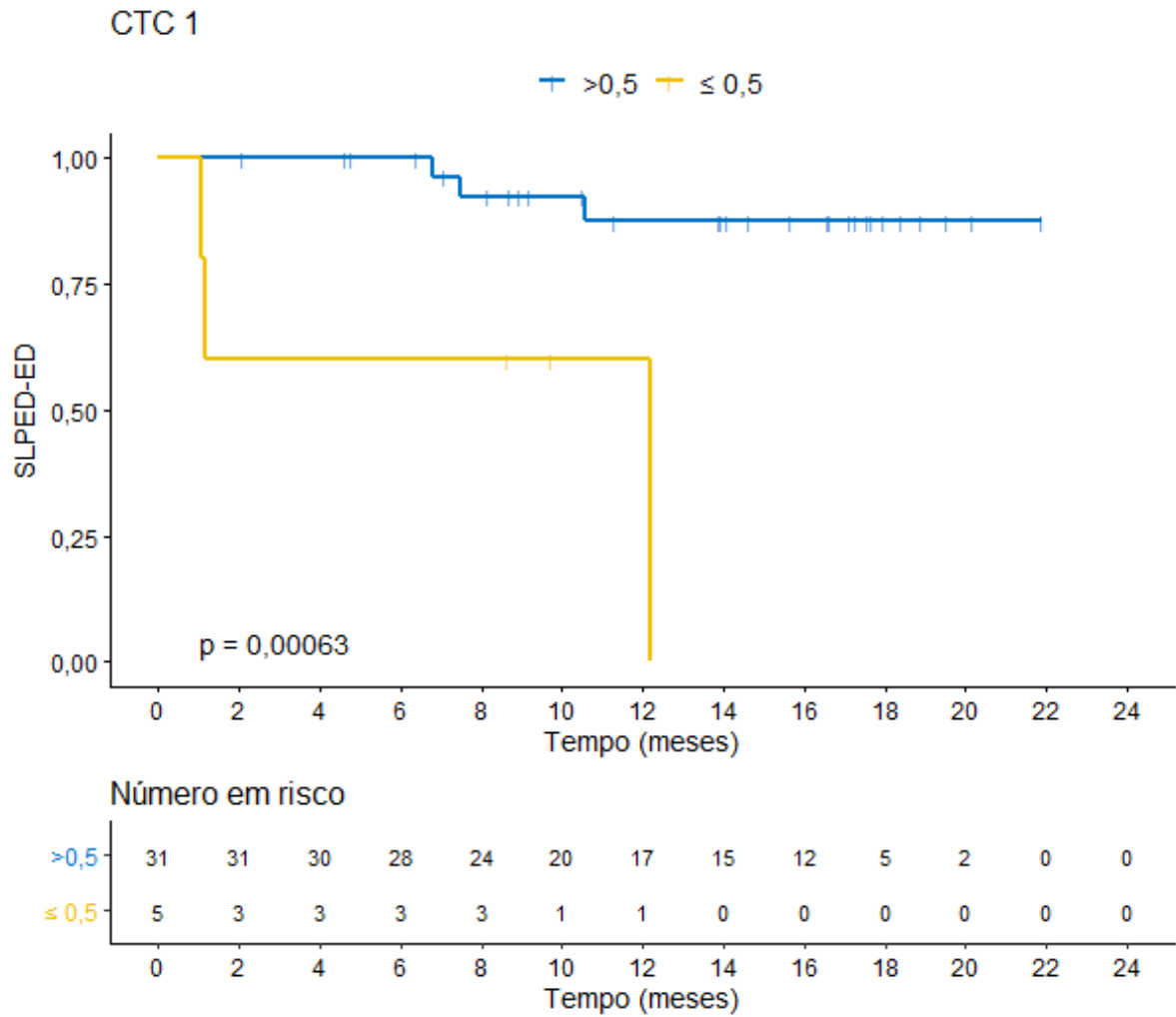


Figura 12 - SLPED-ED atuarial estratificada por CTC1 (\leq ou $> 0,5$ CTC/mL).

A incidência cumulativa de progressão encefálica distante com envolvimento difuso (PED-ED) aos 6 meses, tendo o óbito como risco competitivo, foi de 40% nas pacientes com $CTC1 \leq 0,5$ CTC/mL e zero nas pacientes com $CTC1 > 0,5$ CTC/mL ($p = 0,005$) (Figura 13).

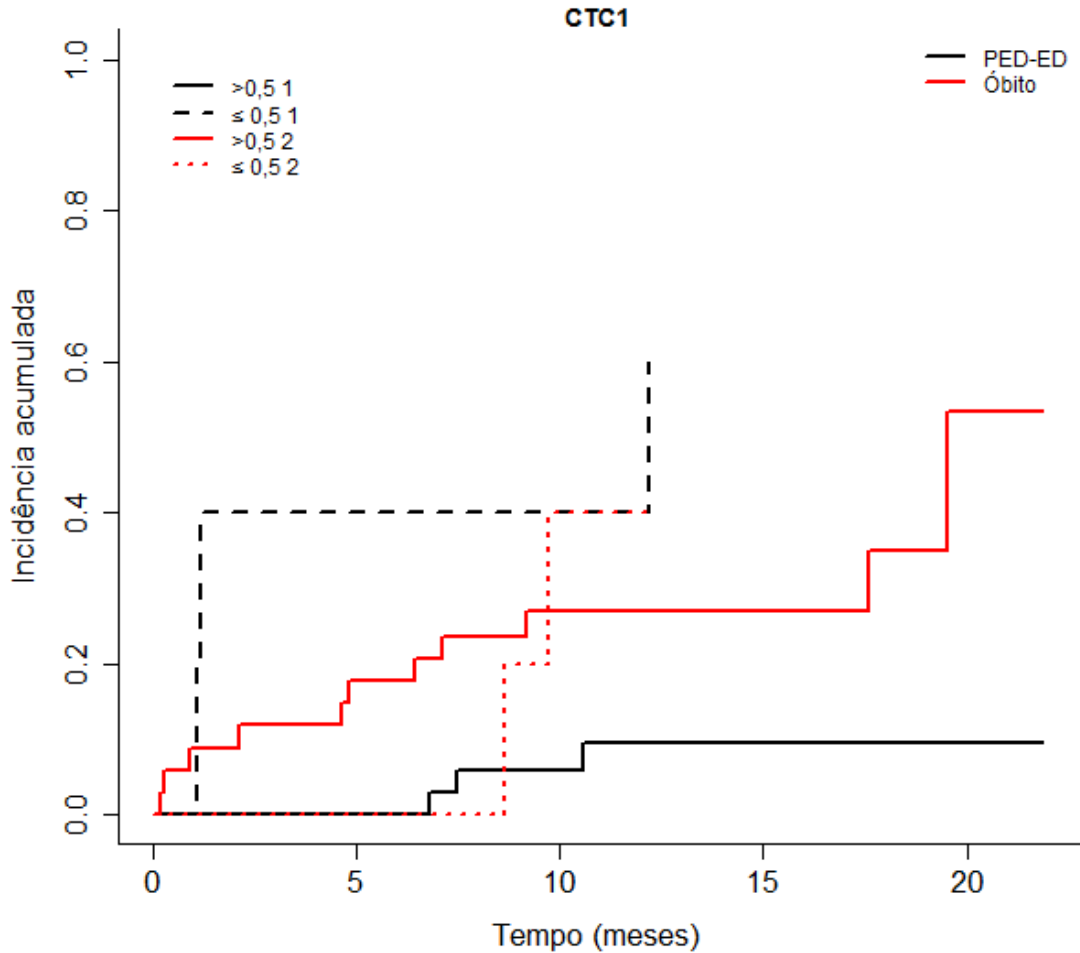


Figura 13 - Incidências cumulativas de PED-ED e óbito estratificadas por CTC1 (\leq ou $>$ 0,5 CTC/mL).

A análise dos demais fatores associados à PED e PED-ED pelo modelo de FINE-GRAY (1999), considerando-se óbito como risco competitivo, está disponível no Apêndice 3.

O valor do ponto de corte sugerido pelo teste de Lausen e Schumacher para CTC2 foi 1 CTC/mL (Figura 14).

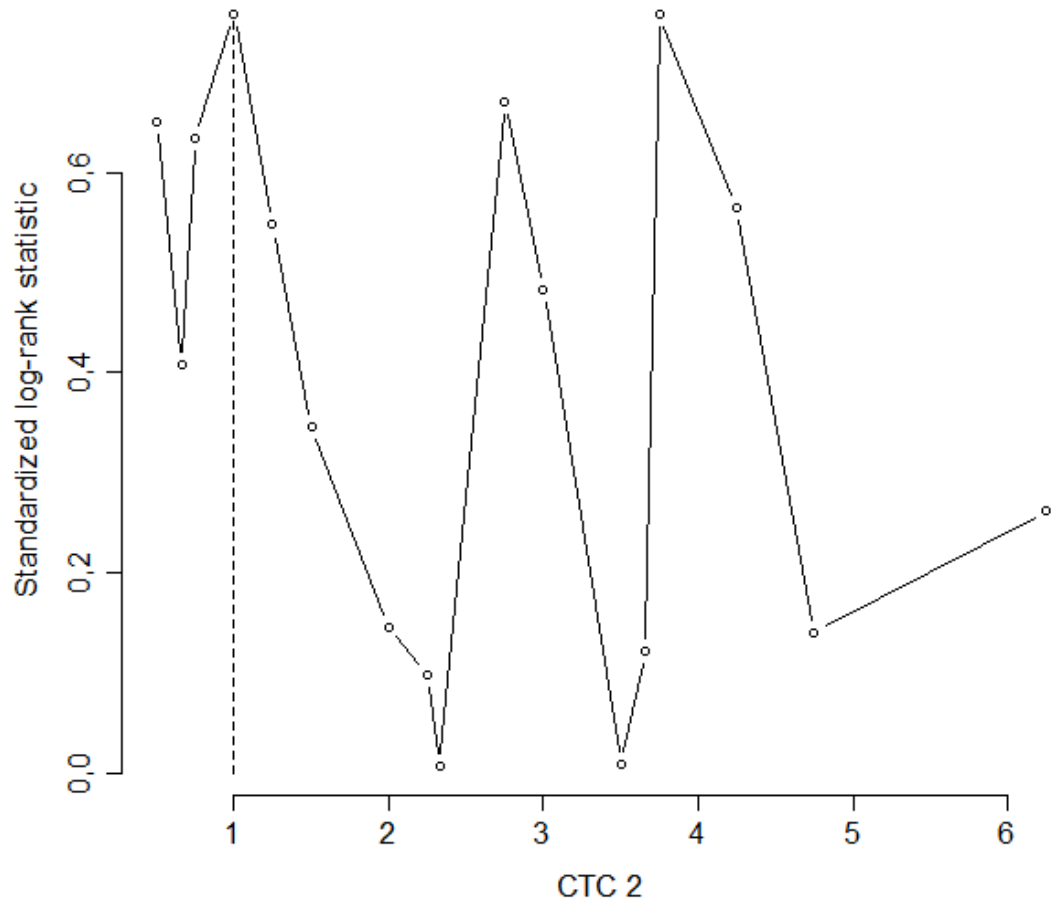


Figura 14 - Estimativa do ponto de corte para CTC2 e SLPED-ED.

A SLPED-ED mediana foi 13 meses nas pacientes com $CTC2 \leq 1$ CTC/mL e não atingida em pacientes com $CTC2 > 1$ CTC/mL (HR = 1,83; IC95%:0,37-1,26; $p = 0,67$) (Figura 15).

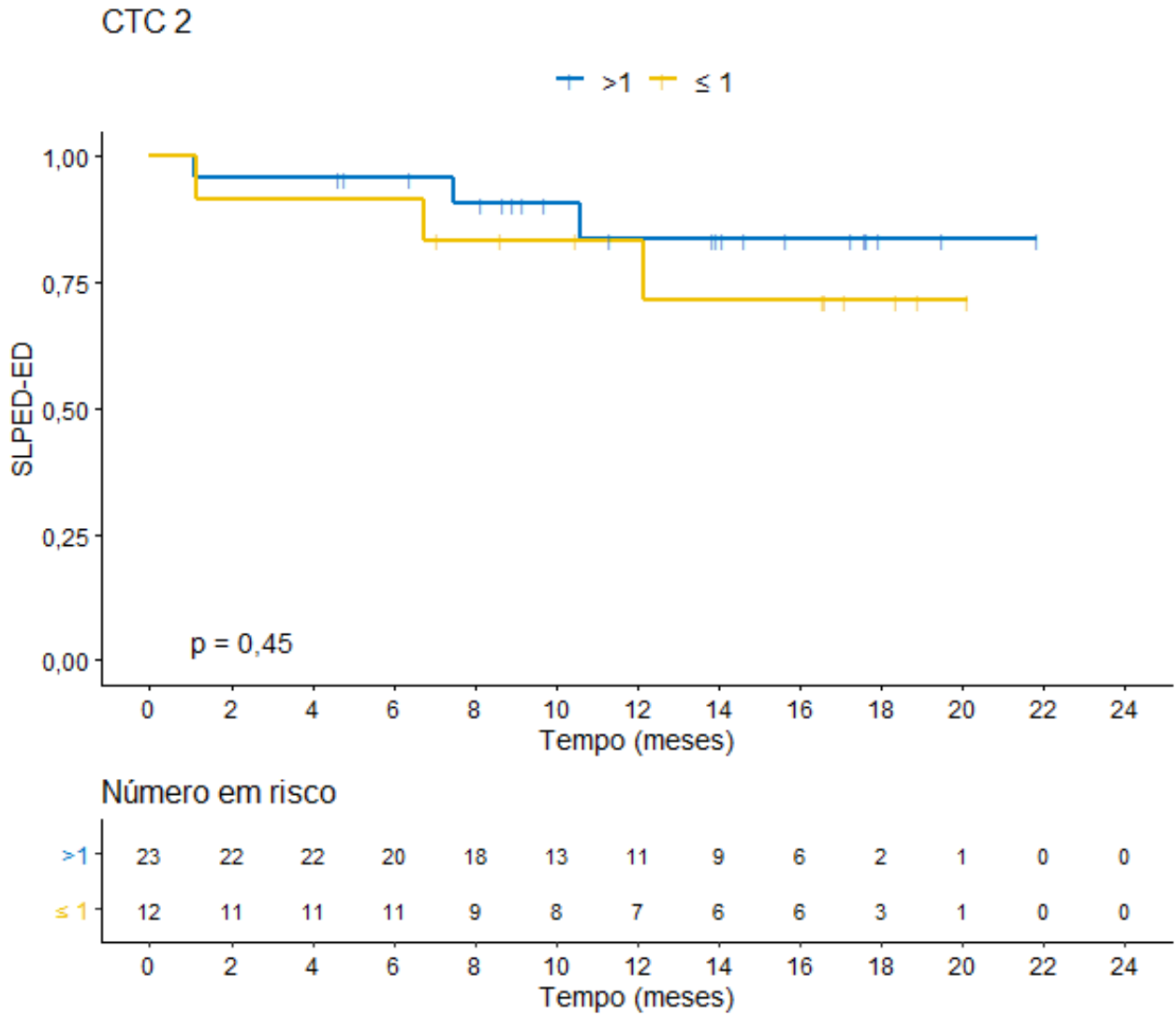


Figura 15 - SLPED atuarial estratificada por CTC2 (\leq ou > 1 CTC/mL).

4.6 IMPACTO PROGNÓSTICO DE CTC1 E CTC2 NA SOBREVIVÊNCIA GLOBAL (SG)

Dentre as 39 pacientes tratadas, o seguimento mediano foi 16,6 meses (IC95%: 14,8–18,4 meses) e a SG mediana foi 19,5 meses (IC95%: 16,1–22,9) (Figura 16).

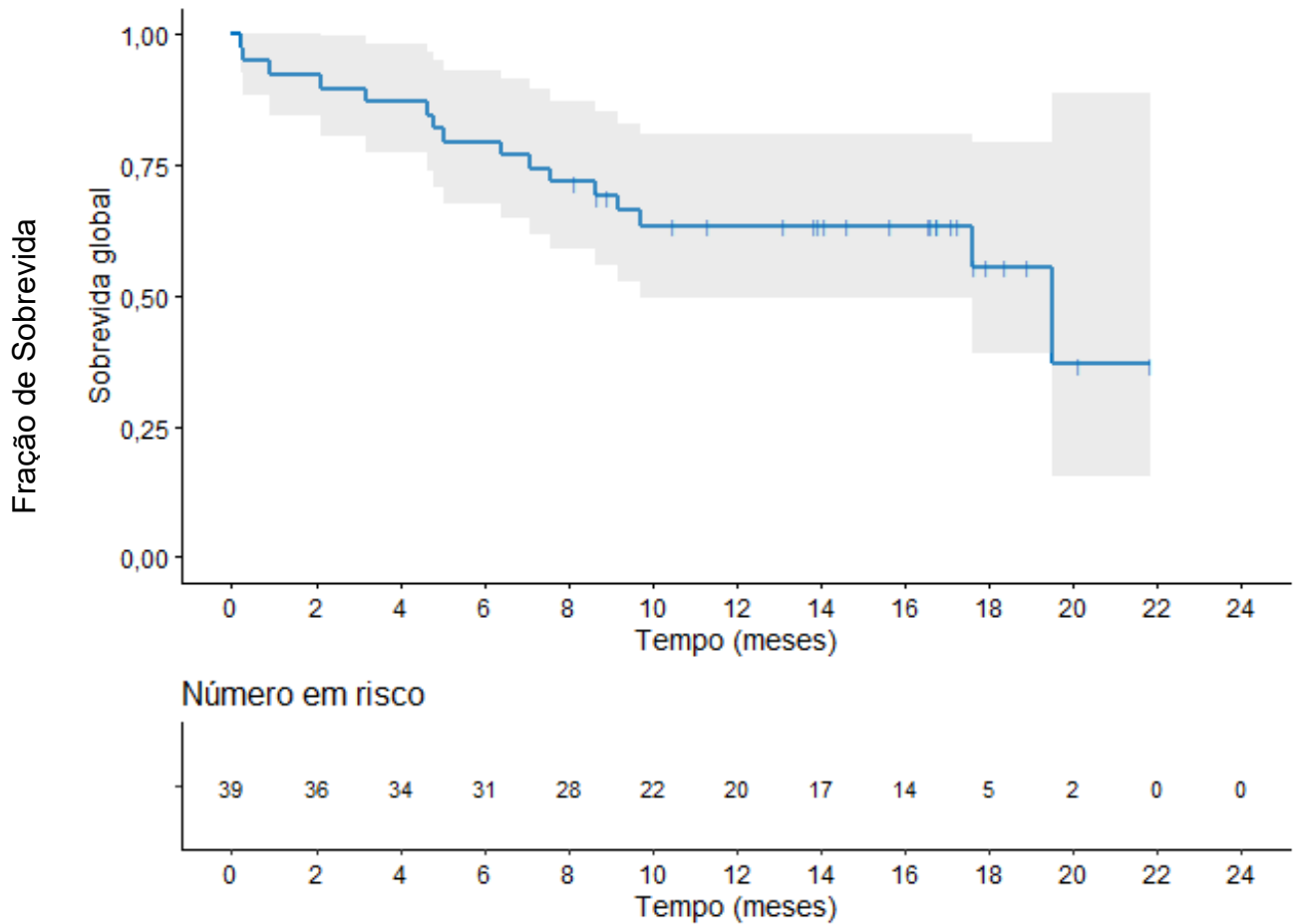


Figura 16 - Curva de SG estimada pelo método de Kaplan-Meier.

Dentre as 16 mortes observadas durante o período de seguimento, 11 (68%) ocorreram por progressão da doença fora do sistema nervoso central, predominantemente no pulmão (9 das 11 mortes).

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte da contagem de CTC1 e CTC2 para análise da correlação com SG. O valor do ponto de corte sugerido para CTC1 foi 0,5 CTC/mL (Figura 17).

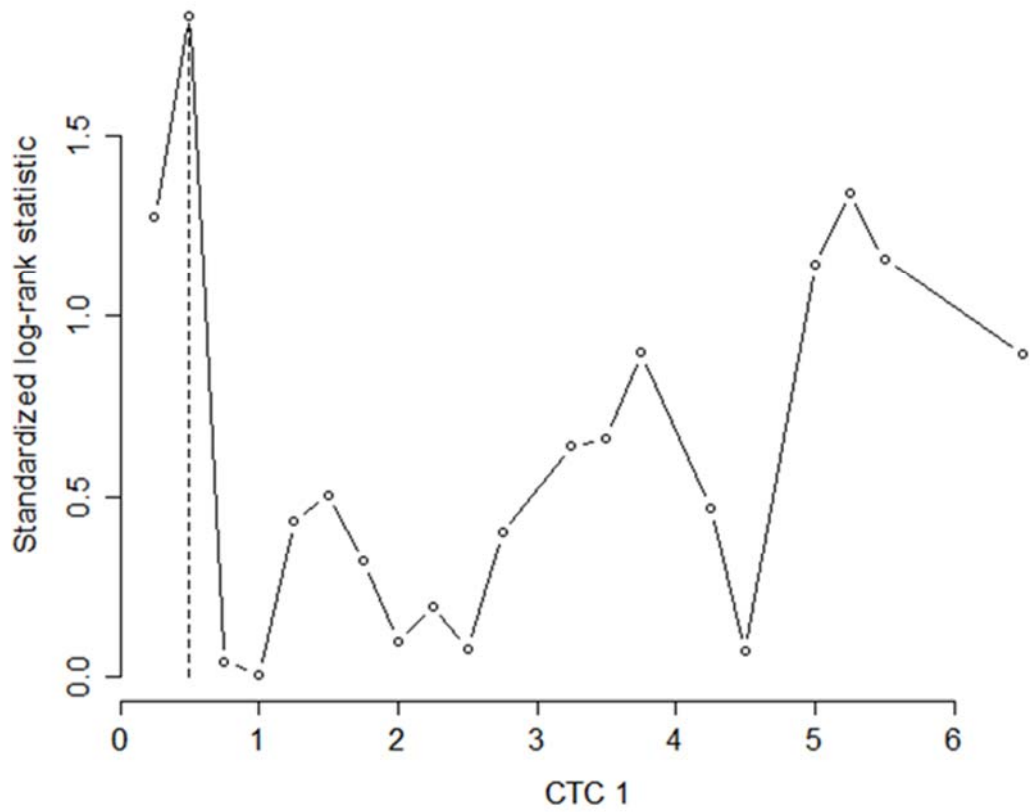


Figura 17 - Estimativa do ponto de corte para CTC1 e SG.

A SG mediana foi 8,6 meses nas pacientes com CTC1 $\leq 0,5$ CTC/mL e 19,5 meses nas pacientes com CTC1 $> 0,5$ CTC/mL (HR = 3,07; IC95%:0,95–9,82; p = 0,047) (Figura 18).

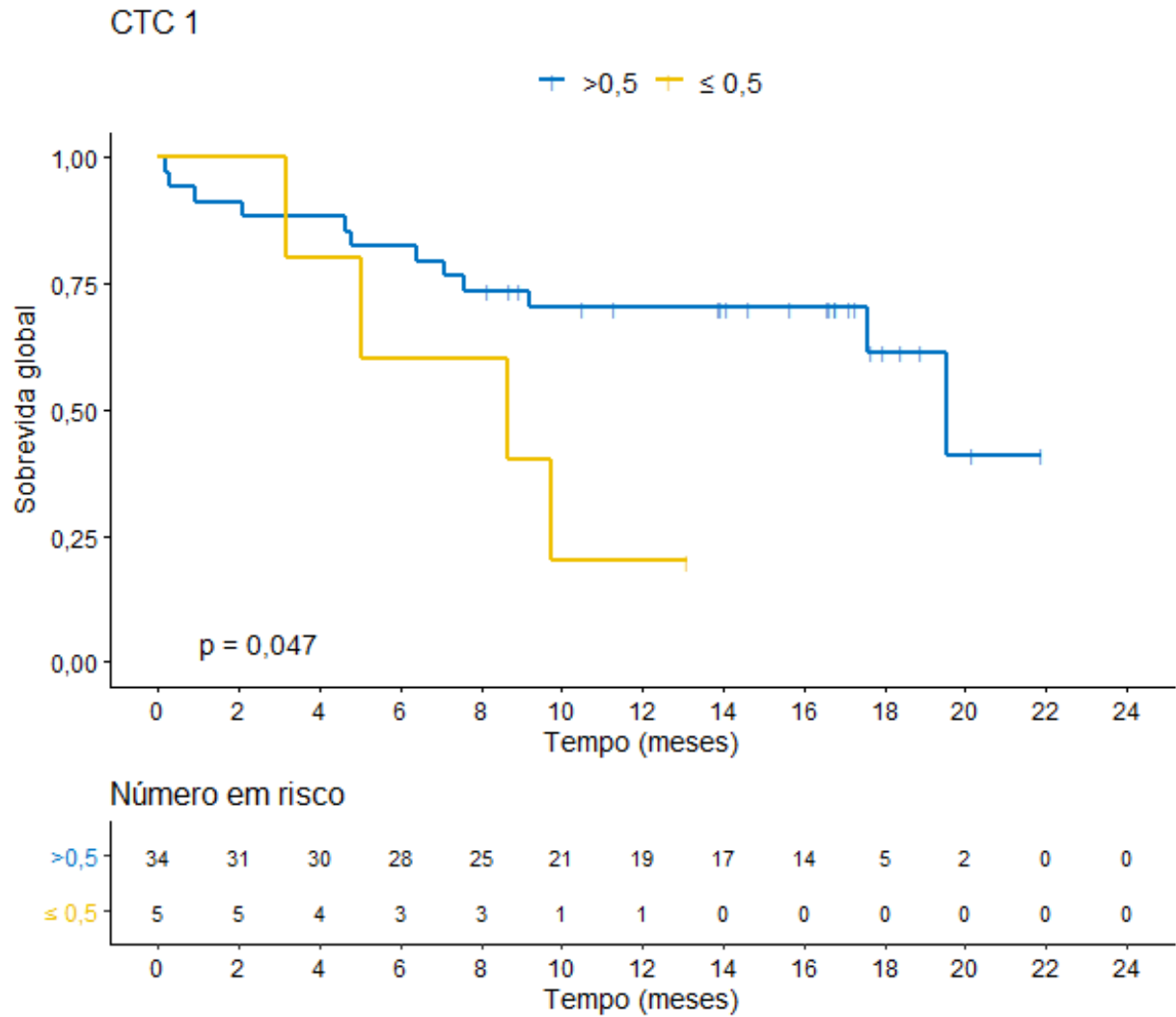


Figura 18 - SG atuarial estratificada por CTC1 (\leq ou $> 0,5$ CTC/mL).

O valor do ponto de corte sugerido pelo teste de Lausen e Schumacher para CTC2 foi 1,5 CTC/mL (Figura 19).

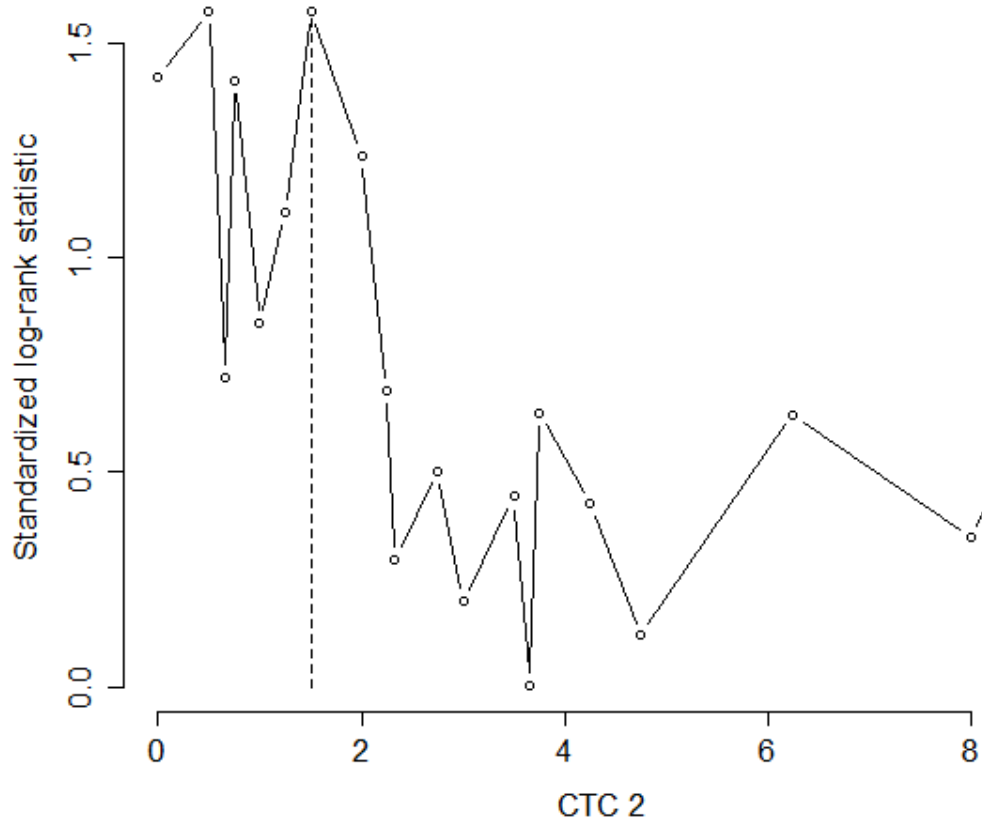


Figura 19 - Estimativa do ponto de corte para CTC2 e SG.

A SG mediana foi 17,6 meses nas pacientes com CTC2 > 1,5 CTC/mL e não atingida nas pacientes com CTC2 ≤ 1,5 CTC/mL (HR = 0,37; IC95%:0,09–1,38; p = 0,13) (Figura 20).

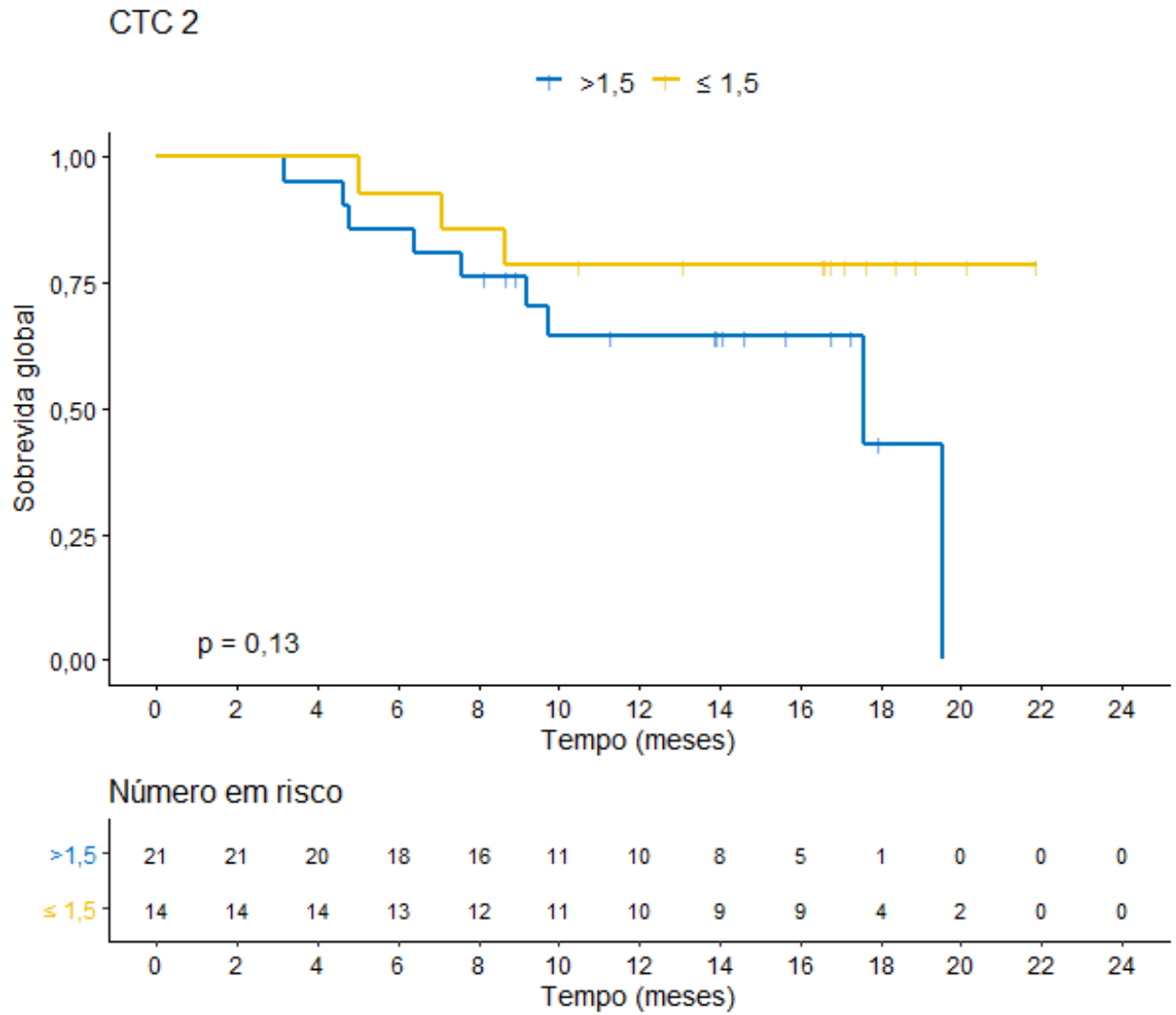


Figura 20 - SG atuarial estratificada por CTC2 (≤ ou > 1,5 CTC/mL).

4.7 IMPACTO PROGNÓSTICO DE CTC1 E CTC2 NA SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE PROGRESSÃO ENCEFÁLICA LOCAL (SLPEL)

Dentre as 119 lesões irradiadas, 97 foram avaliáveis, uma vez que três pacientes faleceram antes da realização da primeira RM de seguimento. Observou-se estabilidade em 33 (34%) lesões, resposta parcial em 58 (60%) lesões, resposta completa em 3 (3%) lesões e progressão da doença em 3 (3%) lesões irradiadas.

As três lesões que progrediram localizavam-se no cerebelo de três pacientes com imunofenótipo HER2-positivo e foram tratadas com RC, sendo duas com dose de 18 Gy e uma com dose de 21 Gy. A progressão ocorreu aos 7, 9 e 15 meses após a RC e, posteriormente, duas dessas lesões foram reirradiadas: uma com RTEHF e dose de 30 Gy em cinco frações e outra com RC e dose única de 18 Gy.

A SLPEL atuarial foi 100% em 6 meses, 97,93% em 1 ano e 96,89% em 2 anos. Tendo em vista o pequeno número de eventos (três) relativos à falha local no período observado, não se realizou análise dos potenciais fatores prognósticos associados. Dentre as três pacientes que evoluíram com progressão encefálica local, o número médio da contagem de CTC1 foi 0,58 células/mL (0,25-0,75) e de CTC2 foi 2,13 células/mL (0,66-4,75).

4.8 IMPACTO PROGNÓSTICO DA VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DE CTC1 E CTC2 (CINÉTICA DAS CTCs) NA SLPED

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte da razão entre CTC2 e CTC1 para análise da correlação com SLPED. O valor do ponto de corte sugerido para CTC2/CTC1 foi 0,3 (Figura 21).

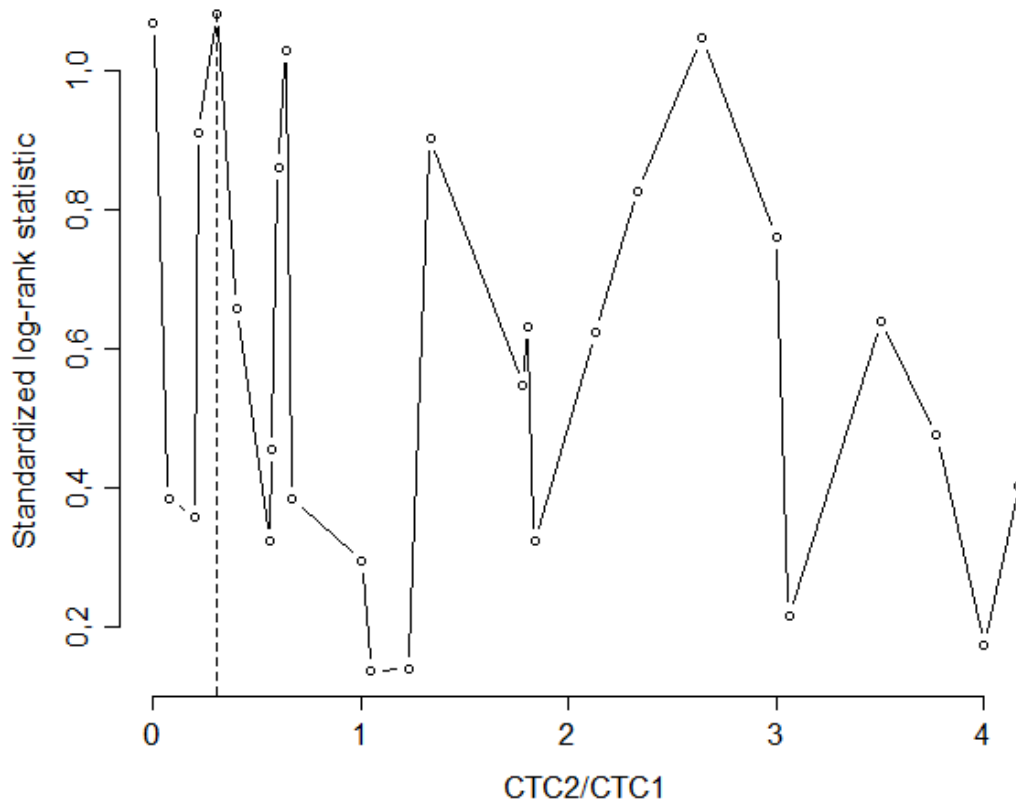


Figura 21 - Estimativa do ponto de corte para CTC2/CTC1 e SLPED.

A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com $CTC2/CTC1 \leq 0,3$ e foi 14,2 meses nas pacientes com $CTC2/CTC1 > 0,3$ (HR = 2,78; IC95%:0,36–21,18; p = 0,3) (Figura 22).

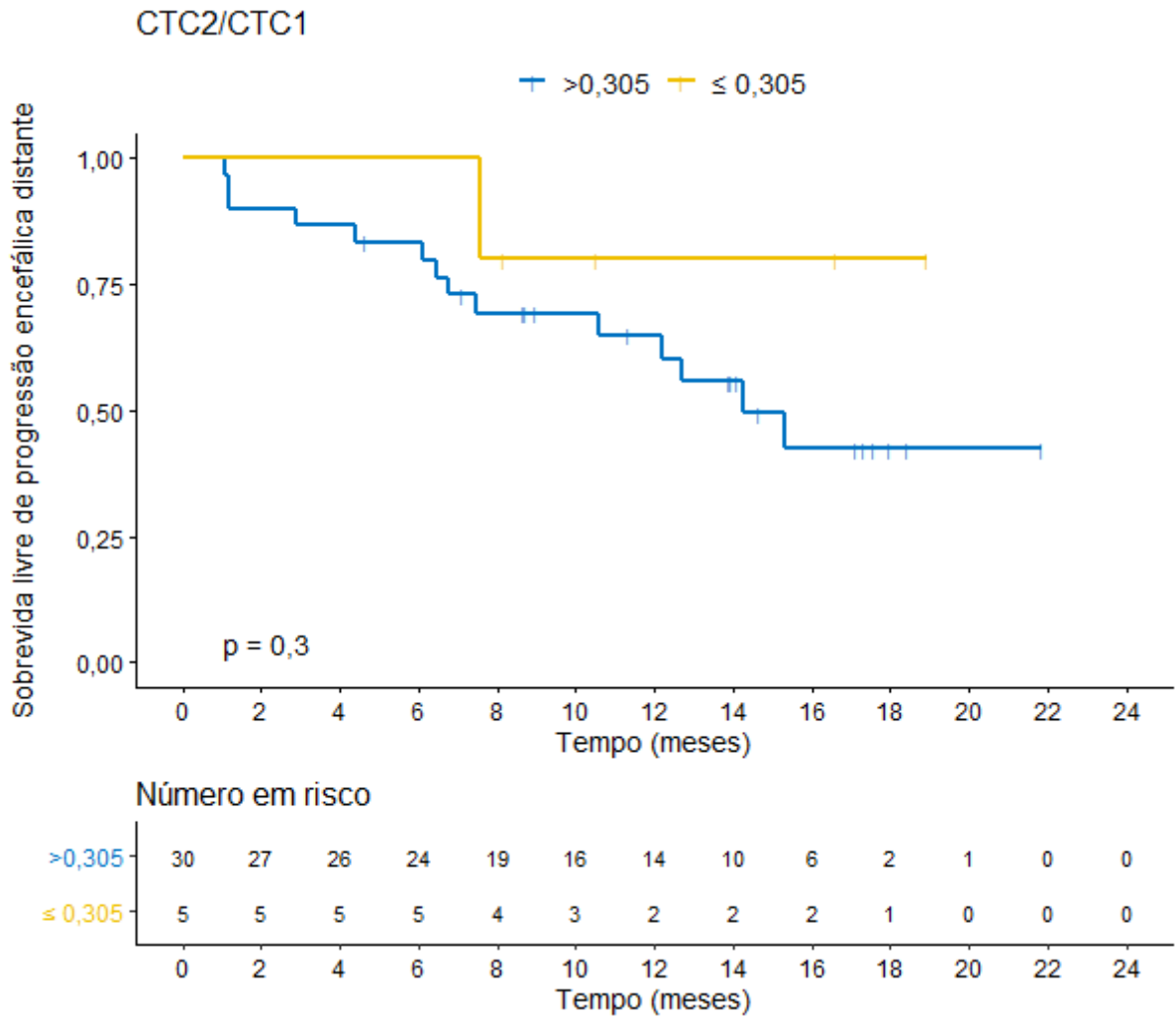


Figura 22 - SLPED atuarial estratificada por CTC2/CTC1 (\leq ou $>$ 0,3).

4.9 IMPACTO PROGNÓSTICO DA VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DE CTC1 E CTC2 (CINÉTICA DAS CTCs) NA SLPED-ED

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte da razão entre CTC2 e CTC1 para análise da correlação com SLPED. O valor do ponto de corte sugerido para CTC2/CTC1 foi 1,5 CTC/mL (Figura 23).

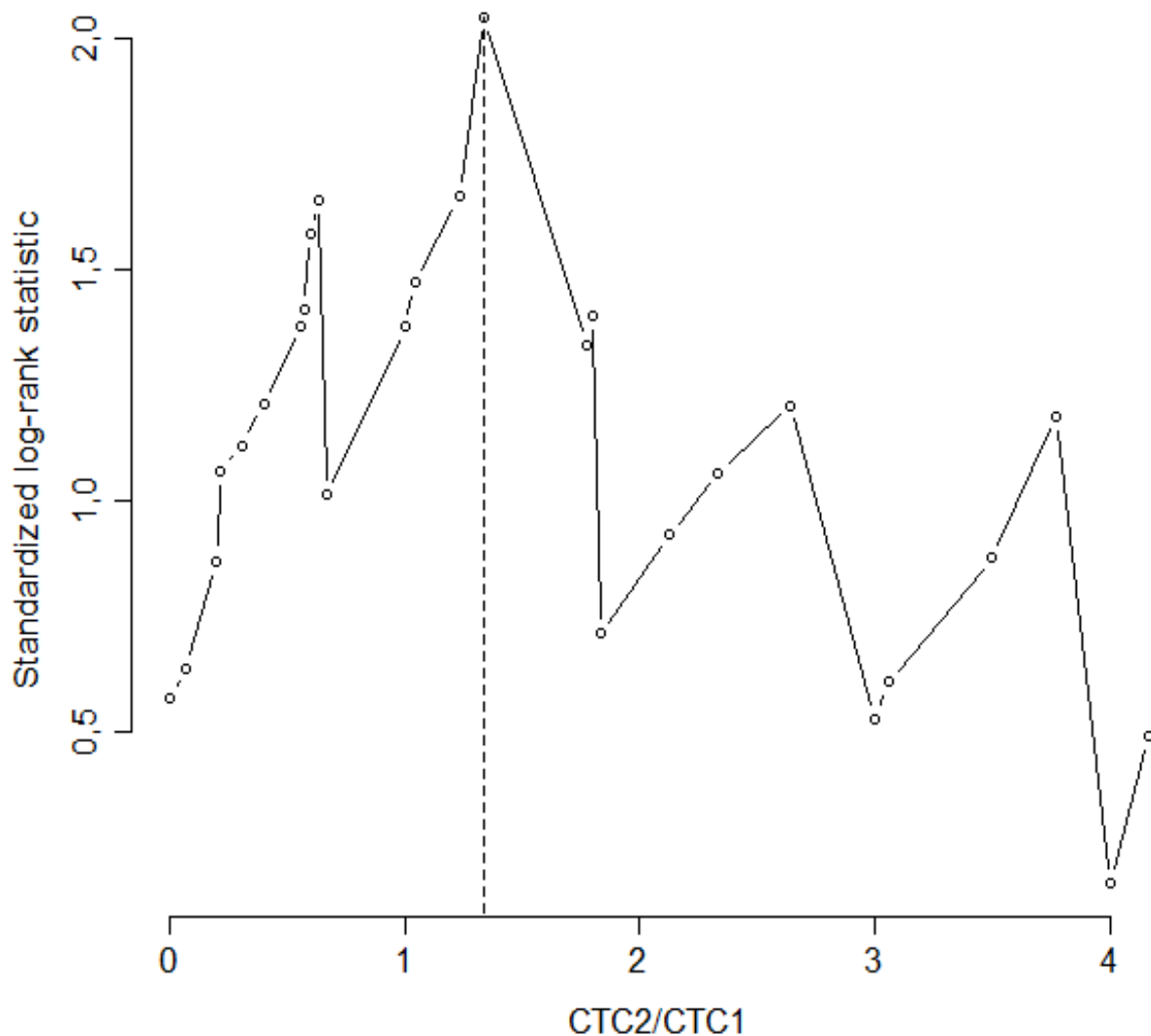


Figura 23 - Estimativa do ponto de corte para CTC2/CTC1 e SLPED-ED.

A SLPED-ED mediana não foi atingida nos dois grupos (HR = 6,95; IC95%:0,81–59,6; $p = 0,077$) (Figura 24).

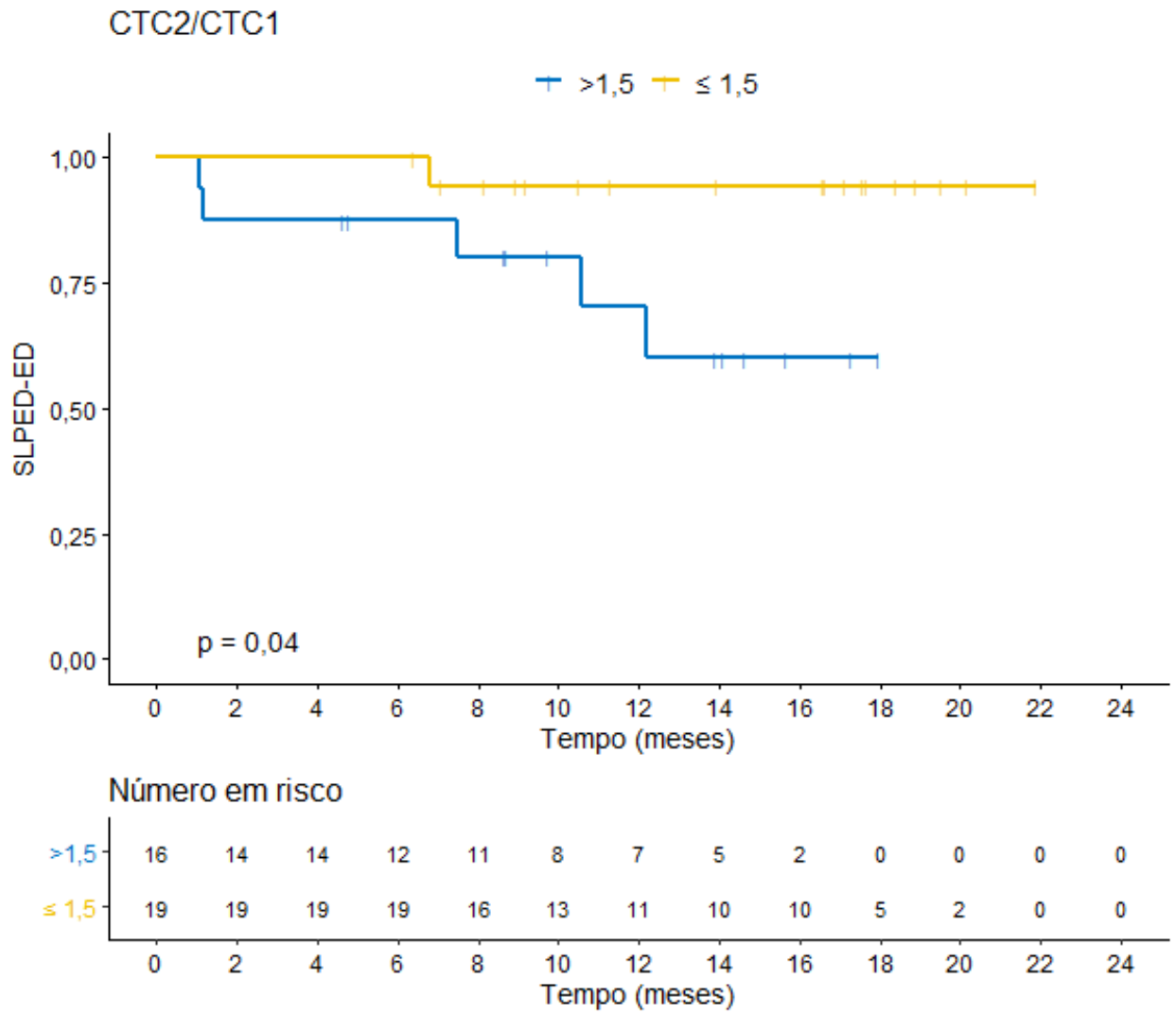


Figura 24 - SLPED-ED atuarial estratificada por CTC2/CTC1 (\leq ou $>$ 1,5 CTC/mL).

4.10 IMPACTO PROGNÓSTICO DA VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DE CTC1 E CTC2 (CINÉTICA DAS CTCs) NA SG

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte da razão entre CTC2 e CTC1 para análise da correlação com SG. O valor do ponto de corte sugerido para CTC2/CTC1 foi 0,3 CTC/mL (Figura 25).

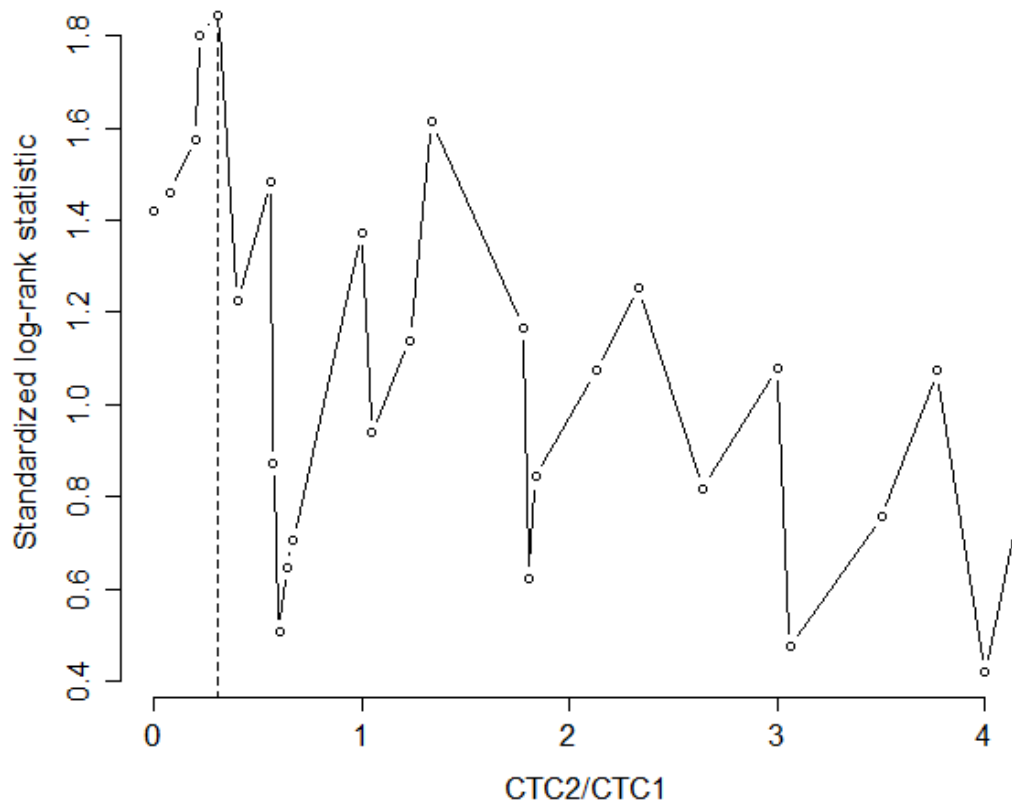


Figura 25 - Estimativa do ponto de corte para CTC2/CTC1 e SG.

A SG mediana não foi atingida nas pacientes com $CTC2/CTC1 \leq 0,3$ CTC/mL e foi 19,5 meses nas pacientes com $CTC1 > 0,3$ CTC/mL ($p = 0,1$; regressão de Cox não foi possível, pois não houve evento no grupo $CTC2/CTC1 \leq 0,3$ CTC/mL) (Figura 26).

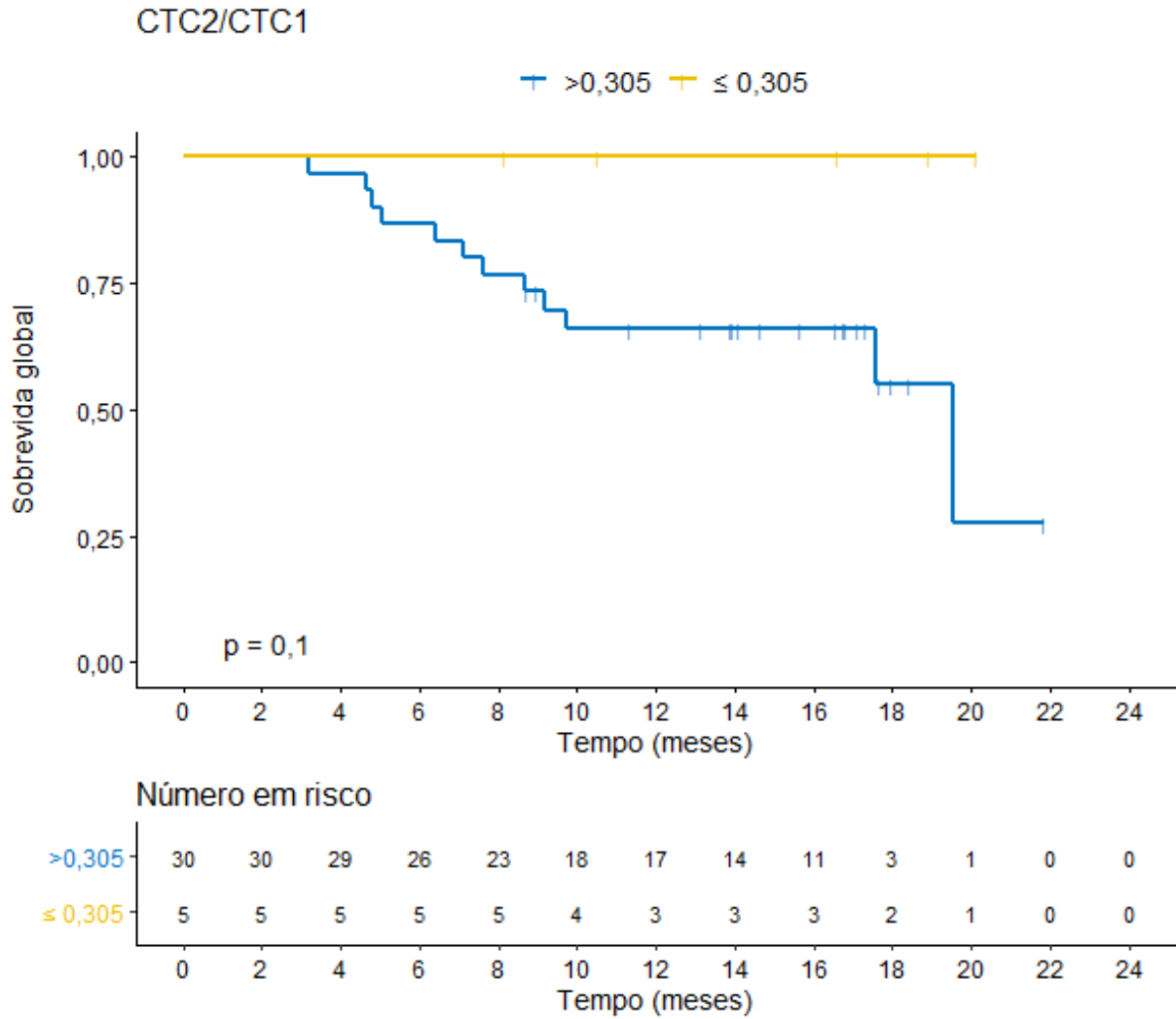


Figura 26 - SG atuarial estratificada por CTC1 (\leq ou $> 0,3$ CTC/mL).

4.11 IMPACTO PROGNÓSTICO DO IMUNOFENÓTIPO NA SLPED

A SLPED mediana foi 7 meses nas pacientes com imunofenótipo triplo negativo e não foi atingida nas pacientes com imunofenótipo luminal B (HR = 0,20; IC95%:0,04–0,94; p = 0,04) e HER2-positivo (HR = 0,25; IC95%:0,07–0,89; p = 0,03) no tumor primário (Figura 27).

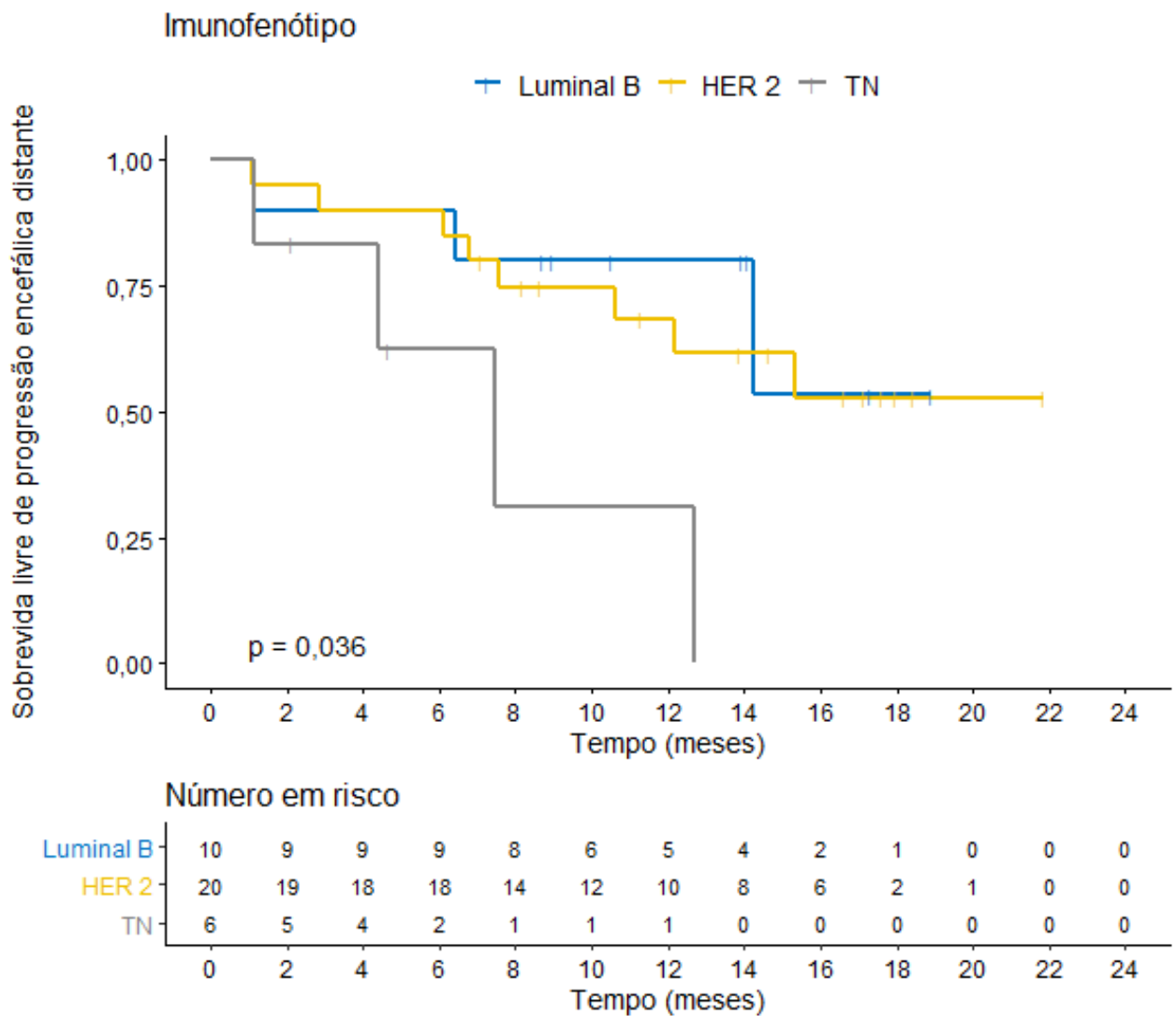


Figura 27 - SLPED atuarial estratificada pelo imunofenótipo.

4.12 IMPACTO PROGNÓSTICO DO IMUNOFENÓTIPO NA SLPED-ED

A SLPED-ED mediana não foi atingida nos três grupos. Não houve diferença significativa entre nas pacientes com imunofenótipo triplo negativo e luminal B (HR = 0,377; IC95%:0,023–6,15; p = 0,49) e HER2 -positivo (HR = 0,71; IC95%:0,076–6,62; p = 0,76) no tumor primário (Figura 28).

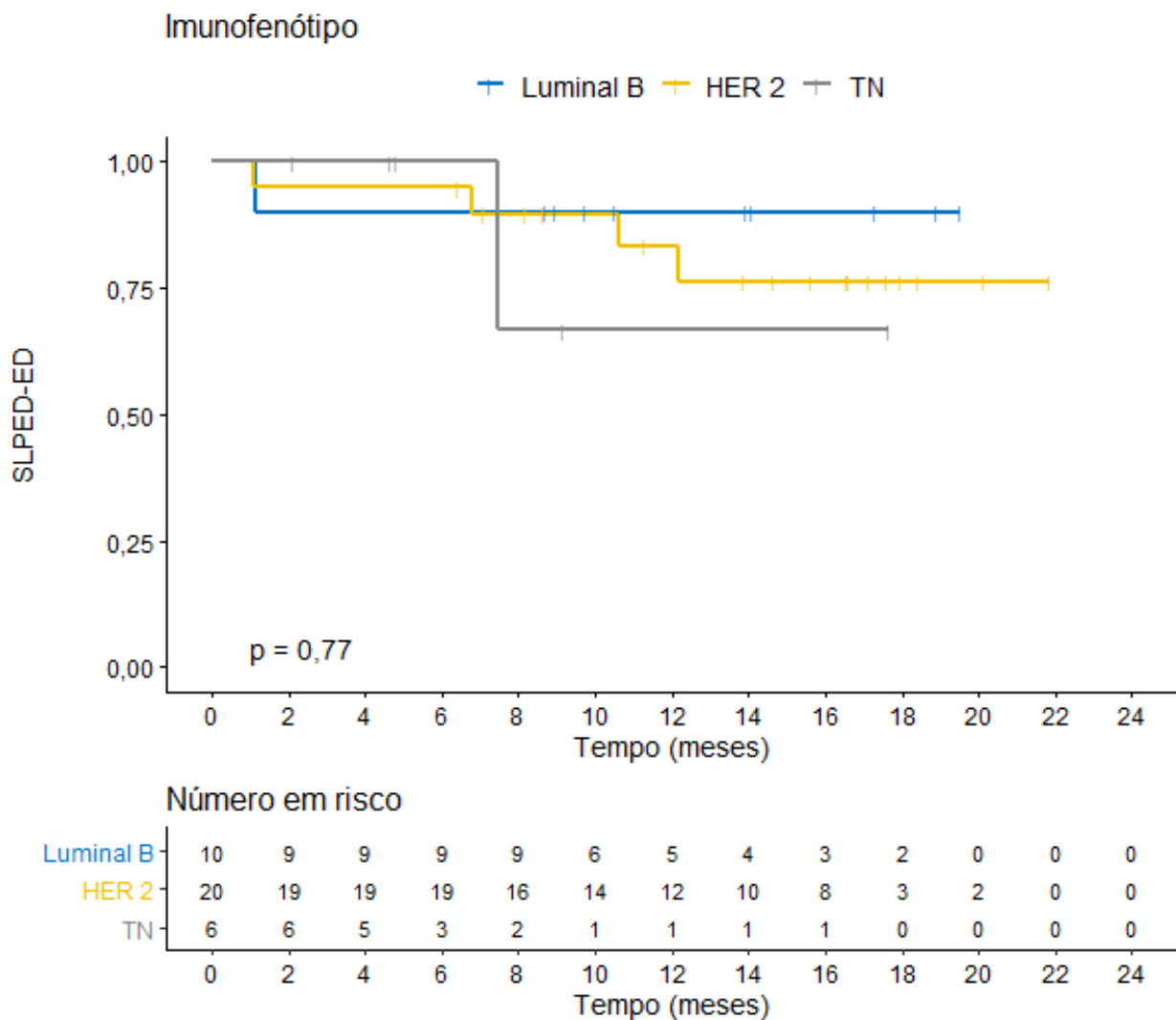


Figura 28 - SLPED-ED atuarial estratificada pelo imunofenótipo.

4.13 IMPACTO PROGNÓSTICO DO IMUNOFENÓTIPO NA SG

A SG mediana foi 4,8 meses nas pacientes com imunofenótipo triplo negativo e não foi atingida nas pacientes com imunofenótipo luminal B (HR = 0,29; IC95%:0,08–1,0; p = 0,05) e HER2-positivo (HR = 0,15; IC95%:0,04–0,5; p = 0,002) no tumor primário (Figura 29).

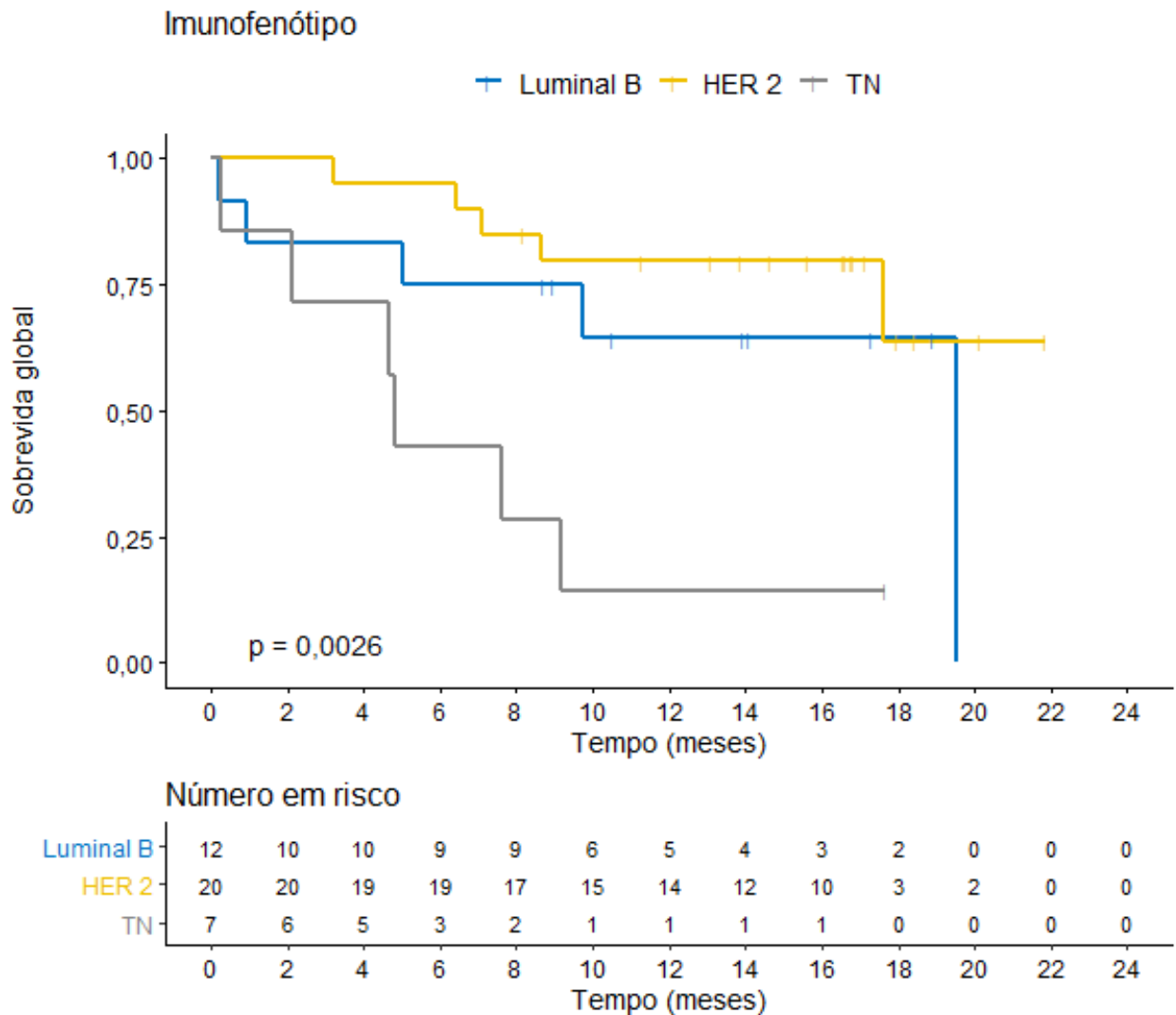


Figura 29 - SG atuarial estratificada pelo imunofenótipo.

4.14 IMPACTO PROGNÓSTICO DO DS-GPA NA SLPED

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte do DS-GPA para análise da correlação com SLPED. O valor do ponto de corte sugerido foi 3 (Figura 30).

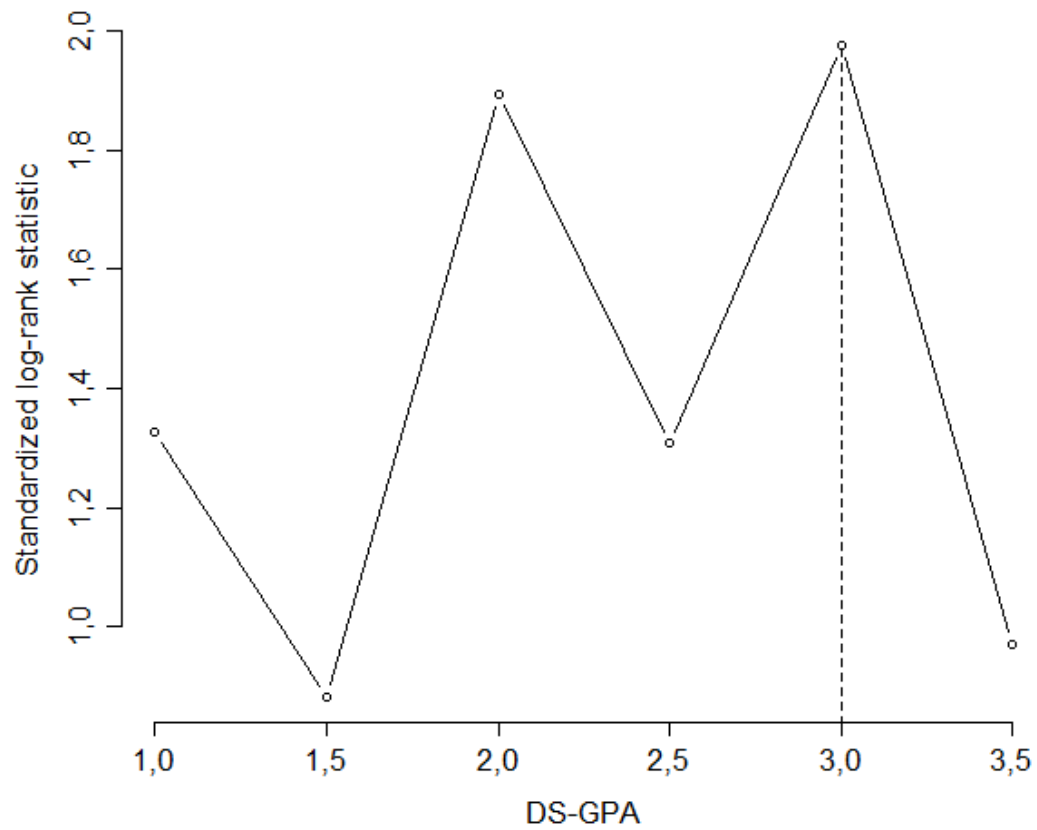


Figura 30 - Estimativa do ponto de corte para DS-GPA e SLPED.

A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com DS-GPA > 3 e foi 7,47 meses nas pacientes com DS-GPA \leq 3 (HR = 0,34; IC95%:0,12–0,95; p = 0,04) (Figura 31).

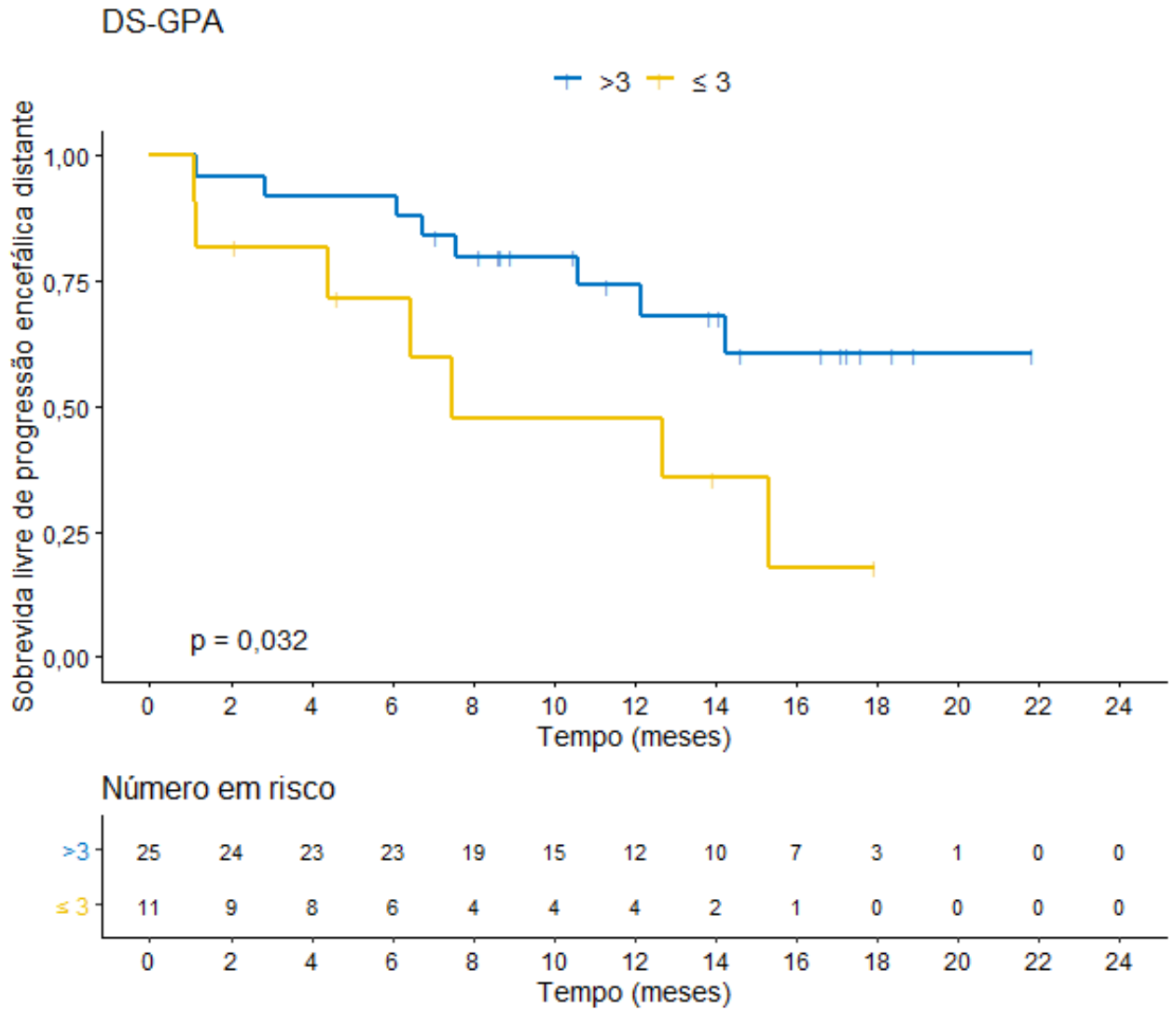


Figura 31 - SLPED atuarial estratificada pelo DS-GPA (\leq ou $>$ 3).

4.15 IMPACTO PROGNÓSTICO DO DS-GPA NA SLPED-ED

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte do DS-GPA para análise da correlação com SLPED-ED. O valor do ponto de corte sugerido foi 3,5 (Figura 32).

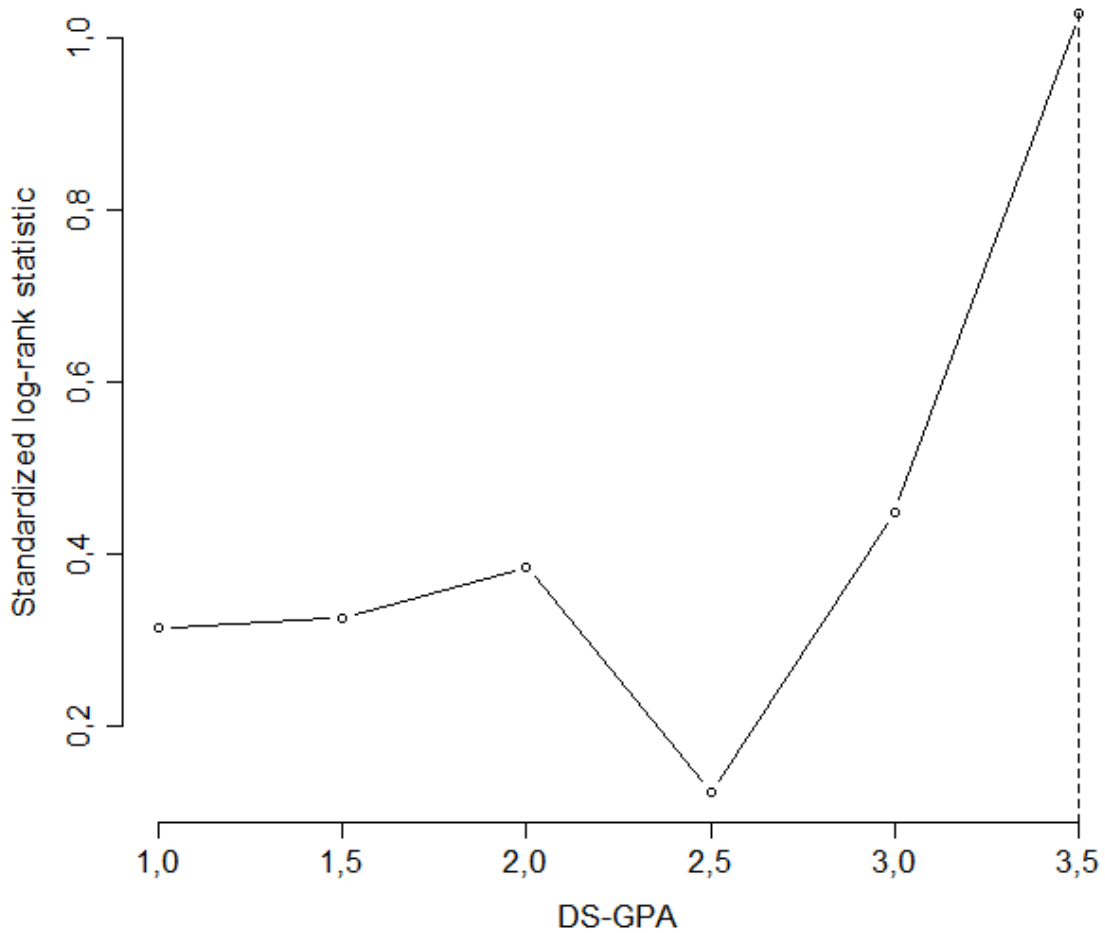


Figura 32 - Análise do valor do ponto de corte para DS-GPA e SLPED-ED.

A SLPED-ED mediana não foi atingida nos dois grupos ($p = 0,37$; regressão de Cox não foi possível, pois não houve evento no grupo DS-GPA $> 3,5$) (Figura 33).

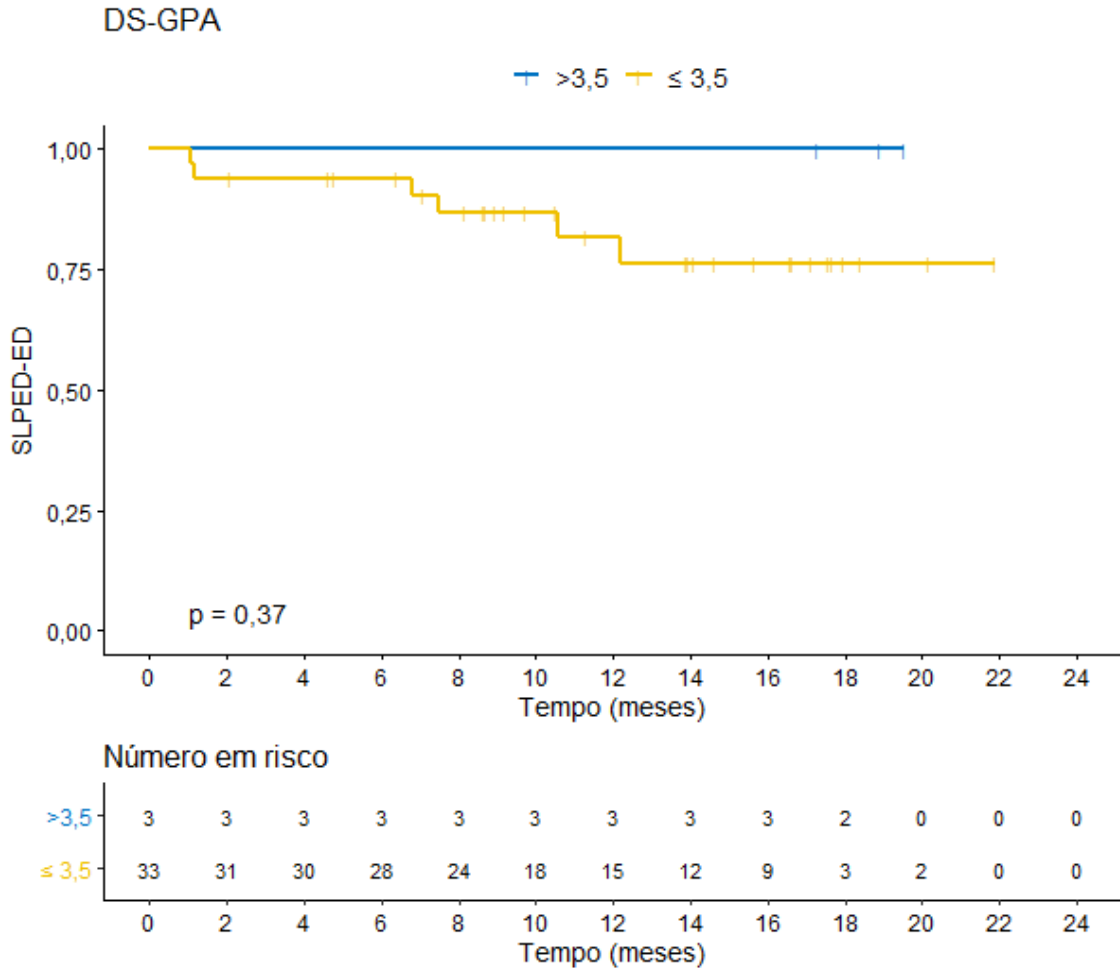


Figura 33 – SLPED-ED atuarial estratificada pelo DS-GPA (\leq ou $> 3,5$).

4.16 IMPACTO PROGNÓSTICO DO DS-GPA NA SG

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte do DS-GPA para análise da correlação com SG. O valor do ponto de corte sugerido foi 2 (Figura 34).

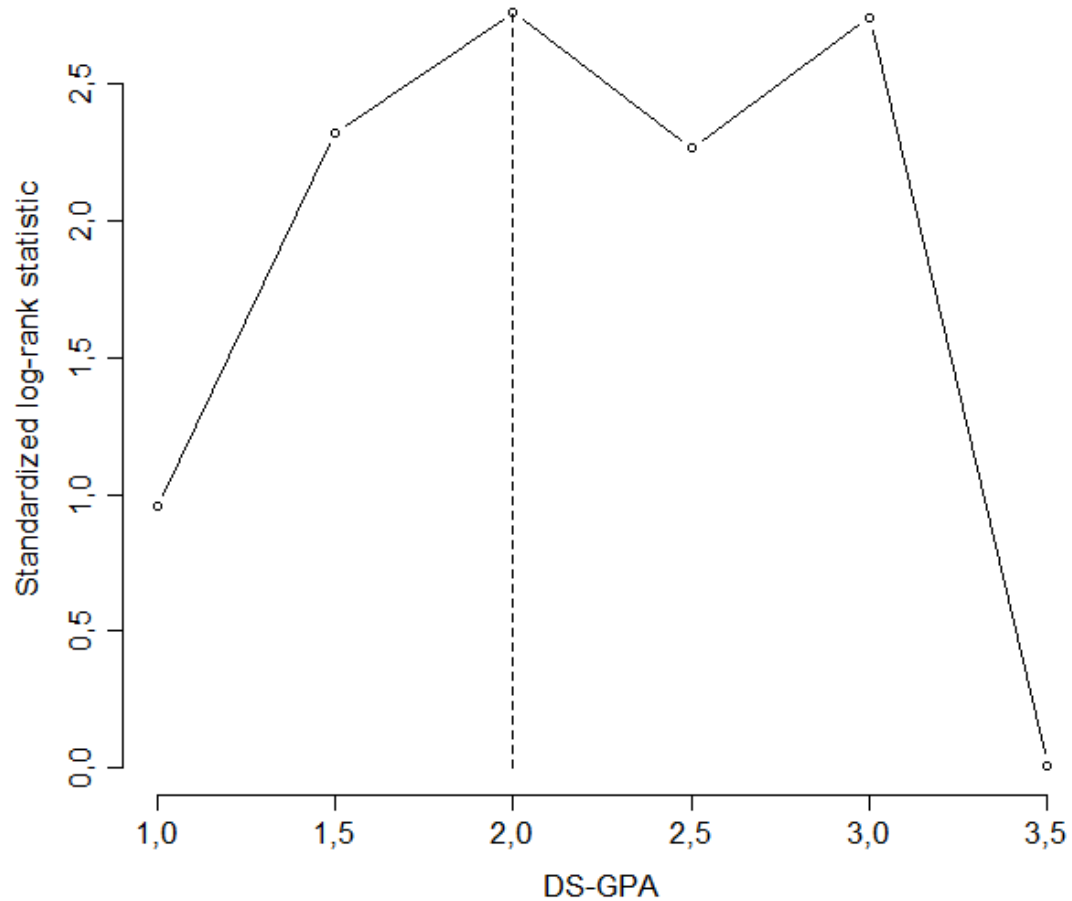


Figura 34 - Estimativa do ponto de corte para DS-GPA e SG.

A SG mediana foi 19,54 meses nas pacientes com DS-GPA > 2 e 7,6 meses nas pacientes com DS-GPA ≤ 2 (HR = 0,23; IC95%: 0,08–0,65; $p = 0,006$) (Figura 35).

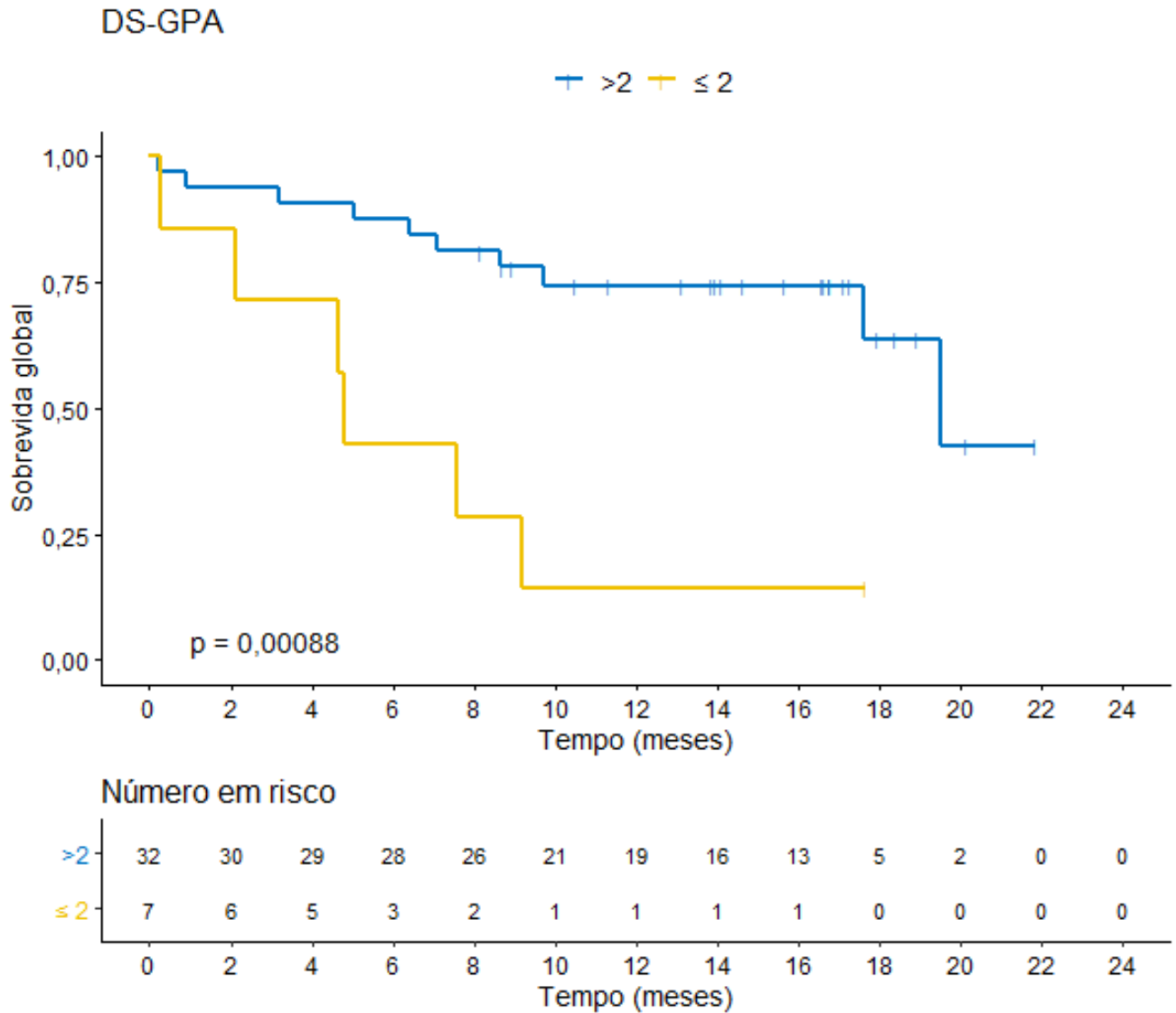


Figura 35 - SG atuarial estratificada pelo DS-GPA (\leq ou > 2).

4.17 IMPACTO PROGNÓSTICO DO NÚMERO DE METÁSTASES ENCEFÁLICAS NA SLPED

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte do número de metástases encefálicas para análise da correlação com SLPED. O valor do ponto de corte sugerido foi 5 lesões (Figura 36).

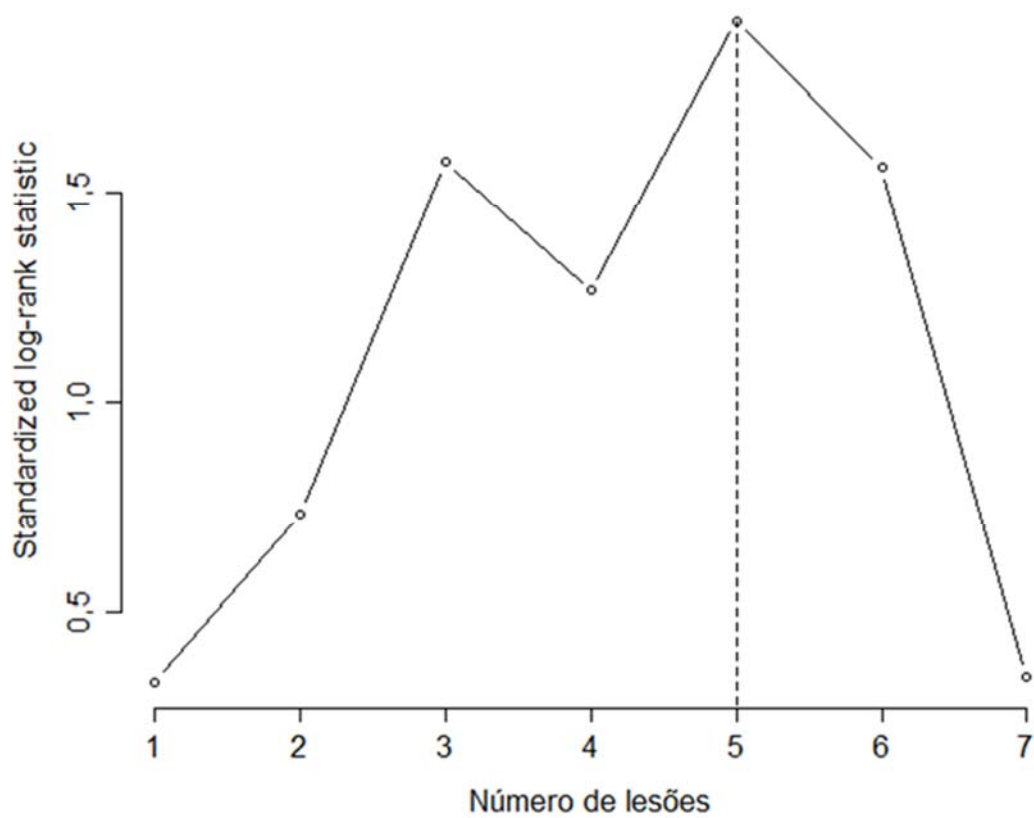


Figura 36 - Estimativa do ponto de corte para número de metástases encefálicas e SLPED.

A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com ≤ 5 lesões e foi 10,6 meses nas pacientes com > 5 lesões (HR = 3,60; IC95%:1,08–12,05; $p = 0,037$) (Figura 37).

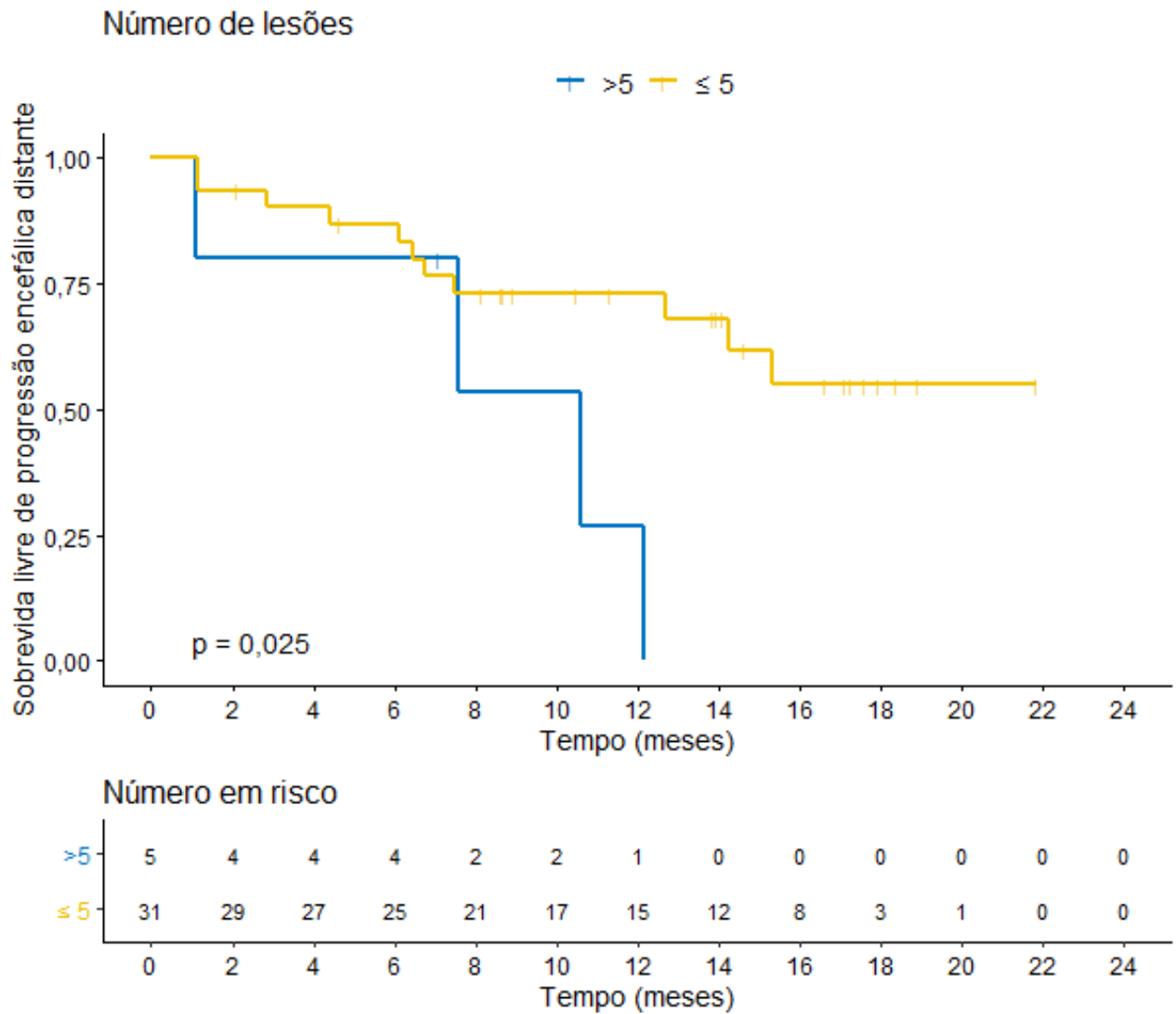


Figura 37 - SLPED atuarial estratificada pelo número de metástases encefálicas (\leq ou > 5).

4.18 IMPACTO PROGNÓSTICO DO NÚMERO DE METÁSTASES ENCEFÁLICAS NA SLPED-ED

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte do número de metástases encefálicas para análise da correlação com SLPED. O valor do ponto de corte sugerido foi 6 lesões (Figura 38).

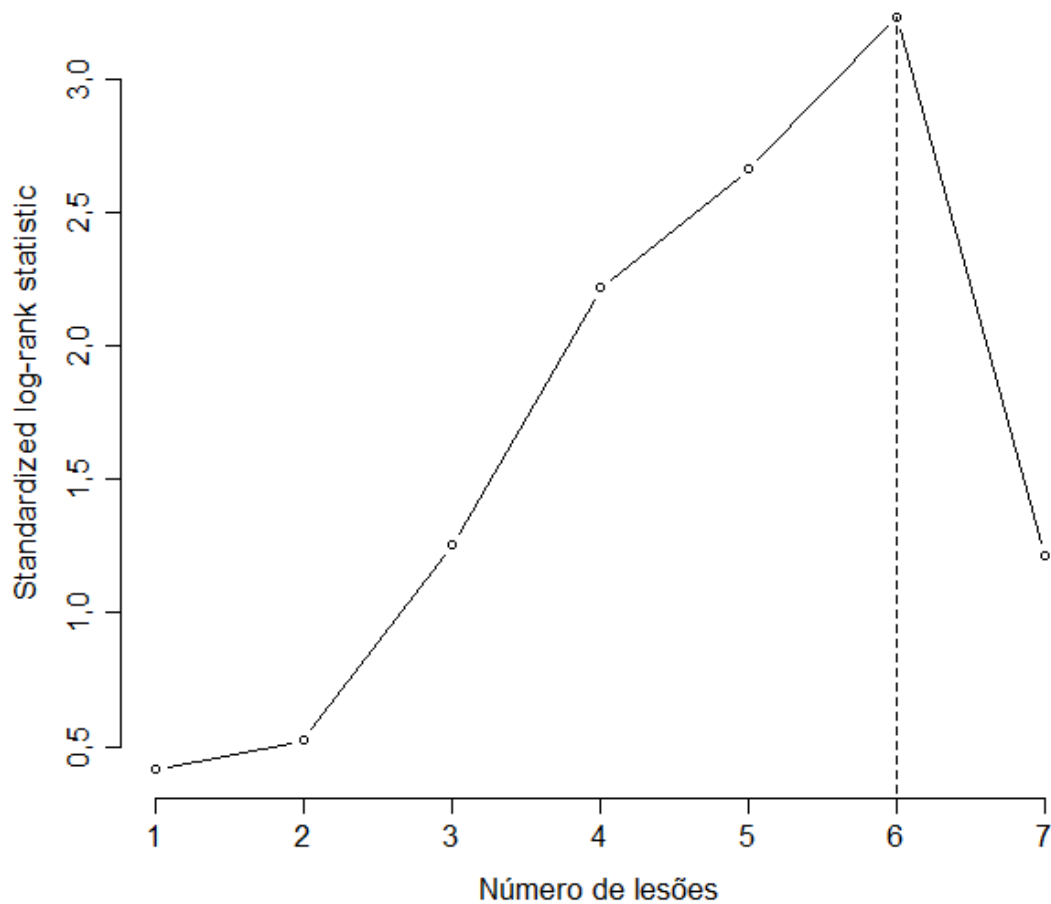


Figura 38 - Análise do valor do ponto de corte para número de metástases encefálicas e SLPED-ED.

A SLPED-ED mediana não foi atingida nas pacientes com ≤ 6 lesões e foi 10,6 meses nas pacientes com > 6 lesões (HR = 10,72; IC95%:2,13–53,82; p = 0,004) (Figura 39).

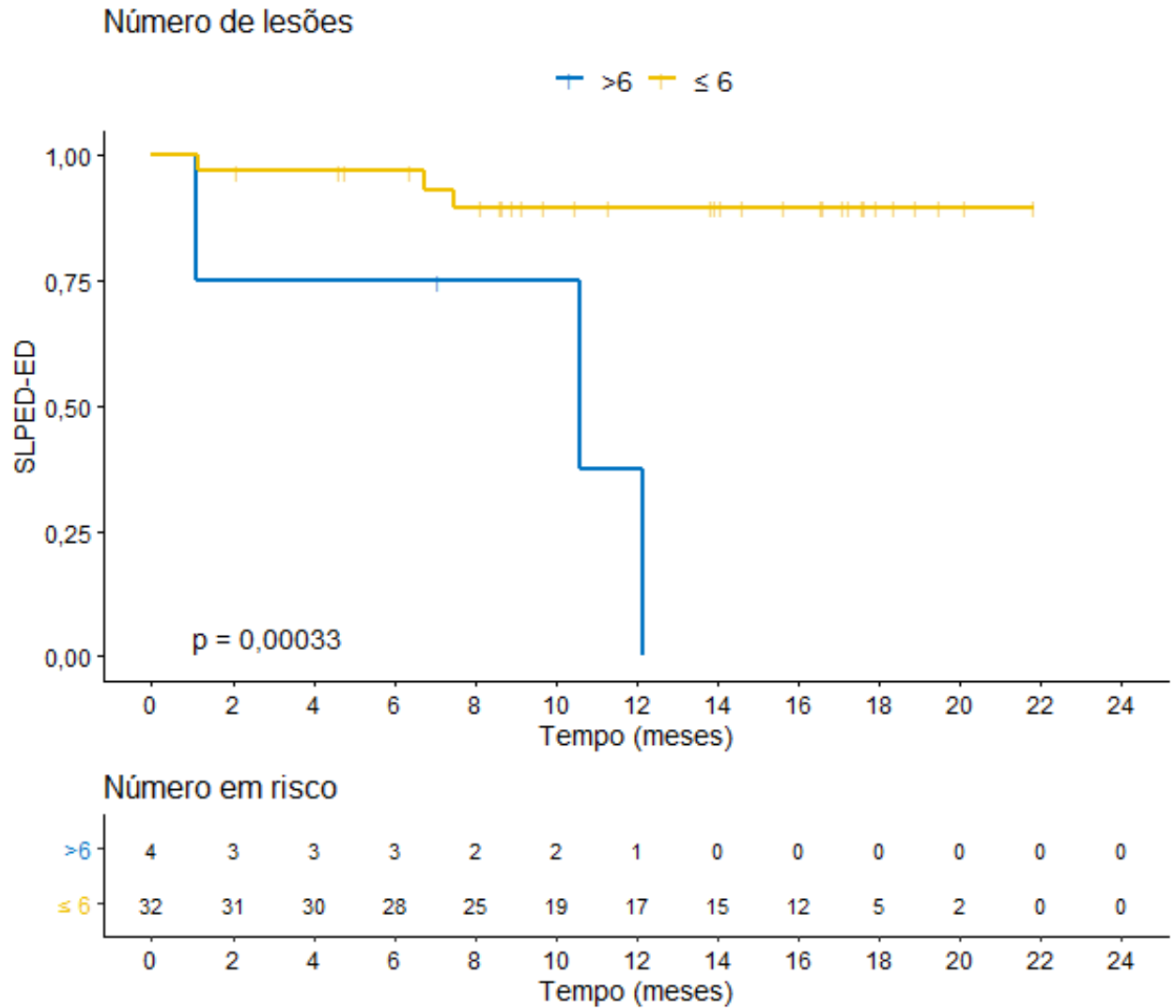


Figura 39 - SLPED atuarial estratificada pelo número de metástases encefálicas (\leq ou > 6).

4.19 IMPACTO PROGNÓSTICO DO NÚMERO DE METÁSTASES ENCEFÁLICAS NA SG

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos de corte do número de metástases encefálicas para análise da correlação com SG. O valor do ponto de corte sugerido foi 3 lesões (Figura 40).

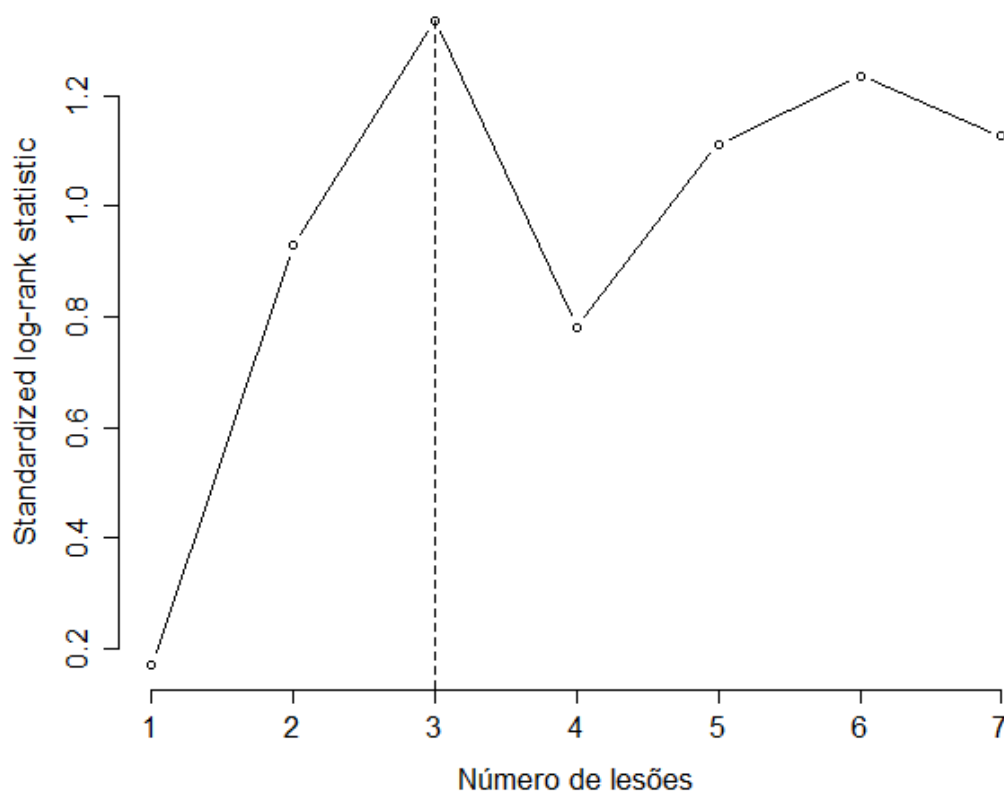


Figura 40 - Estimativa do ponto de corte para número de metástases encefálicas e SG.

A SG mediana não foi atingida nas pacientes com ≤ 3 lesões e foi 8,65 meses nas pacientes com > 3 lesões (HR = 2; IC95%:0,73–5,55; p = 0,178) (Figura 41).

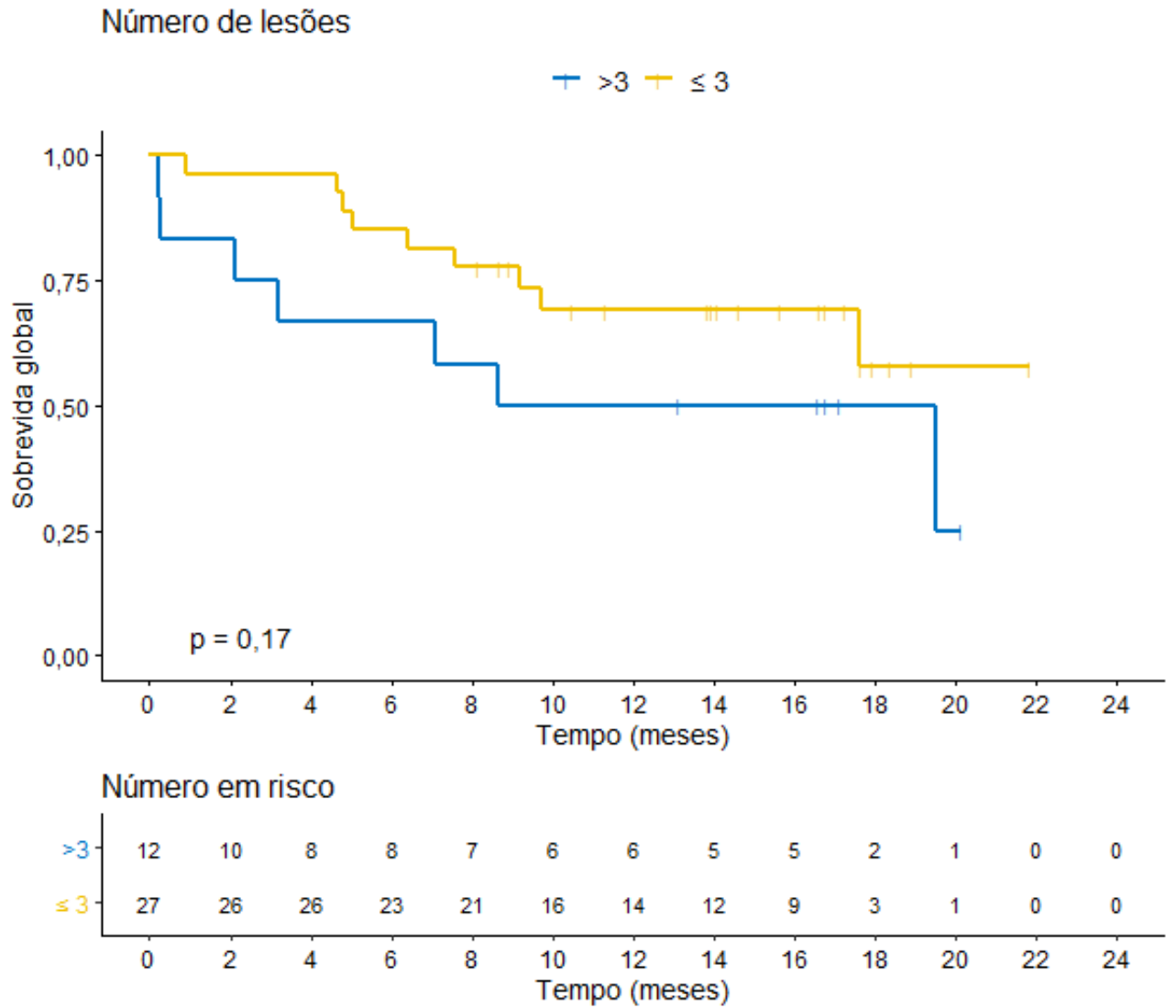


Figura 41 - SG atuarial estratificada pelo número de metástases encefálicas (\leq ou > 3).

4.20 IMPACTO PROGNÓSTICO DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE LESÕES E CTC1 OU CTC2 NA SLPED

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos da relação entre o número de lesões e CTC1 (NL/CTC1) para análise da correlação com SLPED. O valor do ponto de corte sugerido foi 2 (Figura 42).

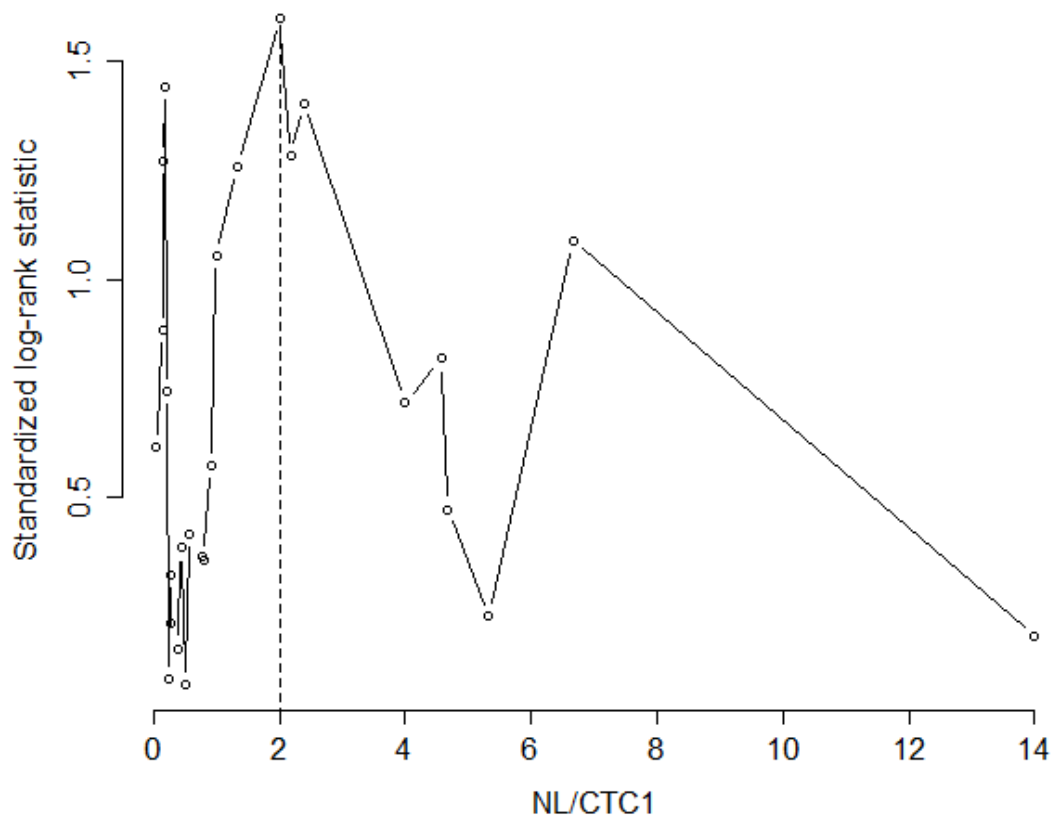


Figura 42 - Estimativa do ponto de corte para NL/CTC1 e SLPED.

A SLPED mediana foi 10,59 meses nas pacientes com NL/CTC1 > 2 e 15,33 meses nas pacientes com NL/CTC1 ≤ 2 (HR = 2,6; IC95%:0,93–7,29; p = 0,067) (Figura 43).

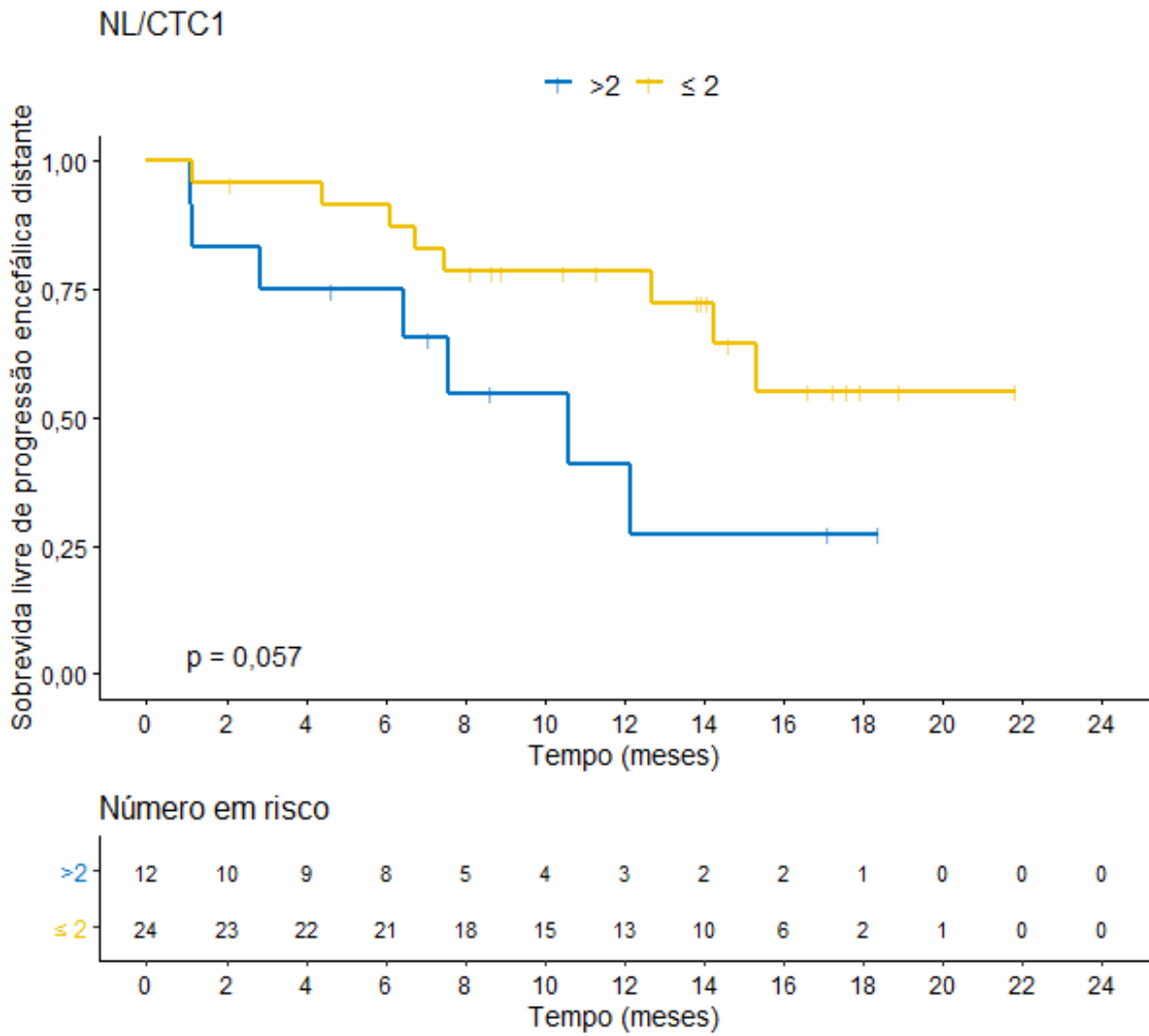


Figura 43 - SLPED atuarial estratificada por NL/CTC1 (≤ ou > 2).

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos da relação entre o número de lesões e CTC2 (NL/CTC2) para análise da correlação com SLPED. O valor do ponto de corte sugerido foi 0,1 (Figura 44).

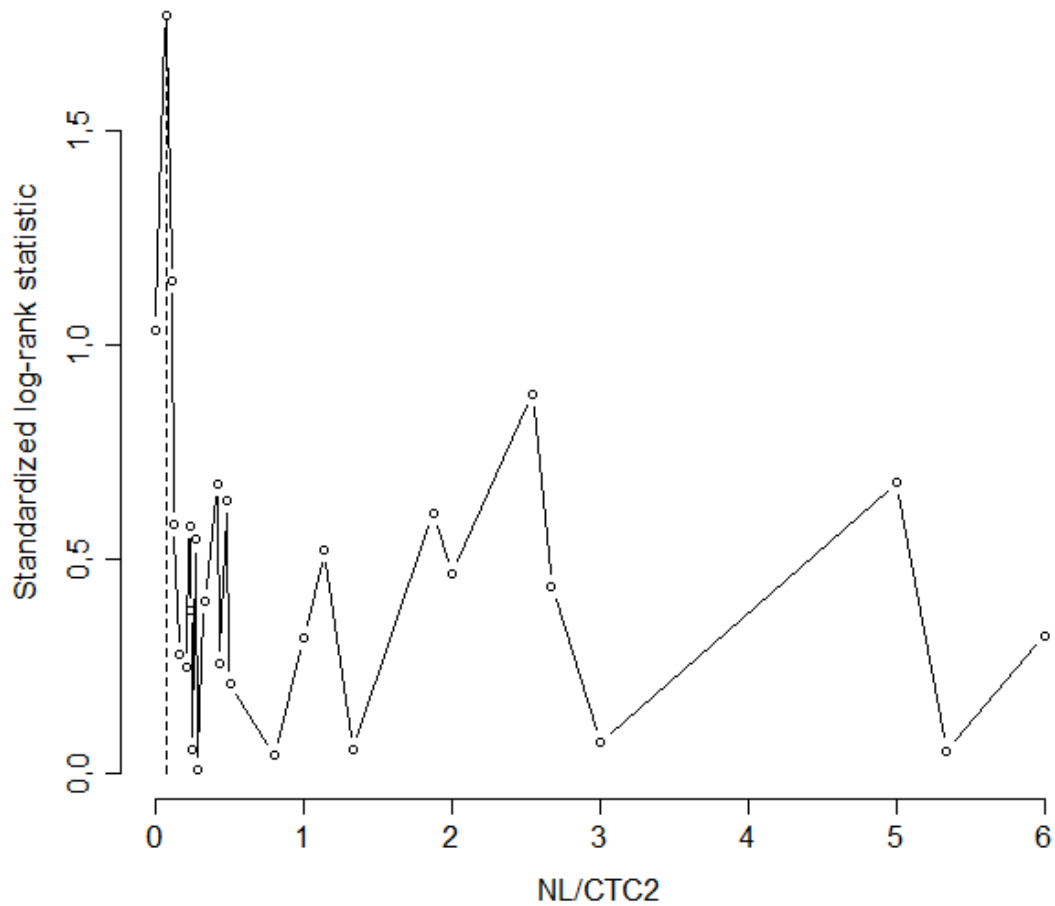


Figura 44 - Estimativa do ponto de corte para NL/CTC2 e SLPED.

A SLPED mediana foi não foi atingida nas pacientes com $NL/CTC2 > 0,1$ e foi 1,8 meses nas pacientes com $NL/CTC2 \leq 0,1$ (HR = 0,17; IC95%:0,036–0,81; $p = 0,026$) (Figura 45).

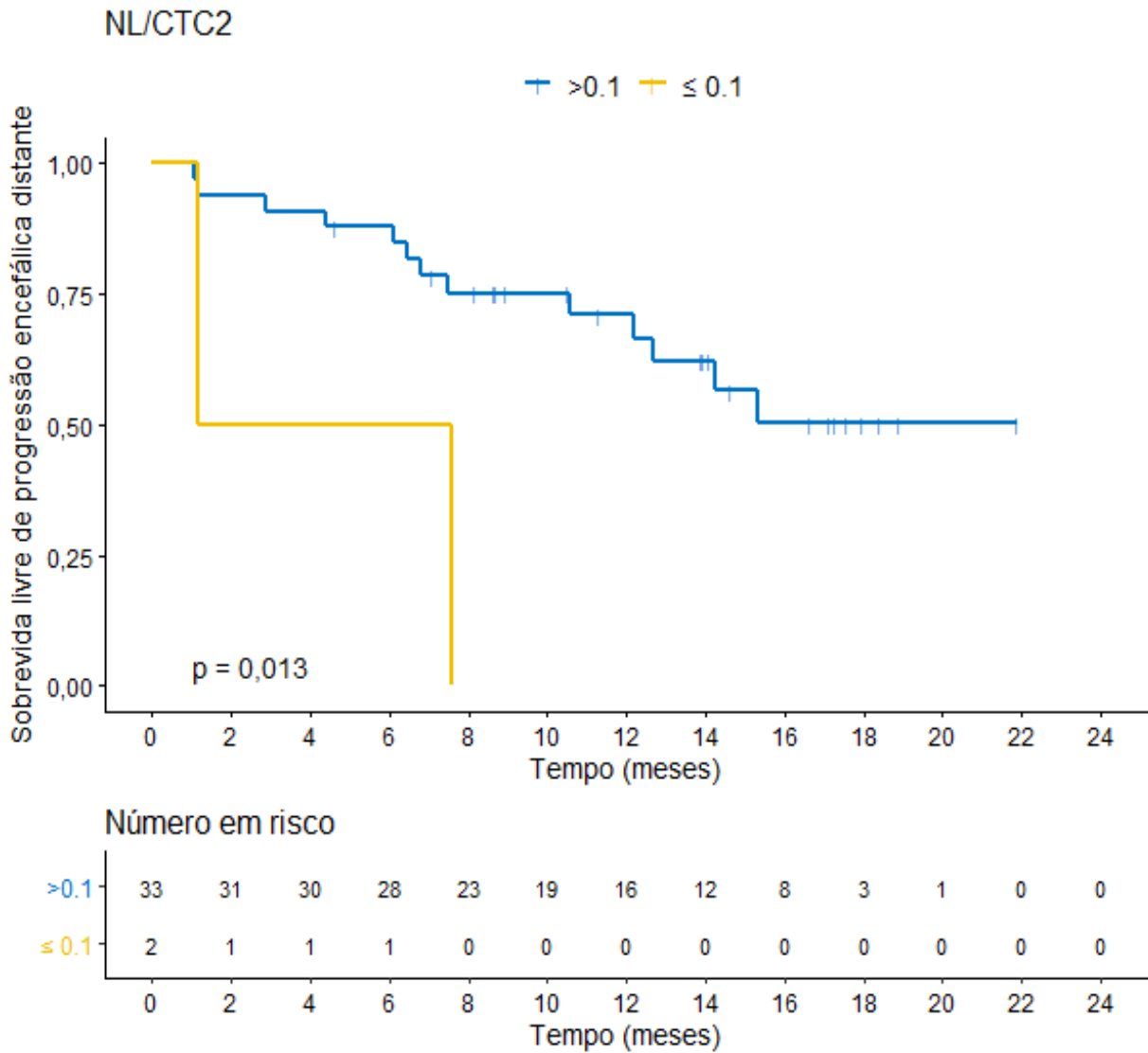


Figura 45 - SLPED atuarial estratificada por NL/CTC2 (\leq ou $>$ 0,1).

4.21 IMPACTO PROGNÓSTICO DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE LESÕES E CTC1 OU CTC2 NA SLPED-ED

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos da relação entre o número de lesões e CTC1 (NL/CTC1) para análise da correlação com SLPED-ED. O valor do ponto de corte sugerido foi 6,8 (Figura 46).

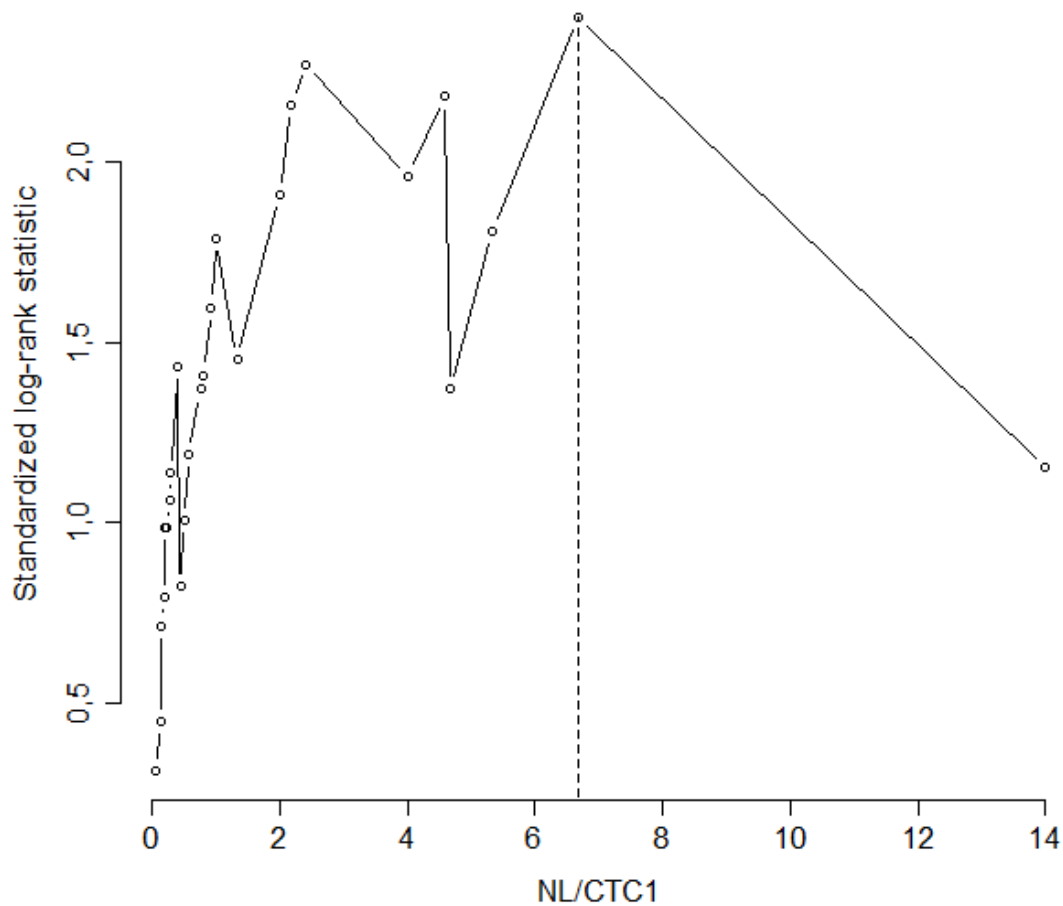


Figura 46 - Estimativa do ponto de corte para NL/CTC1 e SLPED-ED.

A SLPED-ED mediana foi 12,1 meses nas pacientes com NL/CTC1 > 6,8 e não foi atingida nas pacientes com NL/CTC1 \leq 6,8 (HR = 7,37; IC95%:1,34–40,5; p = 0,022) (Figura 47).

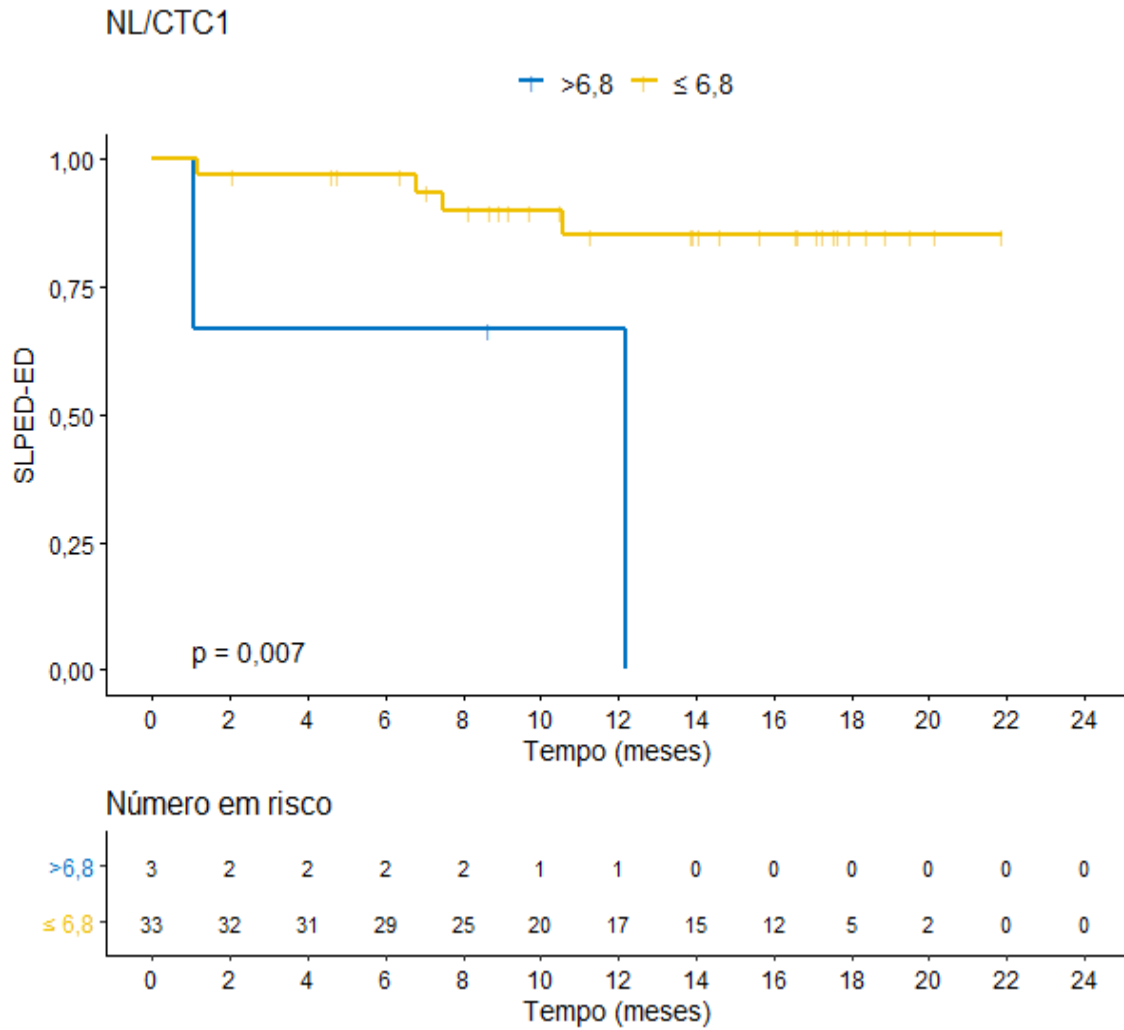


Figura 47 - SLPED-PD atuarial estratificada por NL/CTC1 (\leq ou > 6,8).

A incidência cumulativa de progressão encefálica distante com envolvimento difuso (PED-ED) aos 6 meses, tendo o óbito como risco competitivo, foi de 25% nas pacientes com $NL/CTC1 > 6,8$ e 2,86% nas pacientes com $NL/CTC1 \leq 6,8$, com tendência à significância estatística ($p = 0,063$) (Figura 48).

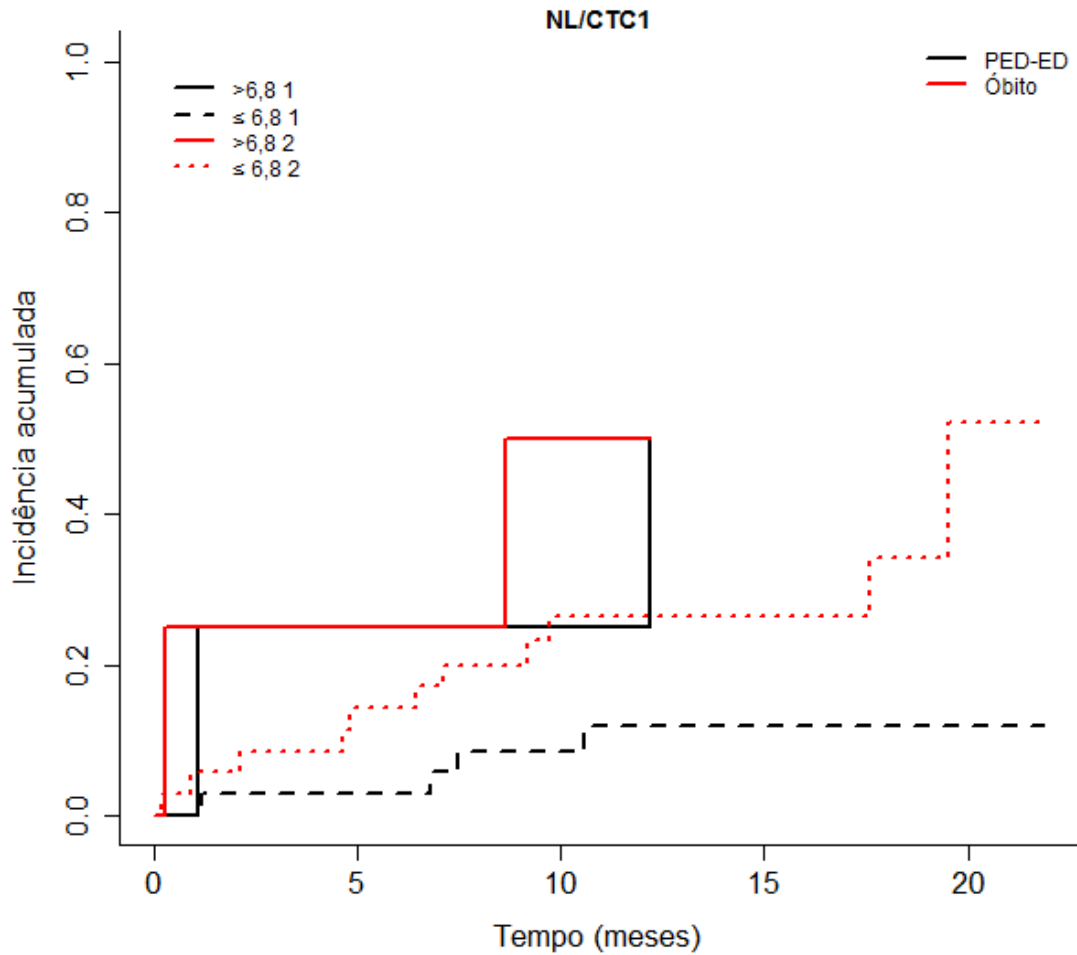


Figura 48 - Incidências cumulativas de PED-ED e óbito estratificadas por NL/CTC1 (\leq ou $>$ 6,8).

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos da relação entre o número de lesões e CTC2 (NL/CTC2) para análise da correlação com SLPED-ED. O valor do ponto de corte sugerido foi 0,8 (Figura 49).

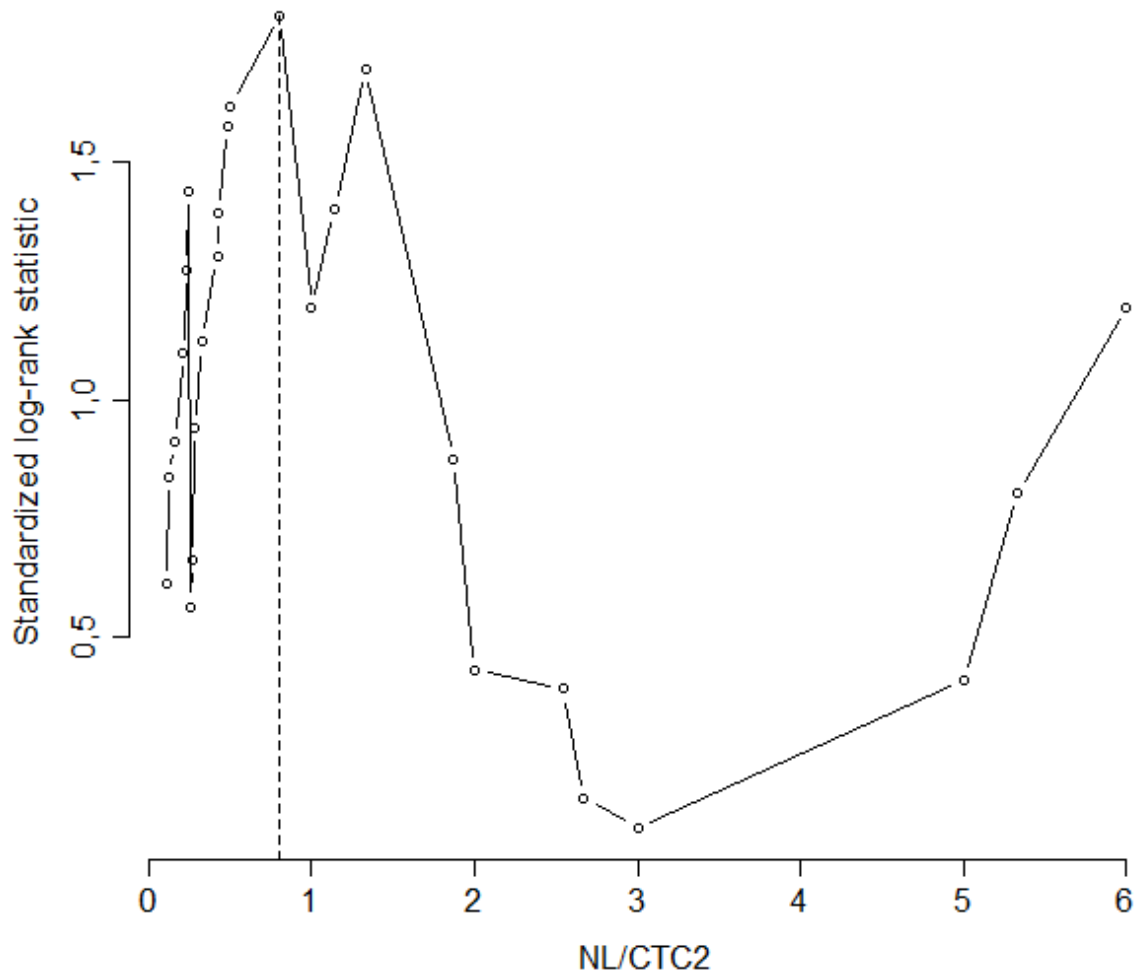


Figura 49 - Estimativa do ponto de corte para NL/CTC2 e SLPED-ED.

A SLPED-ED não foi atingida nos dois grupos (HR = 5,75; IC95%:0,67–49,28; p = 0,11) (Figura 50).

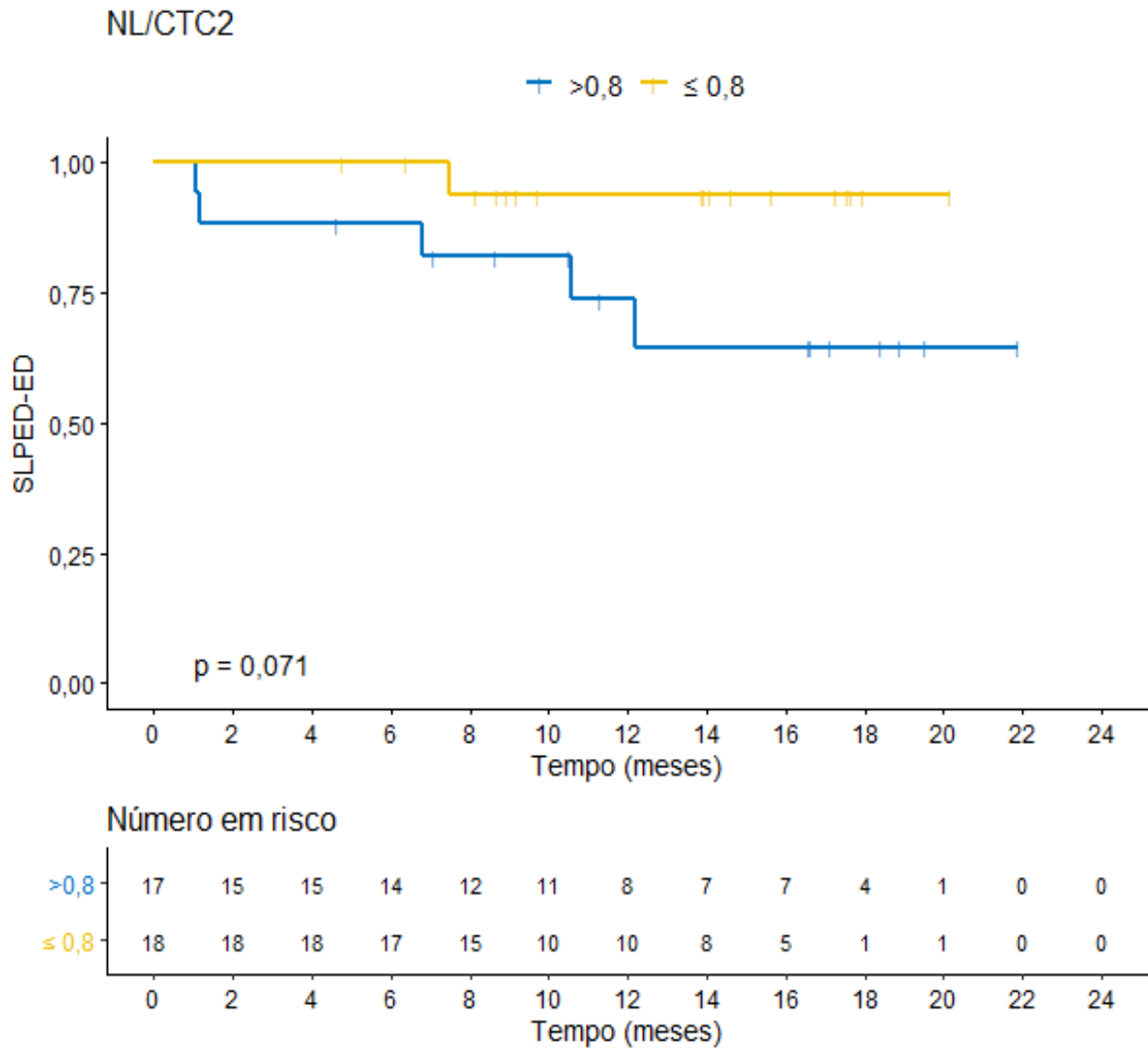


Figura 50 - SLPED-PD atuarial estratificada por NL/CTC1 (\leq ou $>$ 0,8).

4.22 IMPACTO PROGNÓSTICO DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE LESÕES E CTC1 OU CTC2 NA SG

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos da relação entre o número de lesões e CTC1 (NL/CTC1) para análise da correlação com SG. O valor do ponto de corte sugerido foi 2,2 (Figura 51).

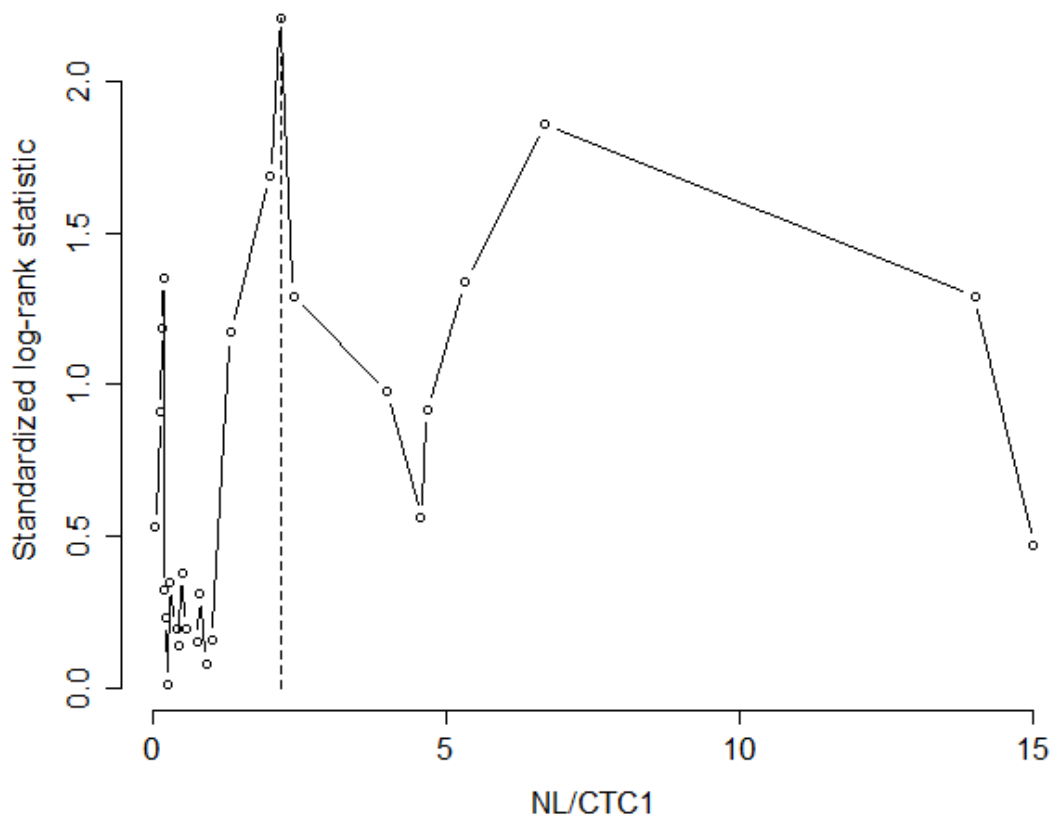


Figura 51 -: Estimativa do ponto de corte para NL/CTC1 e SG.

A SG mediana foi 8,65 meses nas pacientes com NL/CTC1 > 2,2 e 19,54 meses nas pacientes com NL/CTC1 ≤ 2,2 (HR = 3,32; IC95%:1,19–9,26; p = 0,02) (Figura 52).

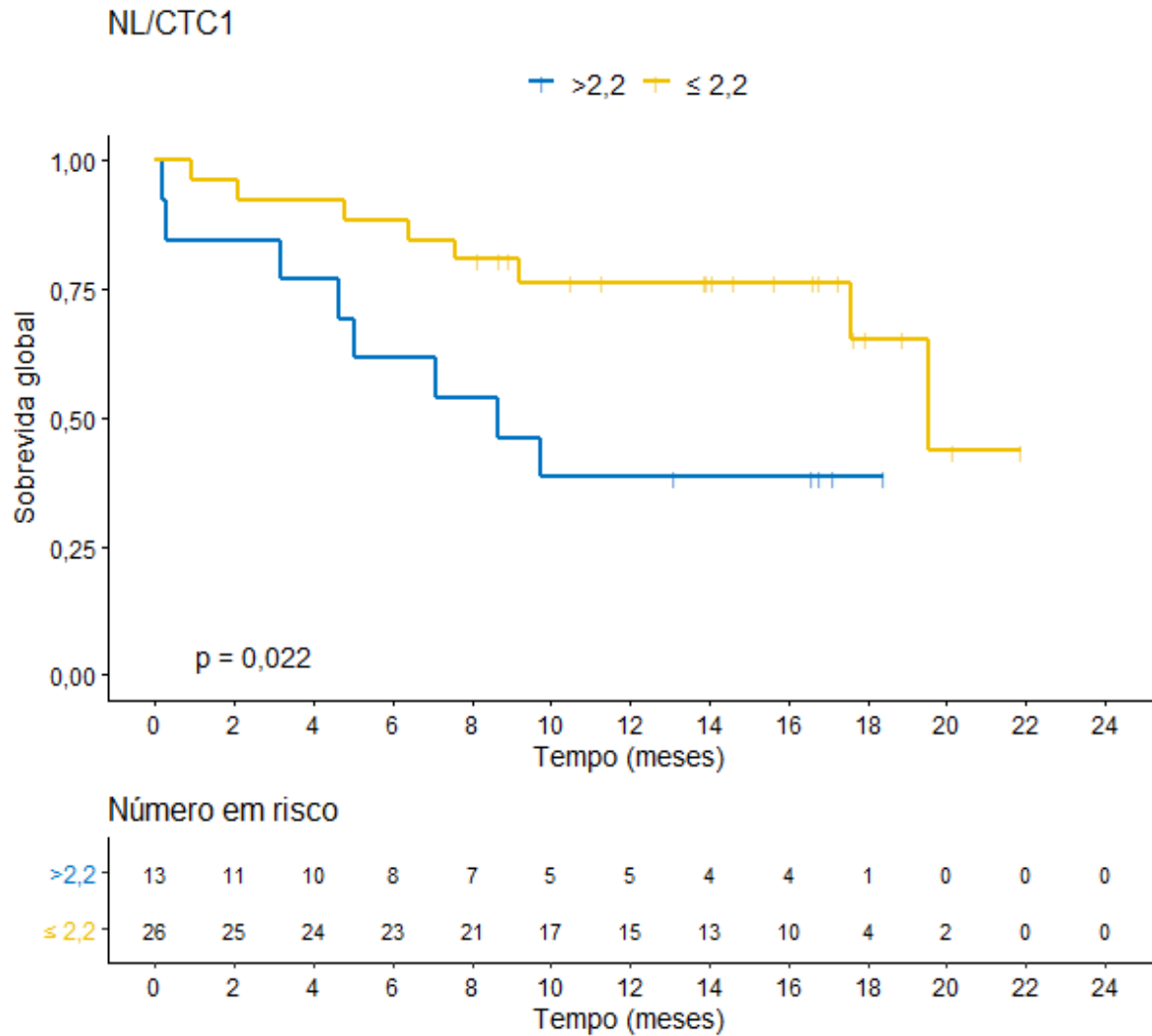


Figura 52 - SG atuarial estratificada por NL/CTC1 (≤ ou > 2,2).

A partir do teste de Lausen e Schumacher, foram estimados os pontos da relação entre o número de lesões e CTC2 (NL/CTC2) para análise da correlação com SG. O valor do ponto de corte sugerido foi 0 (Figura 53).

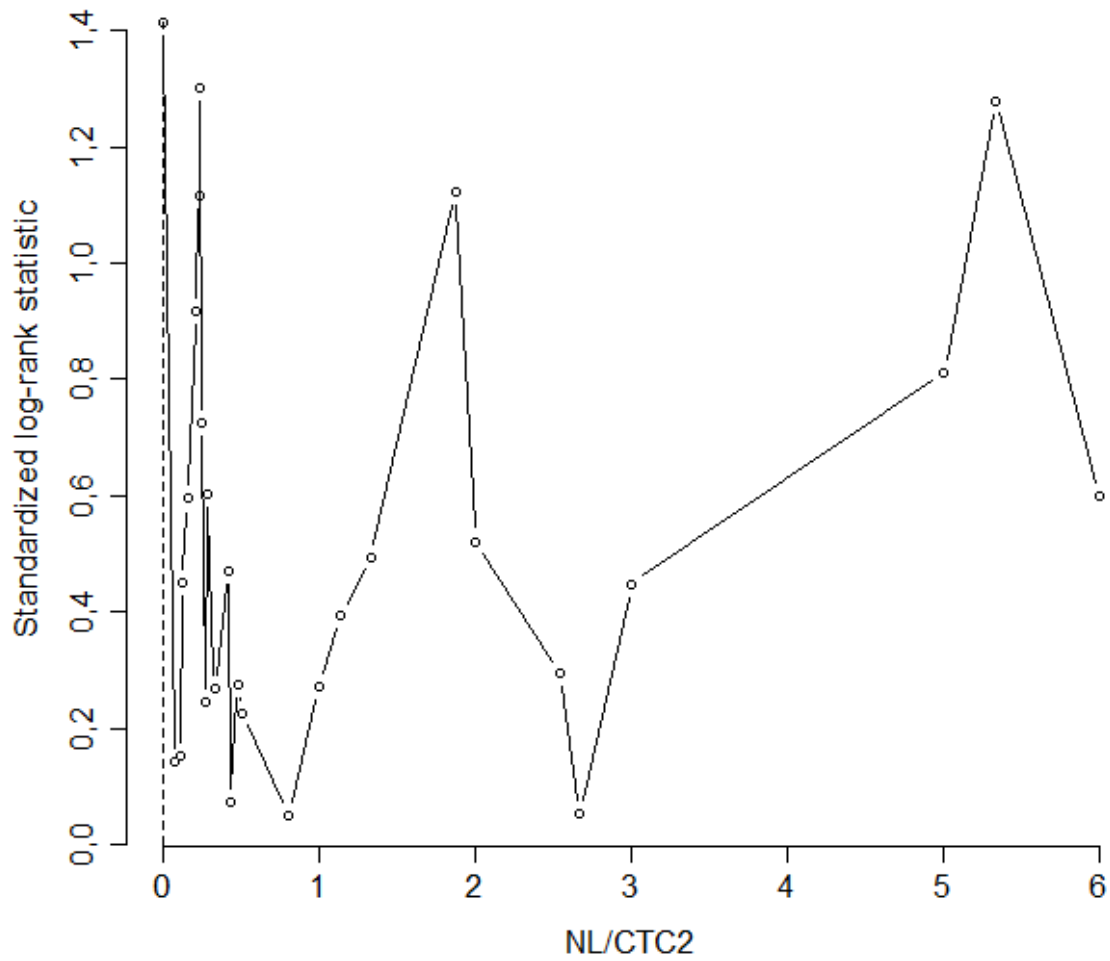


Figura 53 - Estimativa do ponto de corte para NL/CTC2 e SG.

A SG mediana foi 19,4 meses nas pacientes com NL/CTC2 > 0 e não foi atingida nas pacientes com NL/CTC2 igual a 0 ($p = 0,33$; regressão de Cox não foi possível, pois não houve evento no grupo NL/CTC2 igual a 0) (Figura 54).

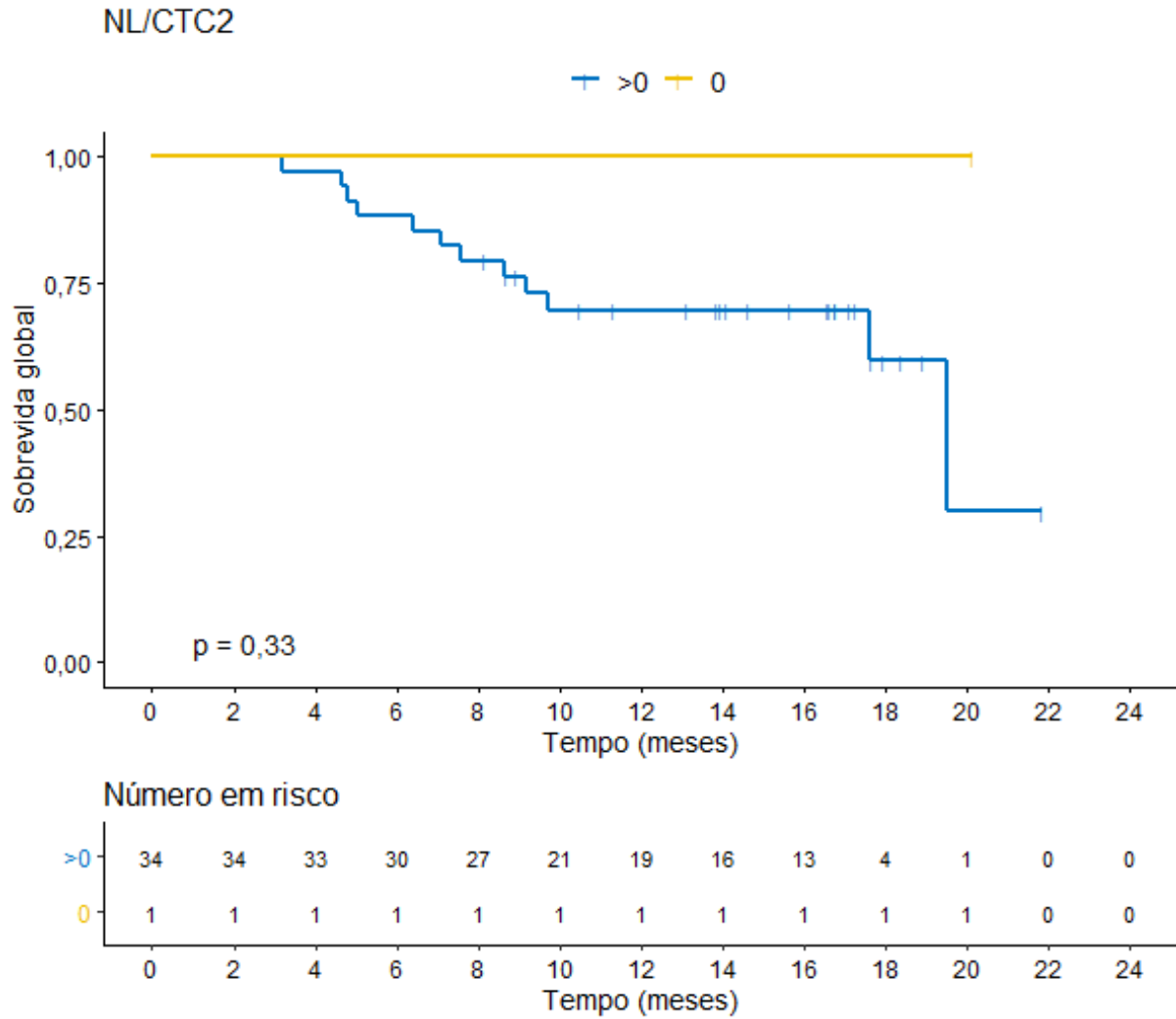


Figura 54 - SG atuarial estratificada por NL/CTC2 (\leq ou $> 5,5$).

4.23 IMPACTO PROGNÓSTICO DO NÚMERO DE SÍTIOS METASTÁTICOS NA SLPED

A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com único sítio metastático e foi 14 meses nas pacientes com 2 ou mais sítios metastáticos ($p_{\text{logrank}} = 0,29$) (Figura 55).

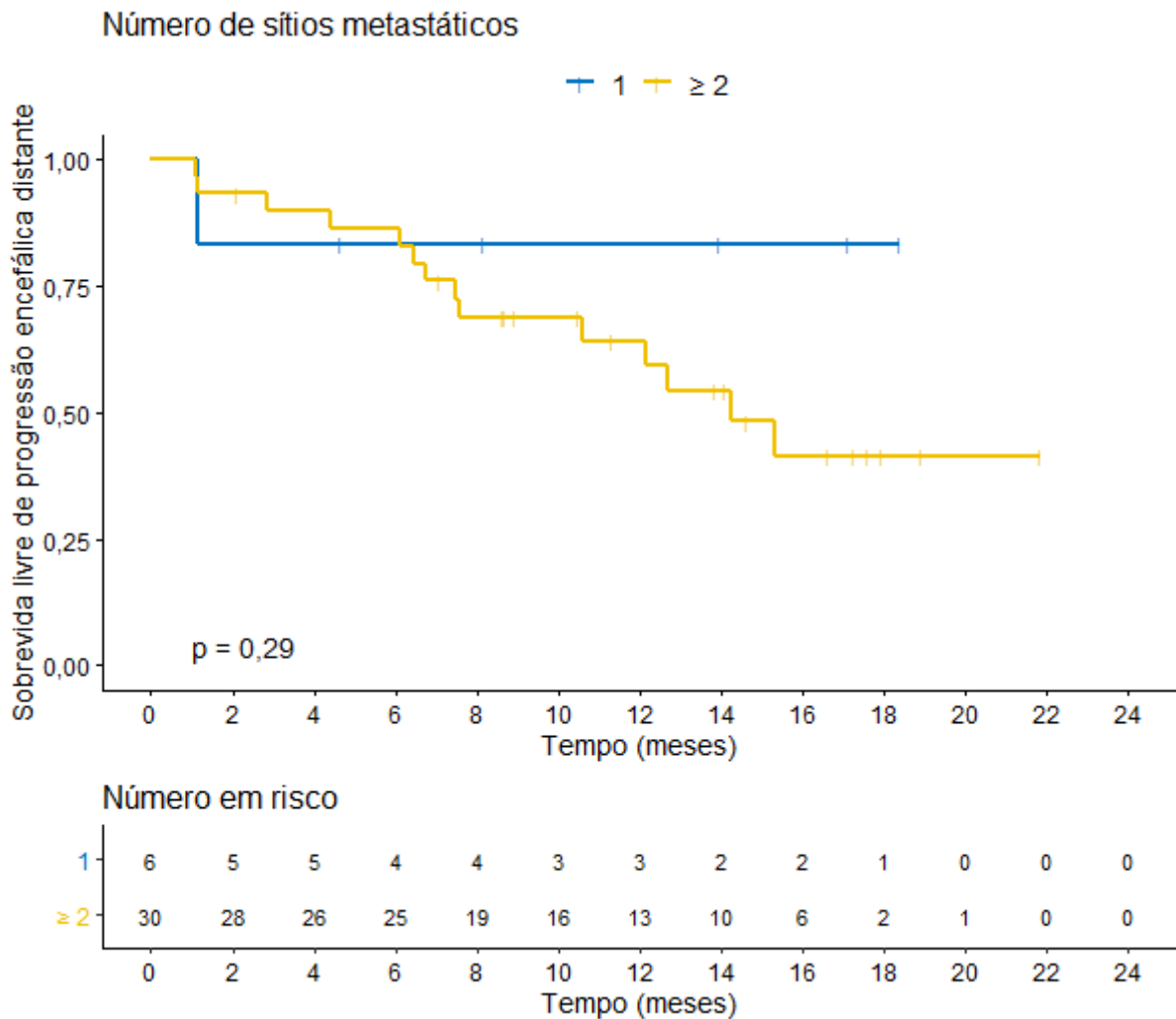


Figura 55 - SLPED atuarial estratificada pelo número de sítios metastáticos (1 ou ≥ 2).

4.24 IMPACTO PROGNÓSTICO DO NÚMERO DE SÍTIOS METASTÁTICOS NA SLPED-ED

A SLPED-ED mediana não foi atingida nas pacientes com único sítio metastático e ou com 2 ou mais sítios metastáticos ($p_{\text{logrank}} = 0,29$) (Figura 56).

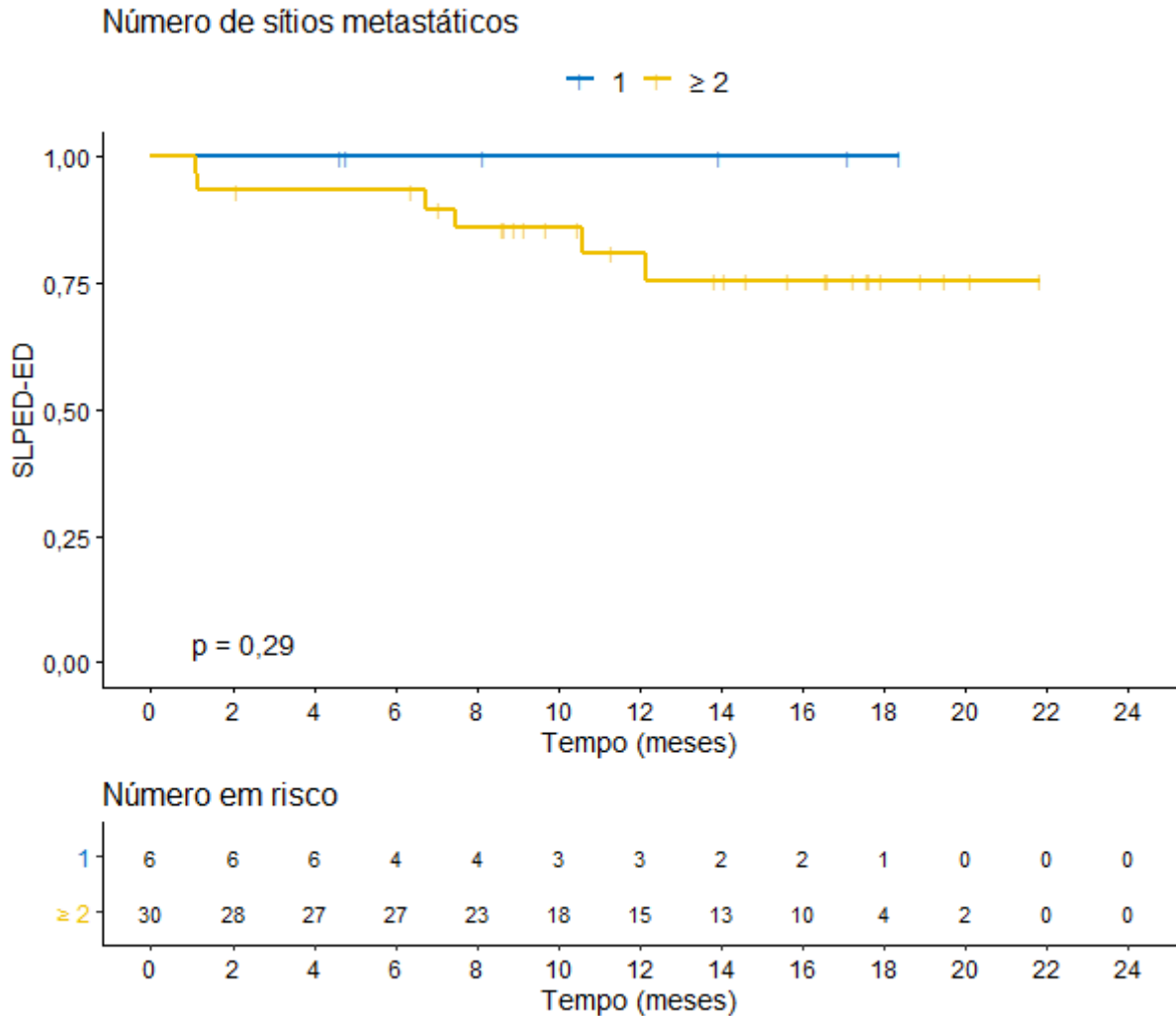


Figura 56 - SLPED-ED atuarial estratificada pelo número de sítios metastáticos (1 ou ≥ 2).

4.25 IMPACTO PROGNÓSTICO DO NÚMERO DE SÍTIOS METASTÁTICOS NA SG

A SG mediana não foi atingida nas pacientes com único sítio metastático e foi 19,8 meses nas pacientes com 2 ou mais sítios metastáticos ($p_{\text{logrank}} = 0,91$) (Figura 57).

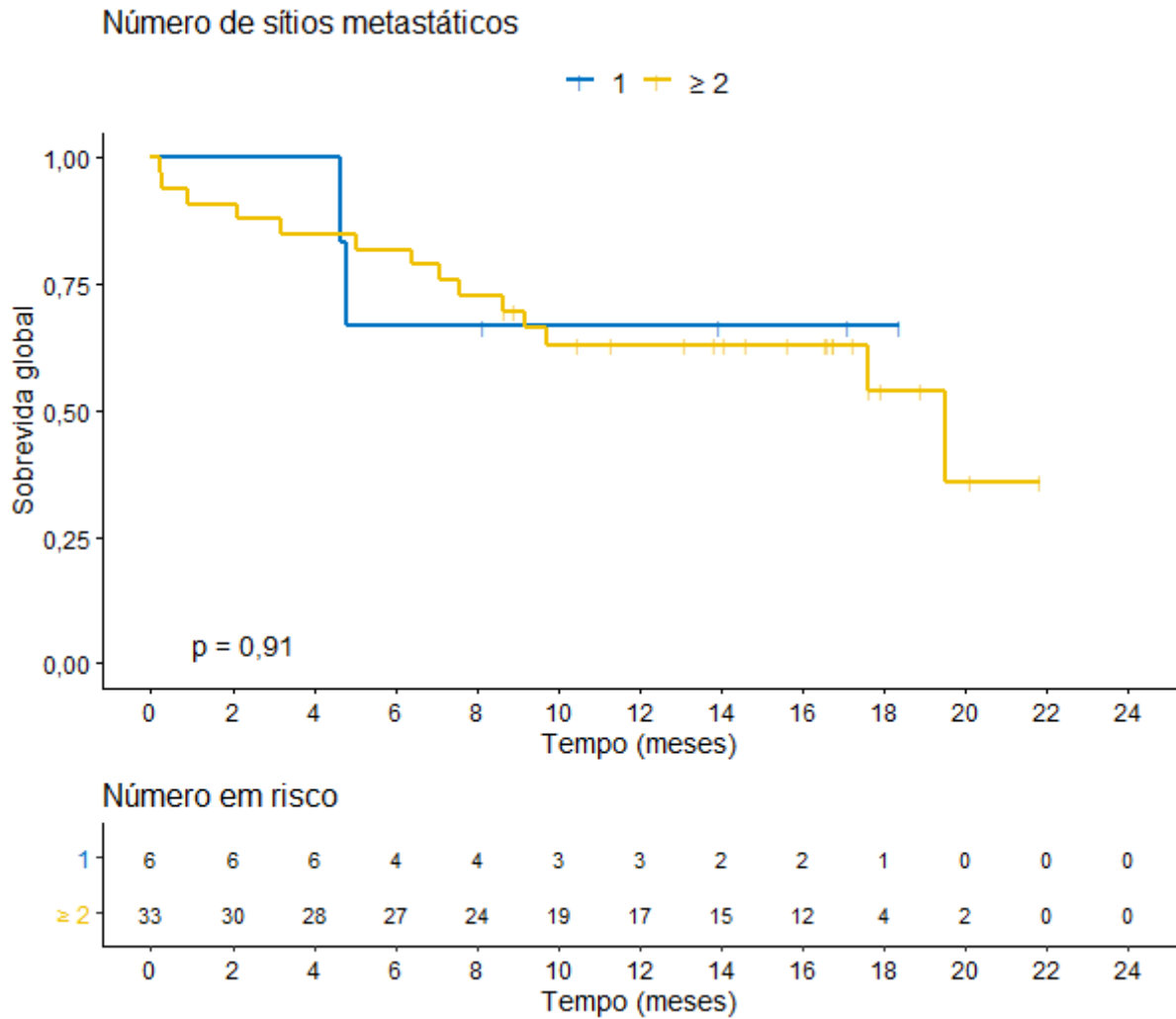


Figura 57 - SG atuarial estratificada pelo número de sítios metastáticos (1 ou ≥ 2).

4.26 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE EGFR NA SLPED

A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão ausente ou presente de EGFR nas CTC1 (HR = 0,9; IC95%:0,1–7,61; $p = 0,93$) (Figura 58).

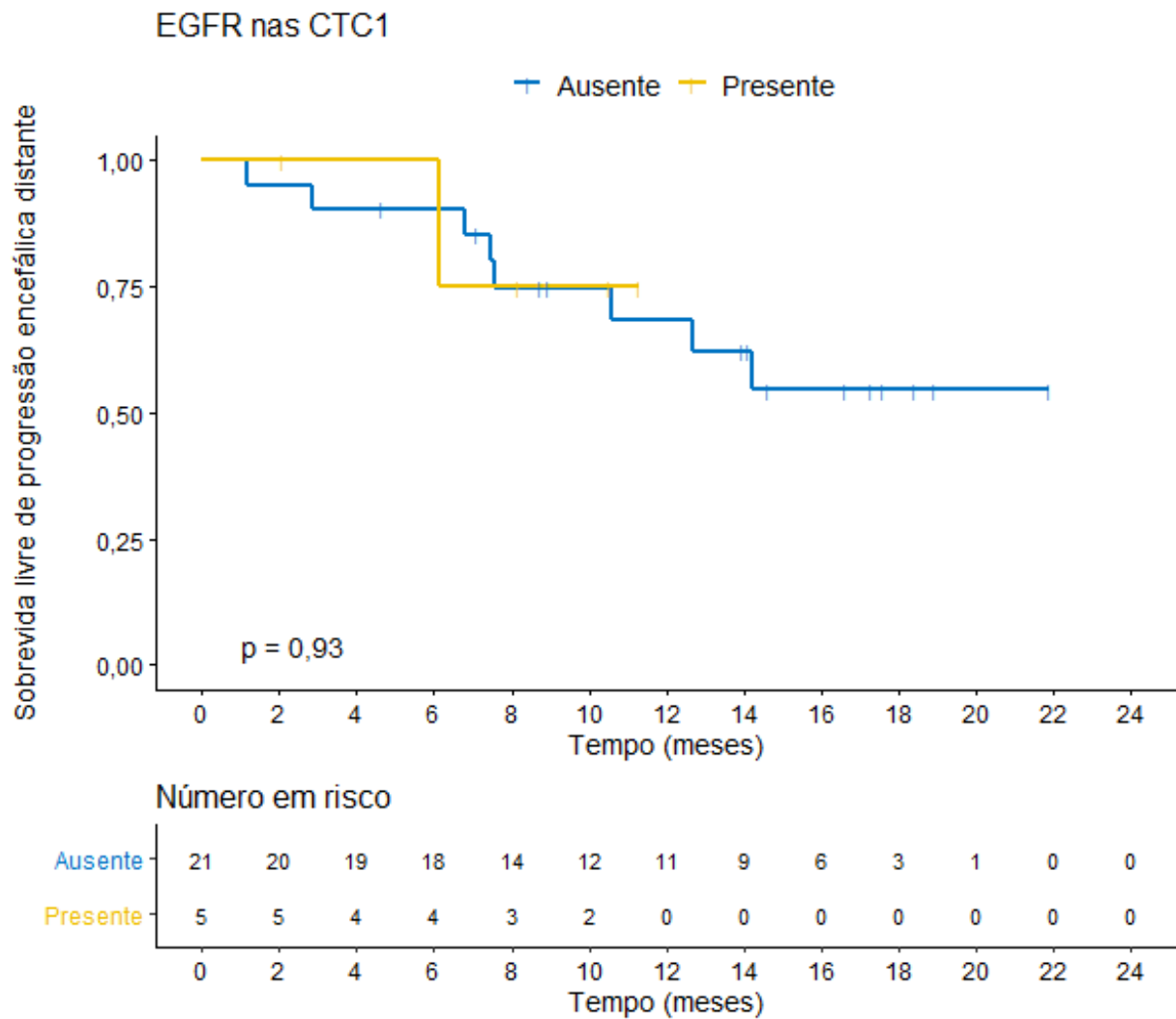


Figura 58 - SLPED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de EFGR nas CTC1.

A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão presente e foi 15,1 meses nas pacientes com expressão ausente de EGFR nas CTC2 (HR = 0,94; IC95%:0,23–3,79; $p = 0,93$) (Figura 59).

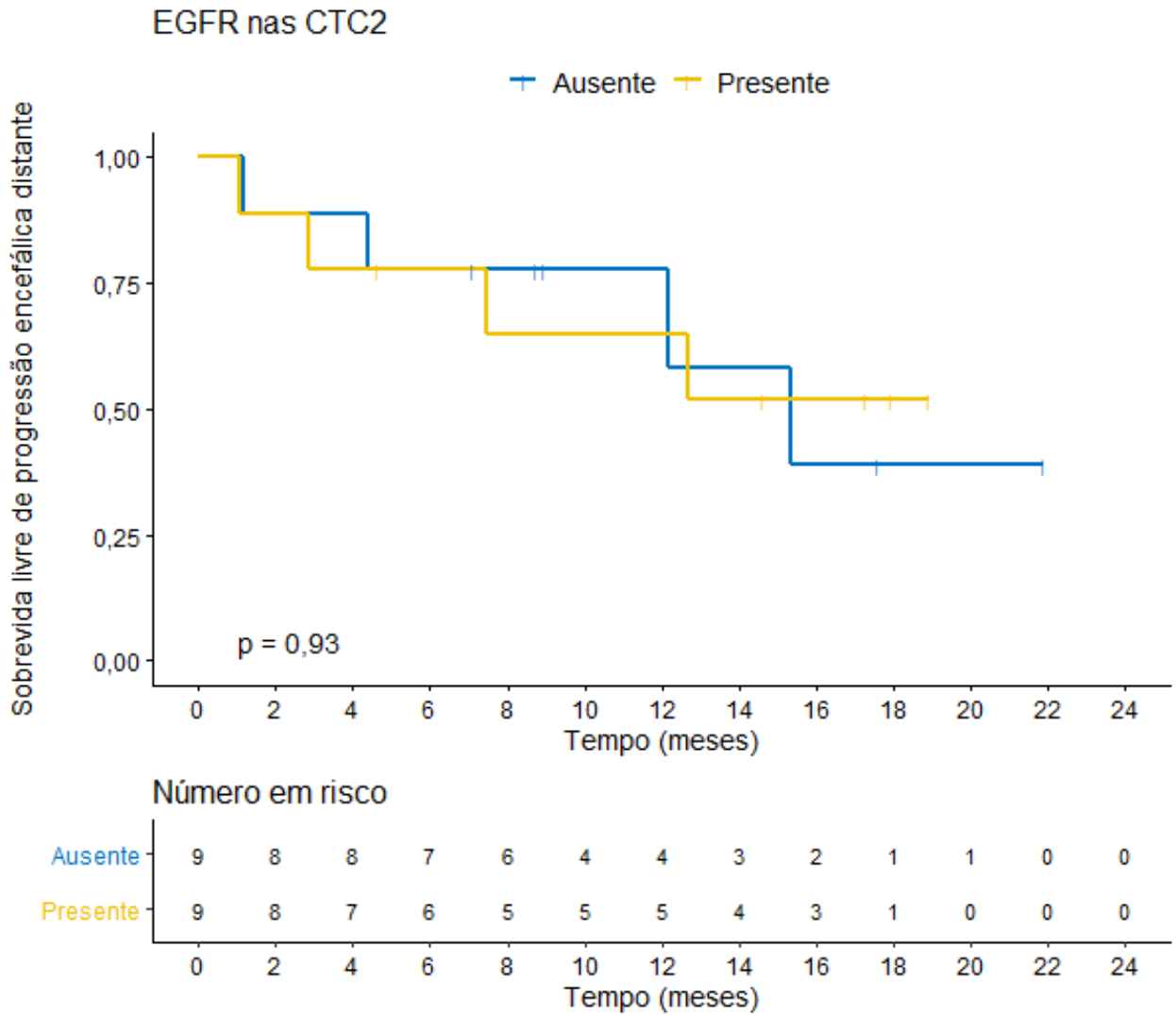


Figura 59 - SLPED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de EFGR nas CTC2.

4.27 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE EGFR NA SLPED-ED

A SLPED-ED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão ausente ou presente de EGFR nas CTC1 ($p = 0,52$; regressão de Cox não foi possível, pois não houve evento no grupo com expressão presente) (Figura 60).

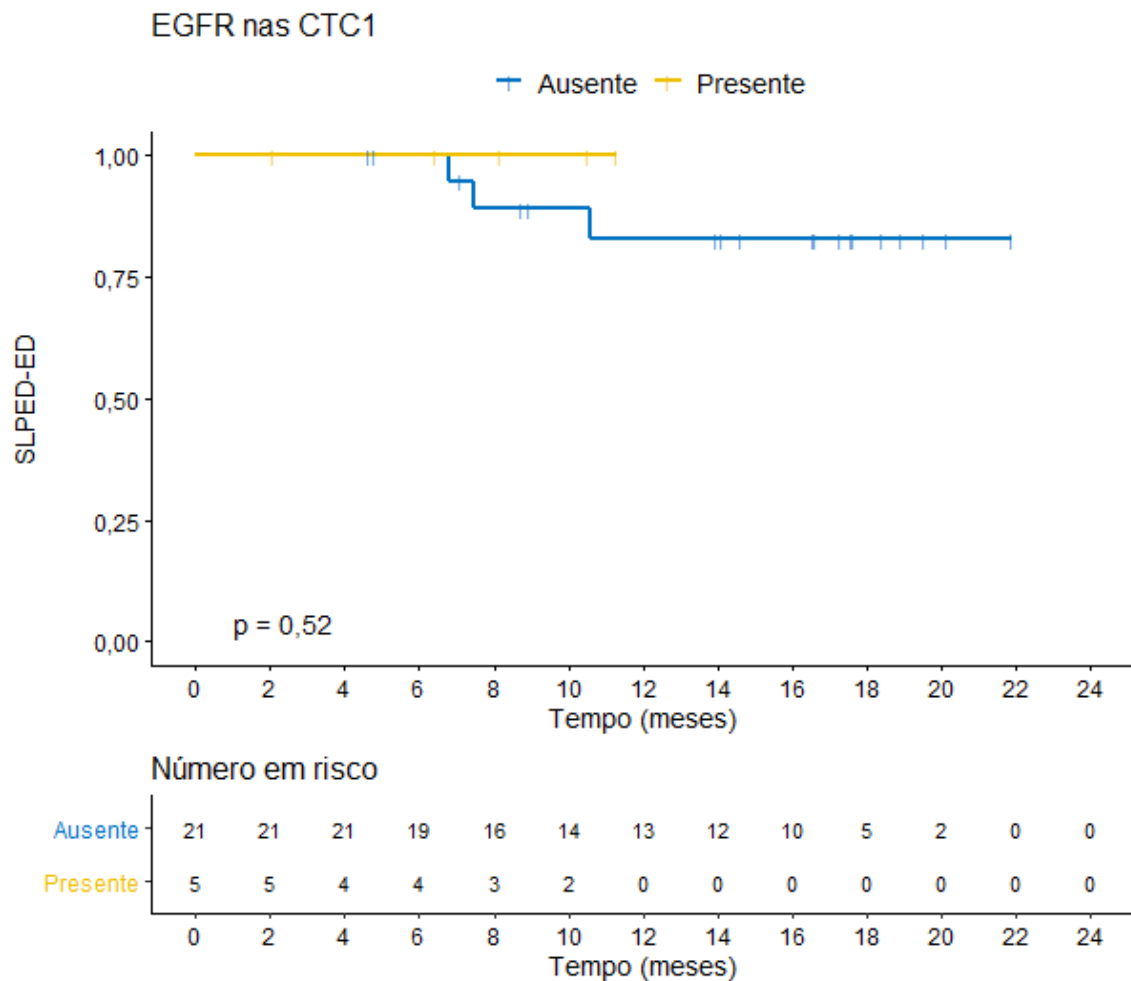


Figura 60 - SLPED-ED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de EFGR nas CTC1.

A SLPED-ED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão ausente ou presente de EGFR nas CTC2 (HR = 1,75; IC95%:0,15–19,57; p = 0,64) (Figura 61).

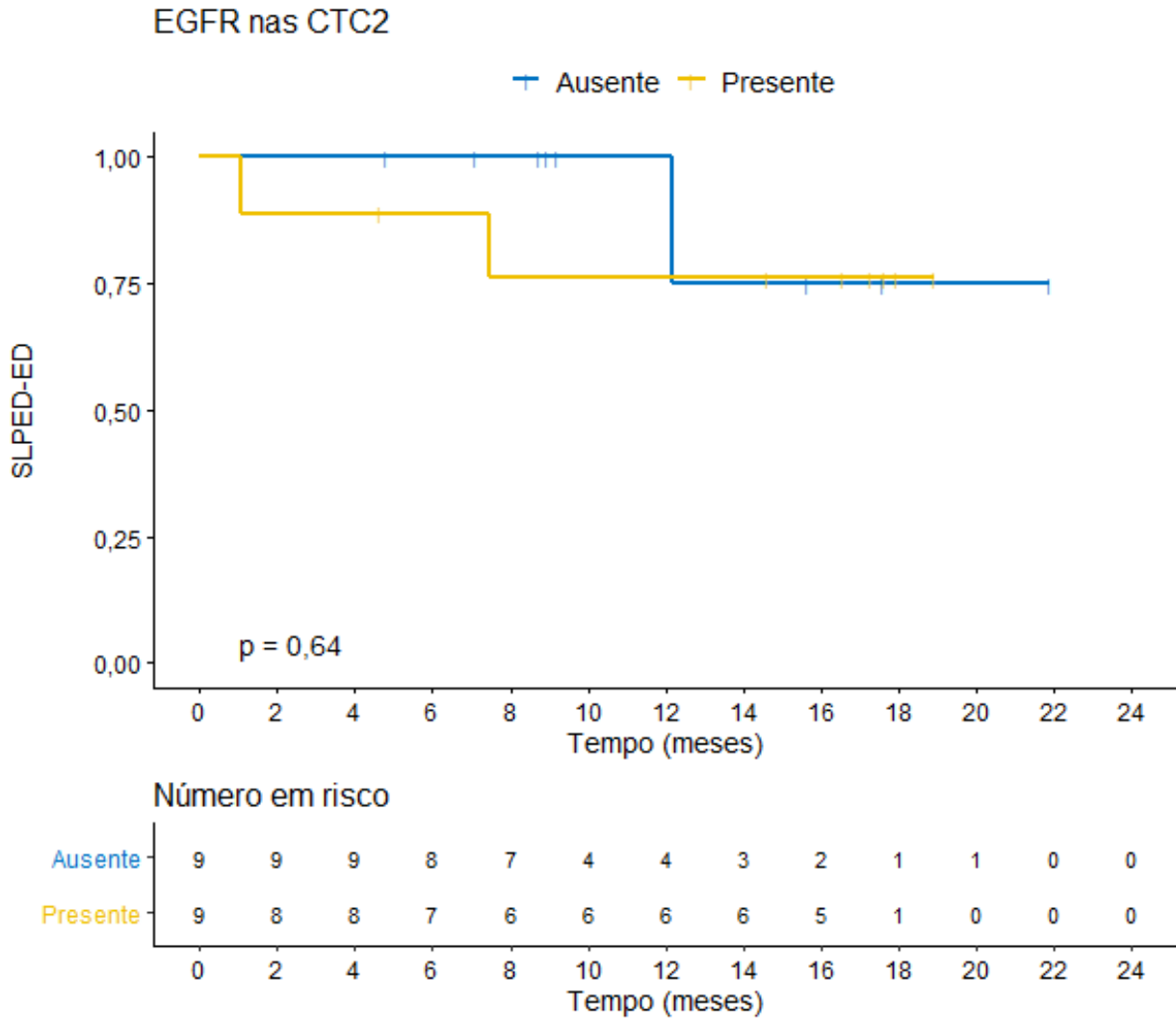


Figura 61 - SLPED-ED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de EFGR nas CTC2.

4.28 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE EGFR NA SG

A SG mediana foi de 6,8 meses nas pacientes com expressão presente e foi 19,8 meses nas pacientes com expressão ausente de EGFR nas CTC1 (HR =2,91; IC95%:0,69–12,26; p = 0,13) (Figura 62).

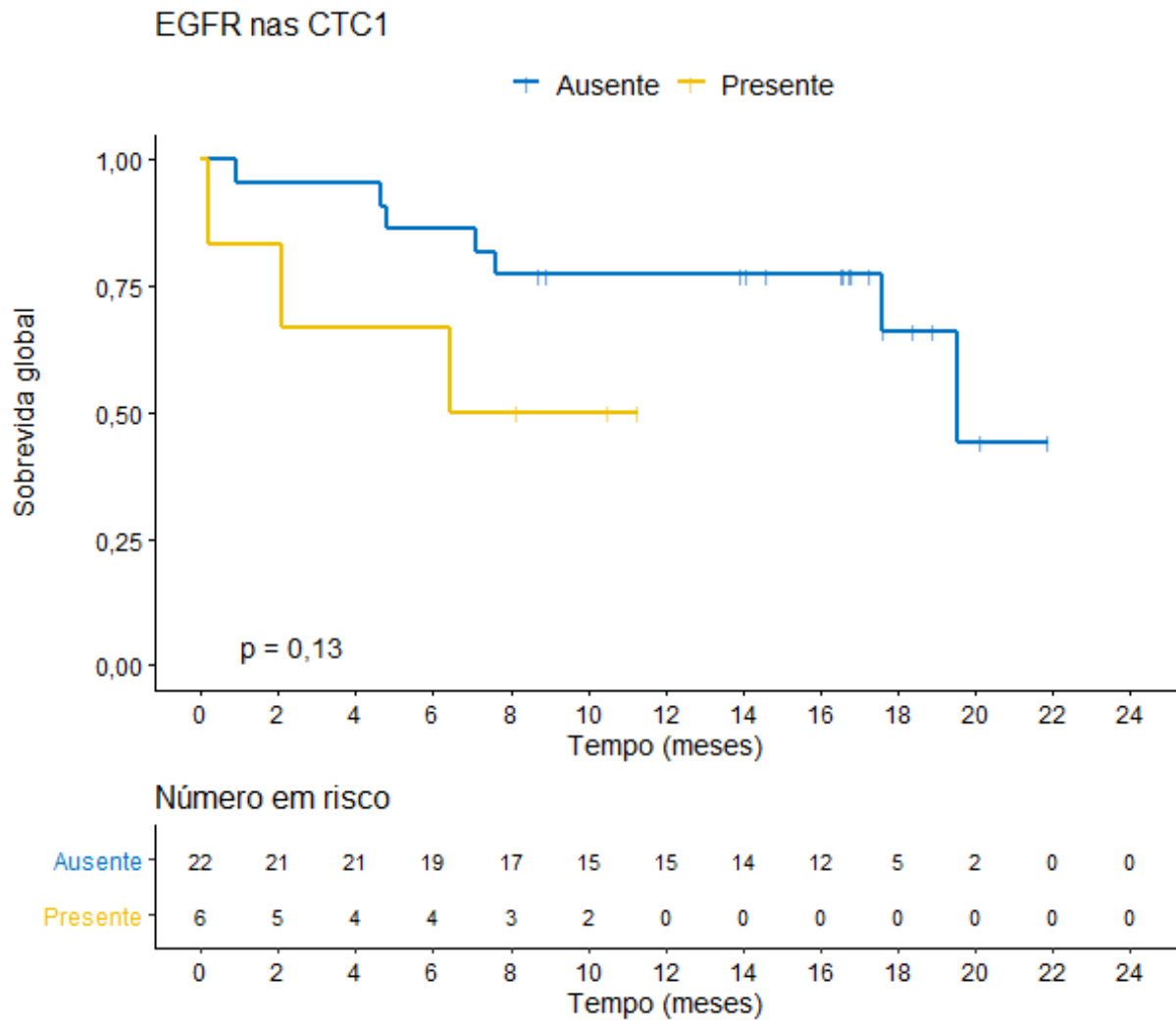


Figura 62 - SG atuarial estratificada pelo *status* da expressão de EFGR nas CTC1.

A SG mediana não foi atingida nas pacientes com expressão presente e foi 17,4 meses nas pacientes com expressão ausente de EGFR nas CTC2 (HR = 0,73; IC95%:0,16–3,32; p = 0,69) (Figura 63).

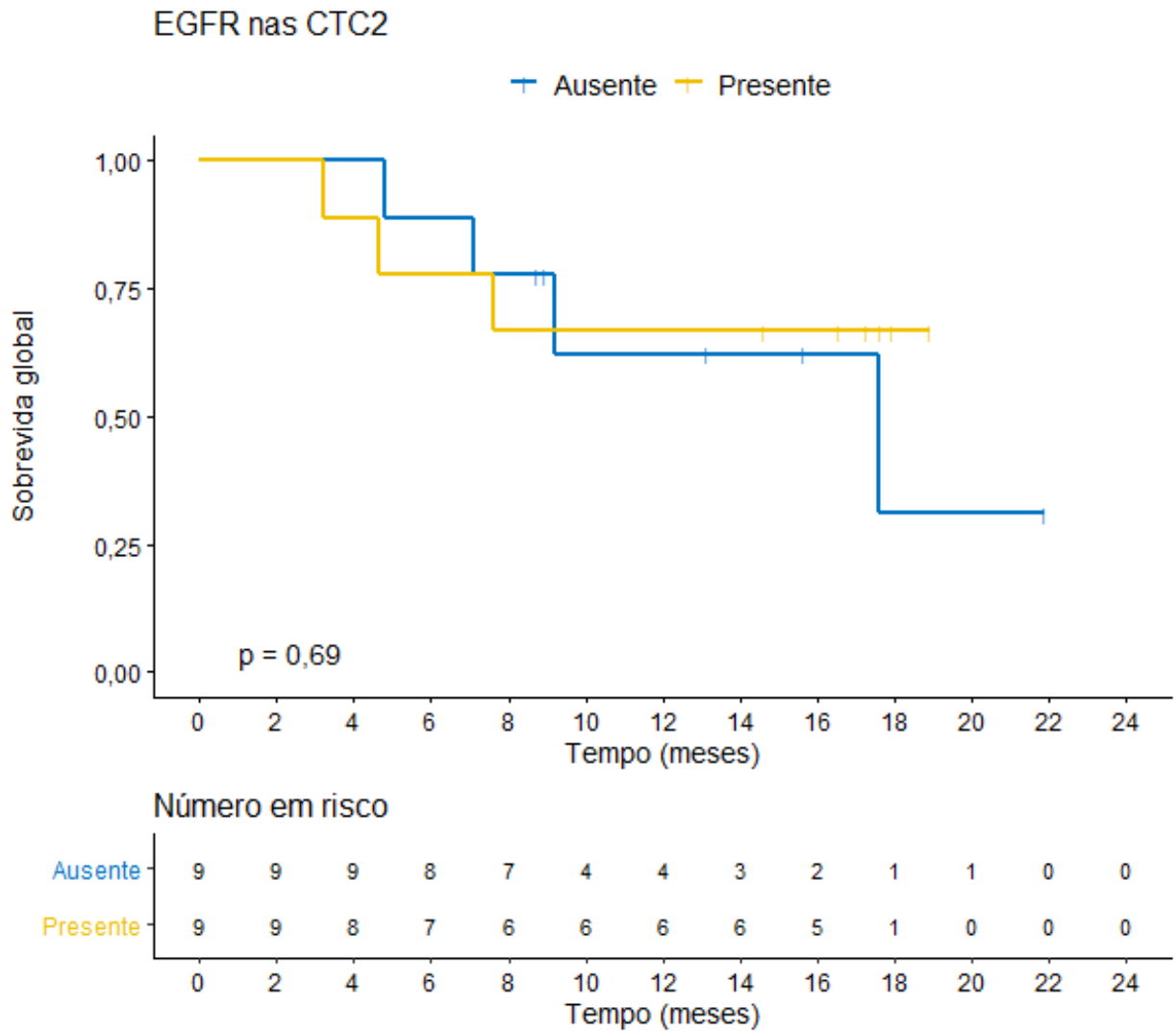


Figura 63 - SG atuarial estratificada pelo *status* da expressão de EFGR nas CTC2.

4.29 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE ST6GALNAC5 NA SLPED

A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão presente e foi 10,3 meses nas pacientes com expressão ausente de ST6GALNAC5 nas CTC1 (HR = 0,46; IC95%:0,13–1,67; $p = 0,24$) (Figura 64).

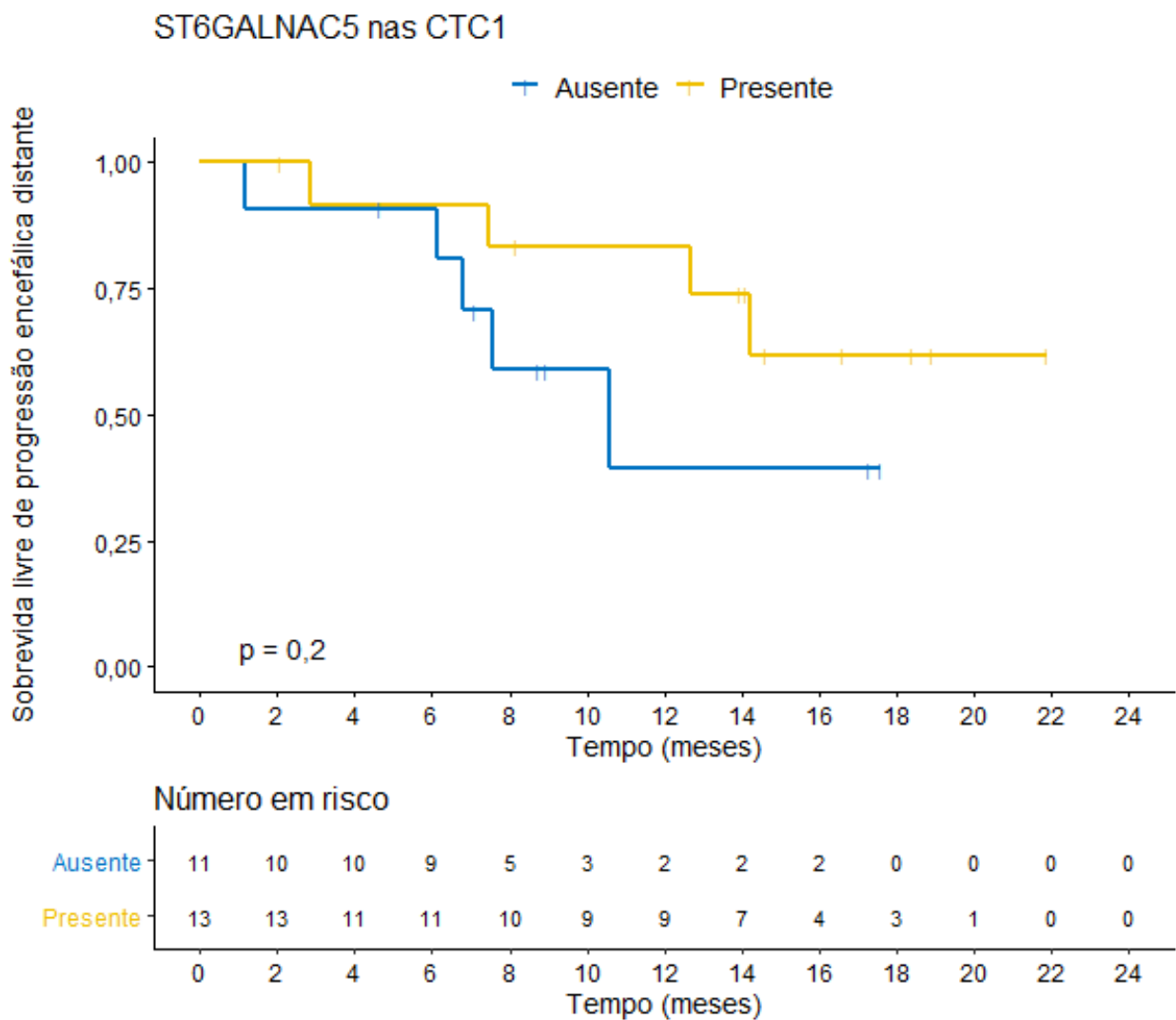


Figura 64 - SLPED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC1.

A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão presente e foi 12,6 meses nas pacientes com expressão ausente de ST6GALNAC5 nas CTC2 (HR = 0,42; IC95%:0,09–2,01; p = 0,28) (Figura 65).

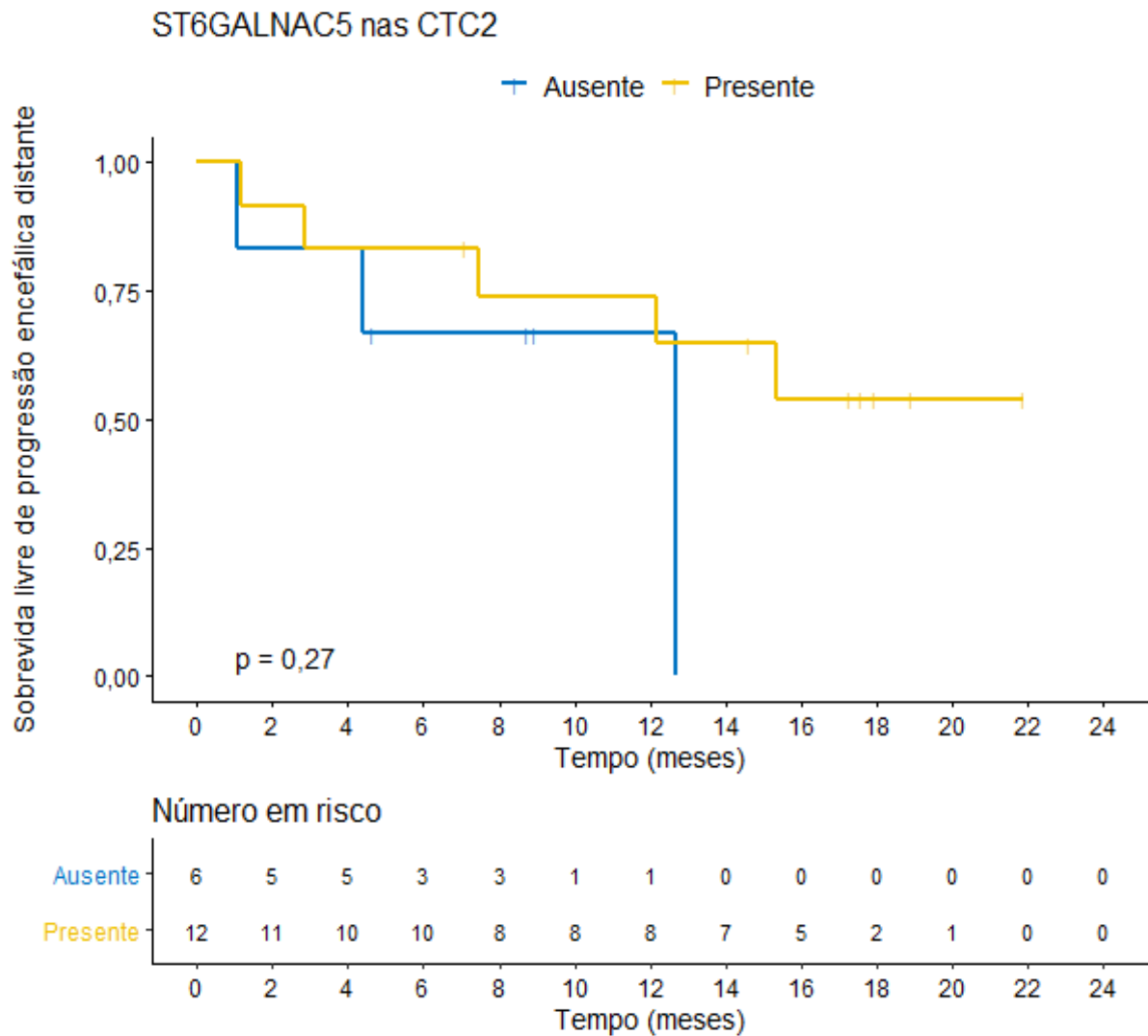


Figura 65 - SLPED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC2.

4.30 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE ST6GALNAC5 NA SLPED-ED

A SLPED-ED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão ausente ou presente de ST6GALNAC5 nas CTC1 (HR = 0,25; IC95%:0,023–2,83; p = 0,26) (Figura 66).

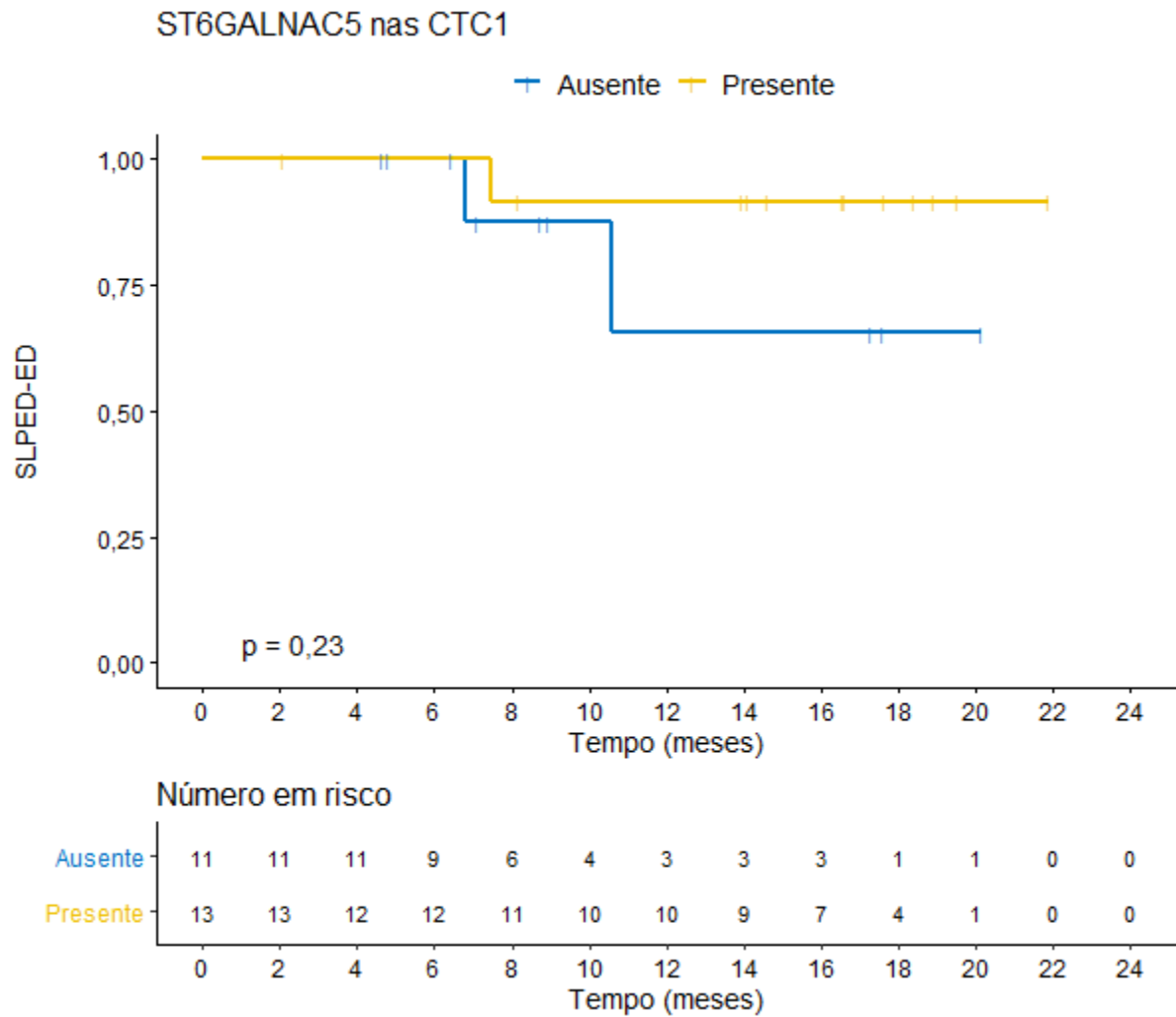


Figura 66 - SLPED-ED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC1.

A SLPED-ED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão ausente ou presente de ST6GALNAC5 nas CTC2 (HR = 0,61; IC95%:0,05–7,4; p = 0,69) (Figura 67).

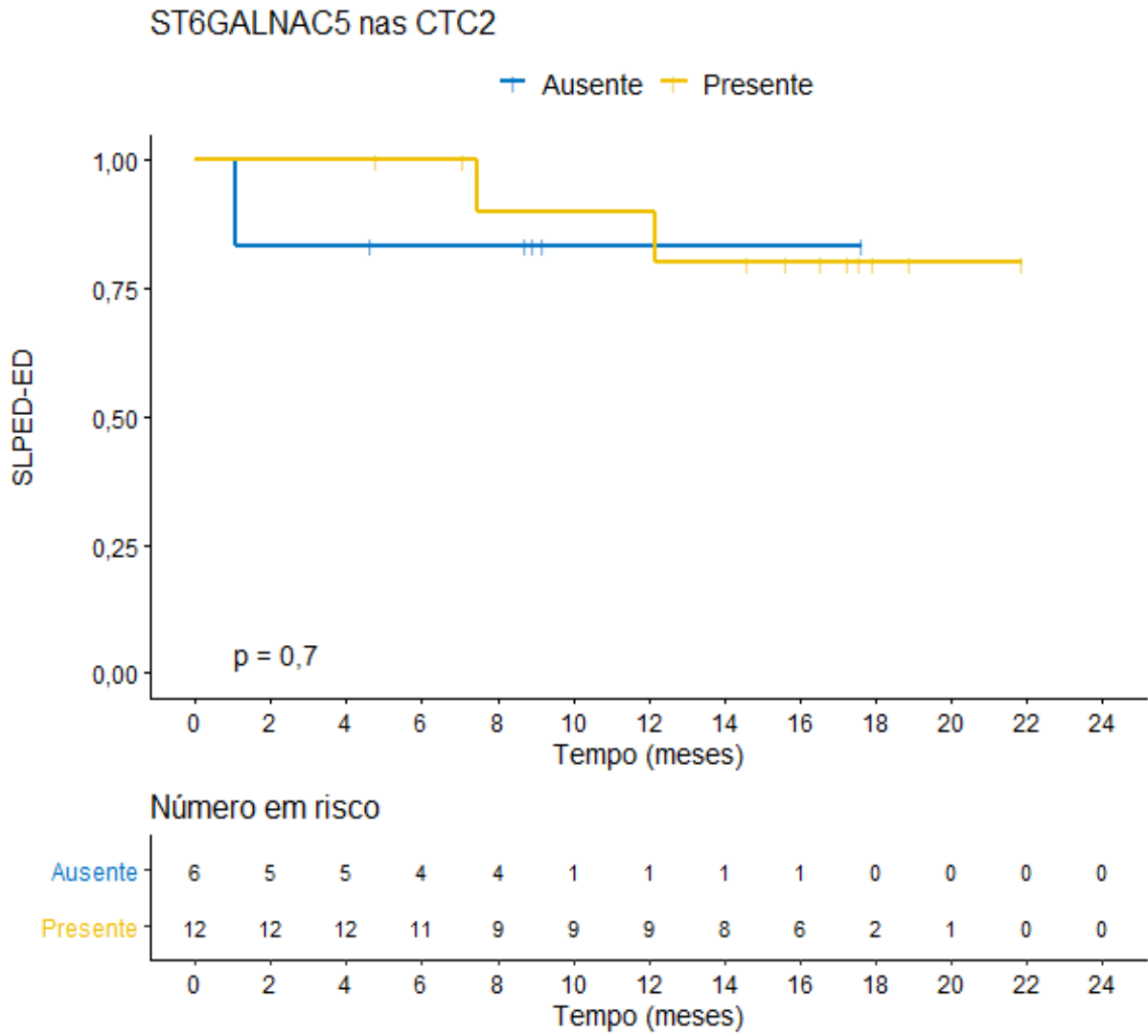


Figura 67 - SLPED-ED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC2.

4.31 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE ST6GALNAC5 NA SG

A SG mediana foi de 17,6 meses nas pacientes com expressão presente e foi 19,8 meses nas pacientes com expressão ausente de ST6GALNAC5 nas CTC1 (HR =0,53; IC95%:0,15–1,87; p = 0,33) (Figura 68).

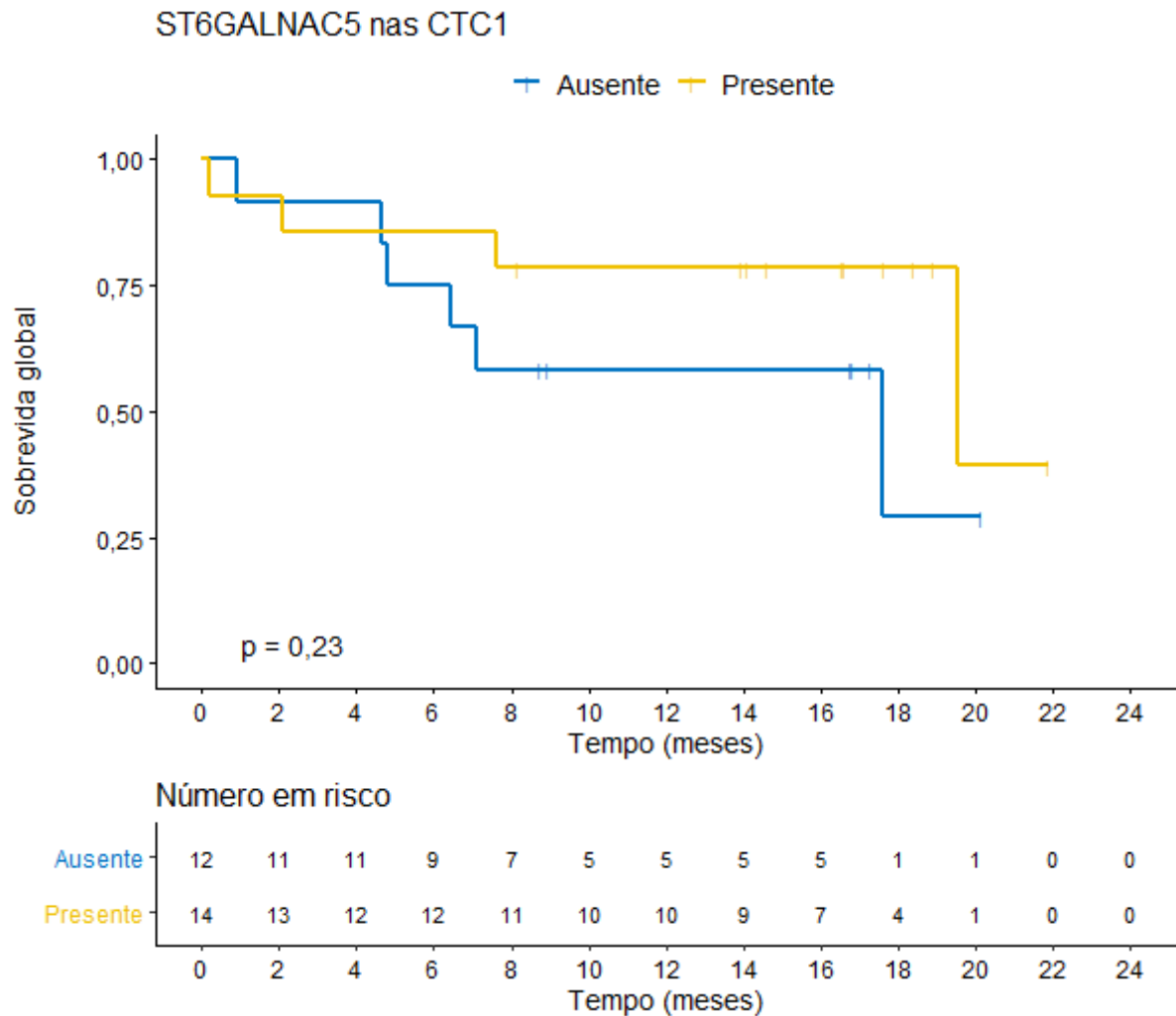


Figura 68 - SG atuarial estratificada pelo *status* da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC1.

A SG mediana não foi atingida nas pacientes com expressão presente e foi 9,7 meses nas pacientes com expressão ausente de ST6GALNAC5 nas CTC2 (HR = 0,54; IC95%:0,14–2,06; p = 0,37) (Figura 69).

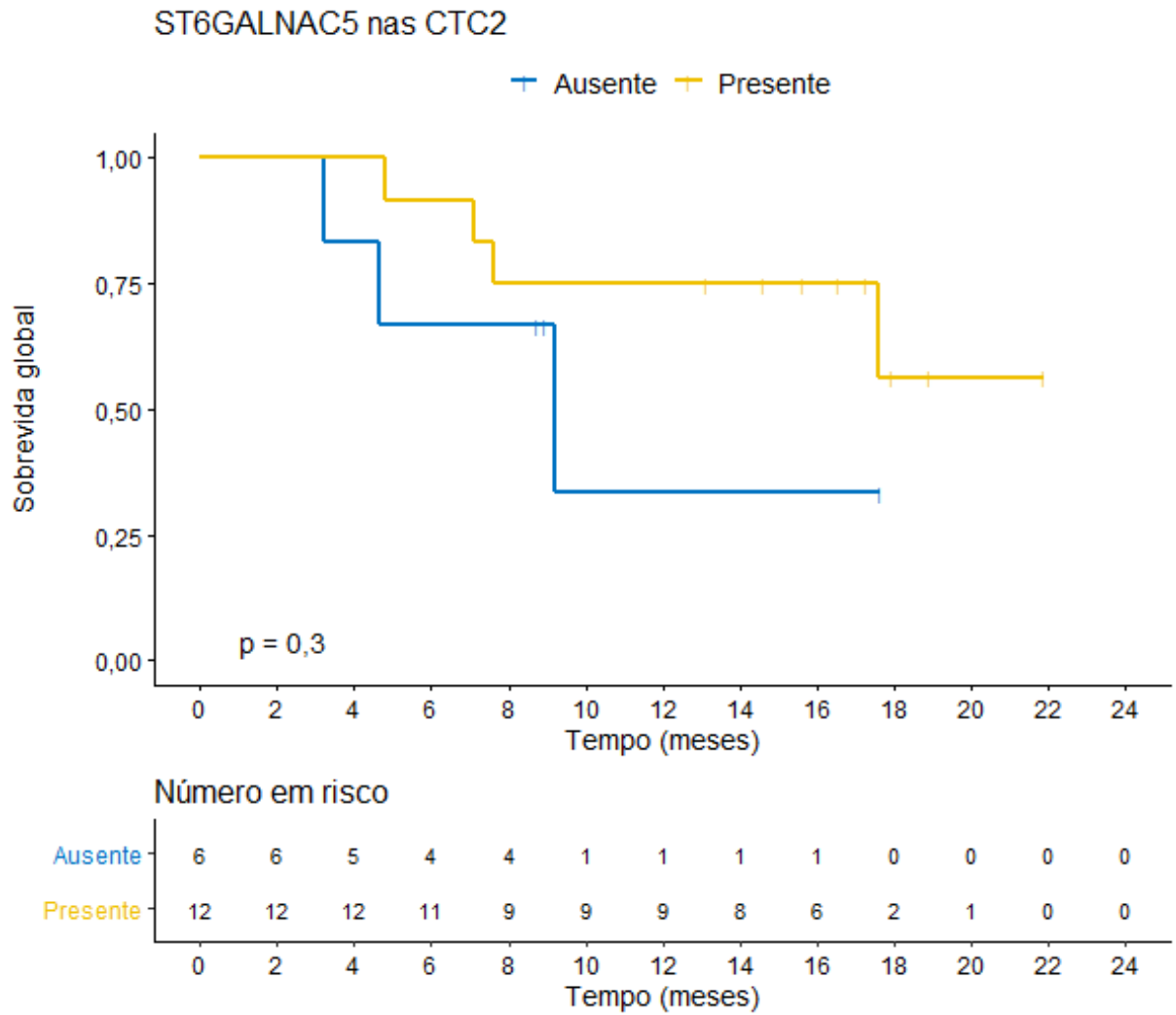


Figura 69 - SG atuarial estratificada pelo *status* da expressão de ST6GALNAC5 nas CTC2.

4.32 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE NOTCH1 NA SLPED

A SLPED mediana foi de 14,6 nas pacientes com expressão ausente e foi 15,3 meses nas pacientes com expressão presente de NOTCH1 nas CTC1 (HR = 1,01; IC95%:0,31–3,21; $p = 0,98$) (Figura 70).

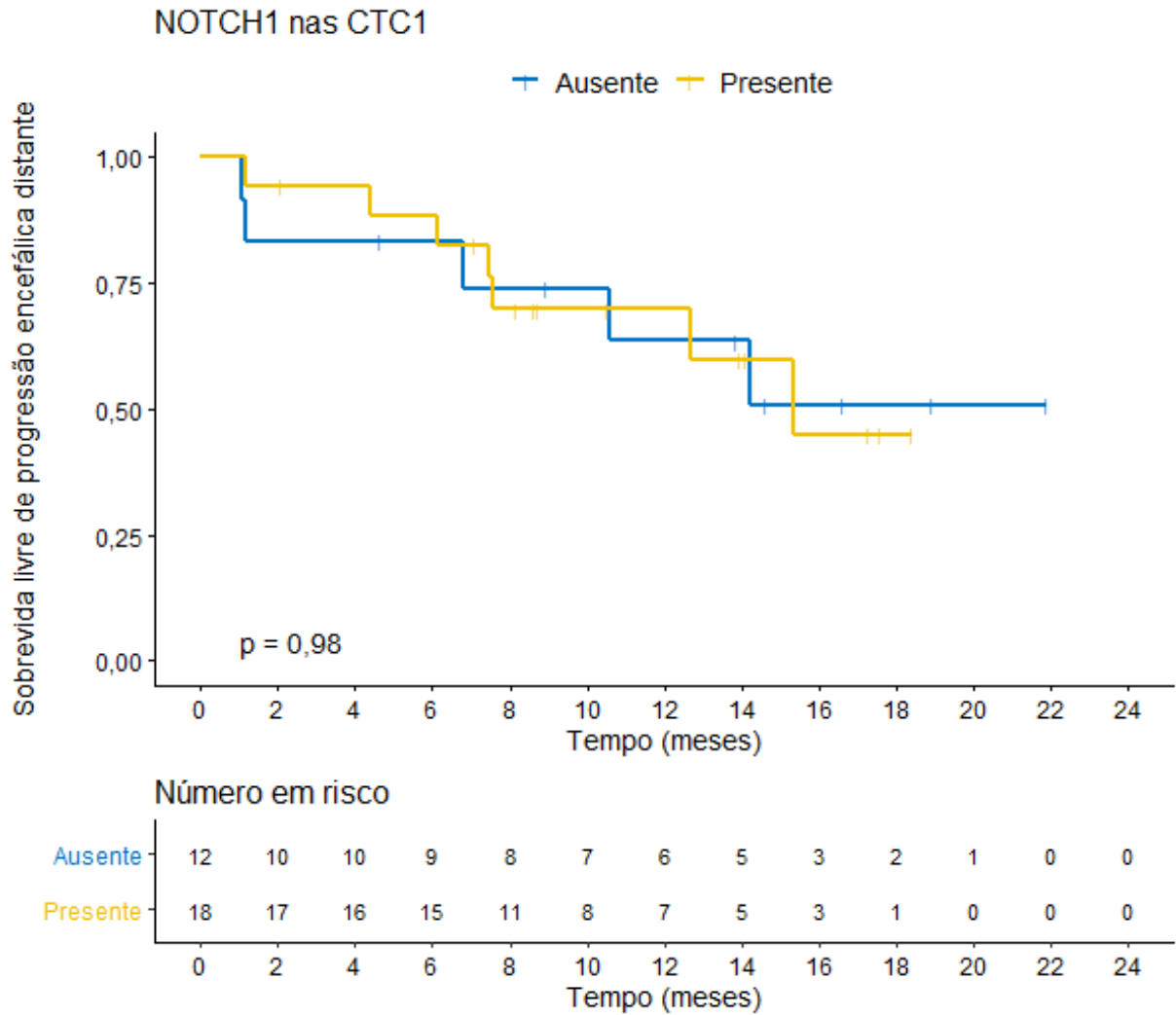


Figura 70 - SLPED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de NOTCH1 nas CTC1.

A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão ausente e foi 13,2 meses nas pacientes com expressão presente de NOTCH1 nas CTC2 (HR = 2,18; IC95%:0,57–8,29; $p = 0,25$) (Figura 71).

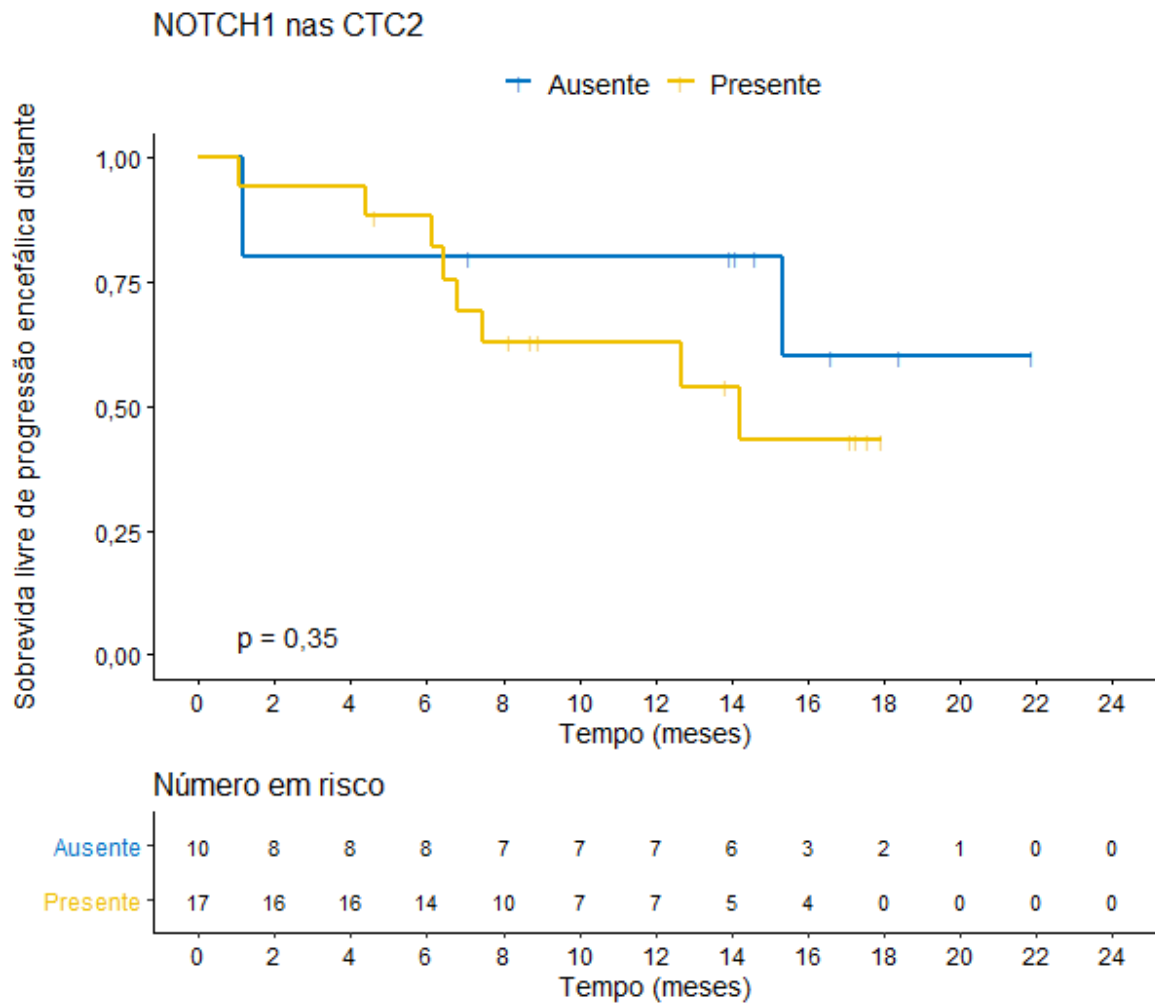


Figura 71 - SLPED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de NOTCH1 nas CTC2.

4.33 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE NOTCH1 NA SLPED-ED

A SLPED-ED mediana não foi atingida nos dois grupos (HR = 0,16; IC95%:0,018–1,46; p = 0,1) (Figura 72).

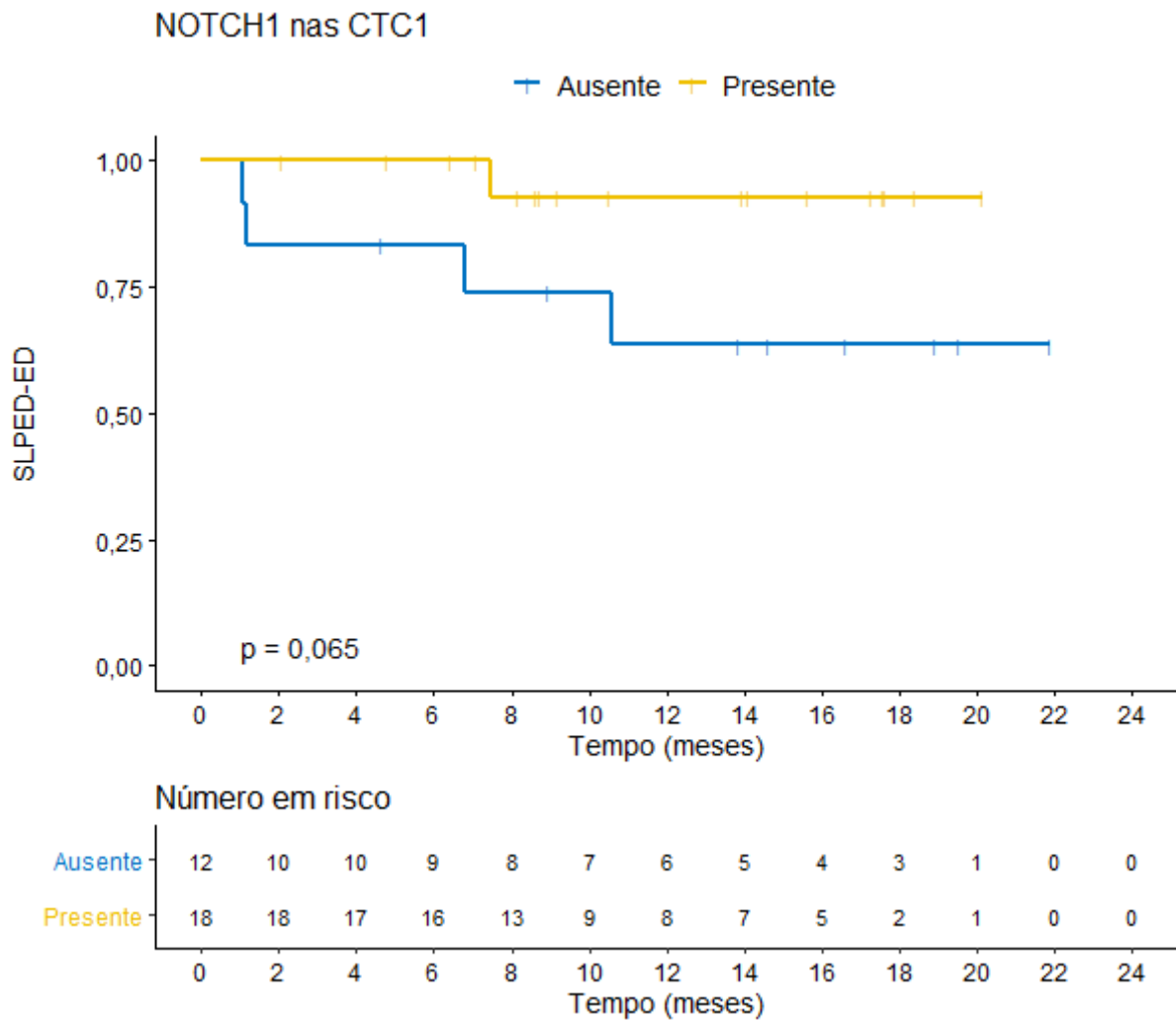


Figura 72 - SLPED-ED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de NOTCH1 nas CTC1.

A SLPED-ED mediana não foi nos dois grupos (HR = 1,74; IC95%:0,18–16,75; p = 0,63) (Figura 73).

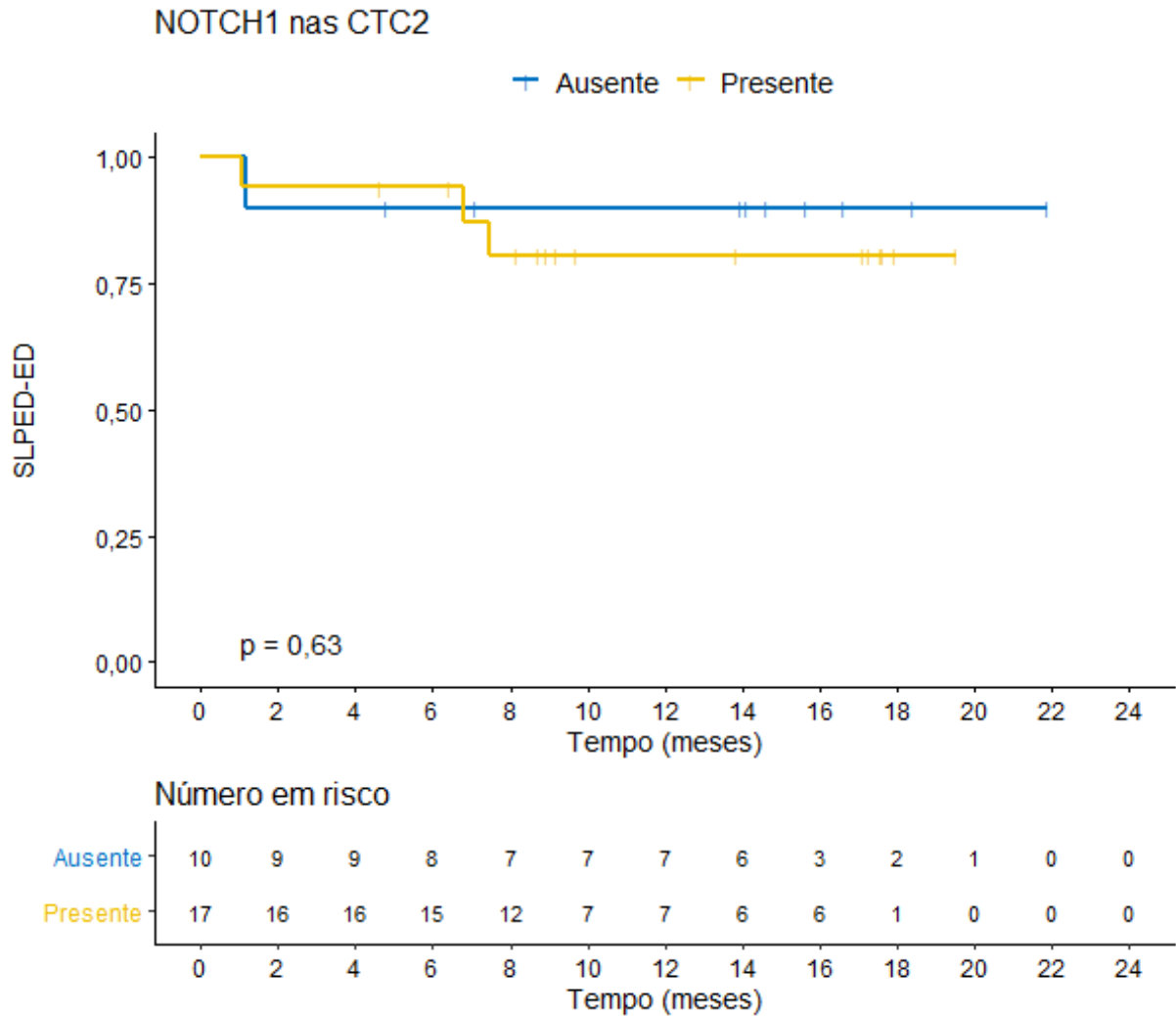


Figura 73 - SLPED-ED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de NOTCH1 nas CTC2.

4.34 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE NOTCH1 NA SG

A SG mediana foi de 17,8 meses nas pacientes com expressão presente e foi 19,7 meses nas pacientes com expressão ausente de NOTCH1 nas CTC1 (HR =1,31; IC95%:0,43–3,96; p = 0,63) (Figura 74).

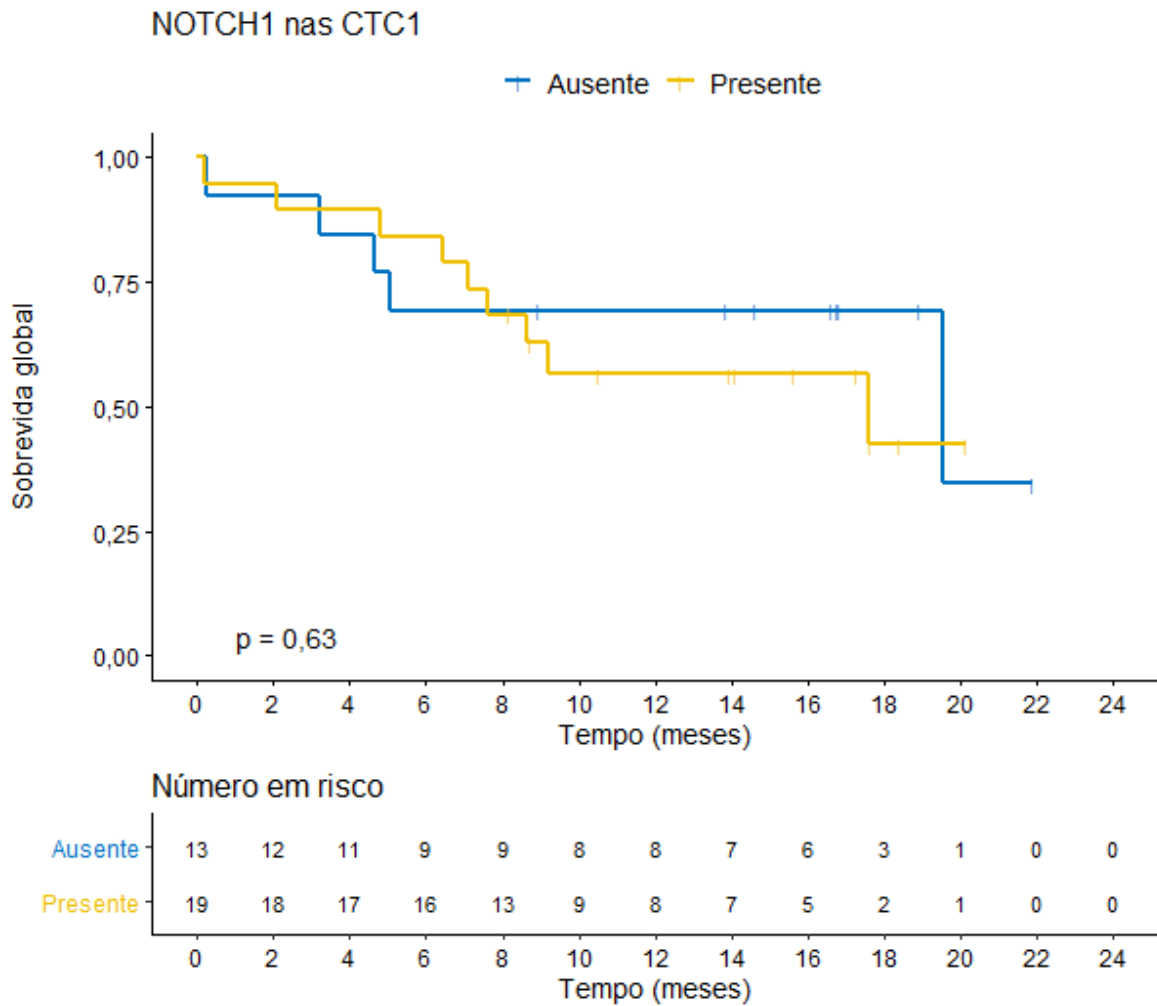


Figura 74 - SG atuarial estratificada pelo *status* da expressão de NOTCH1 nas CTC1.

A SG mediana não foi atingida nas pacientes com expressão ausente e foi 18 meses nas pacientes com expressão presente de NOTCH1 nas CTC2 (HR = 1,98; IC95%:0,52–2,06; p = 0,43) (Figura 75).

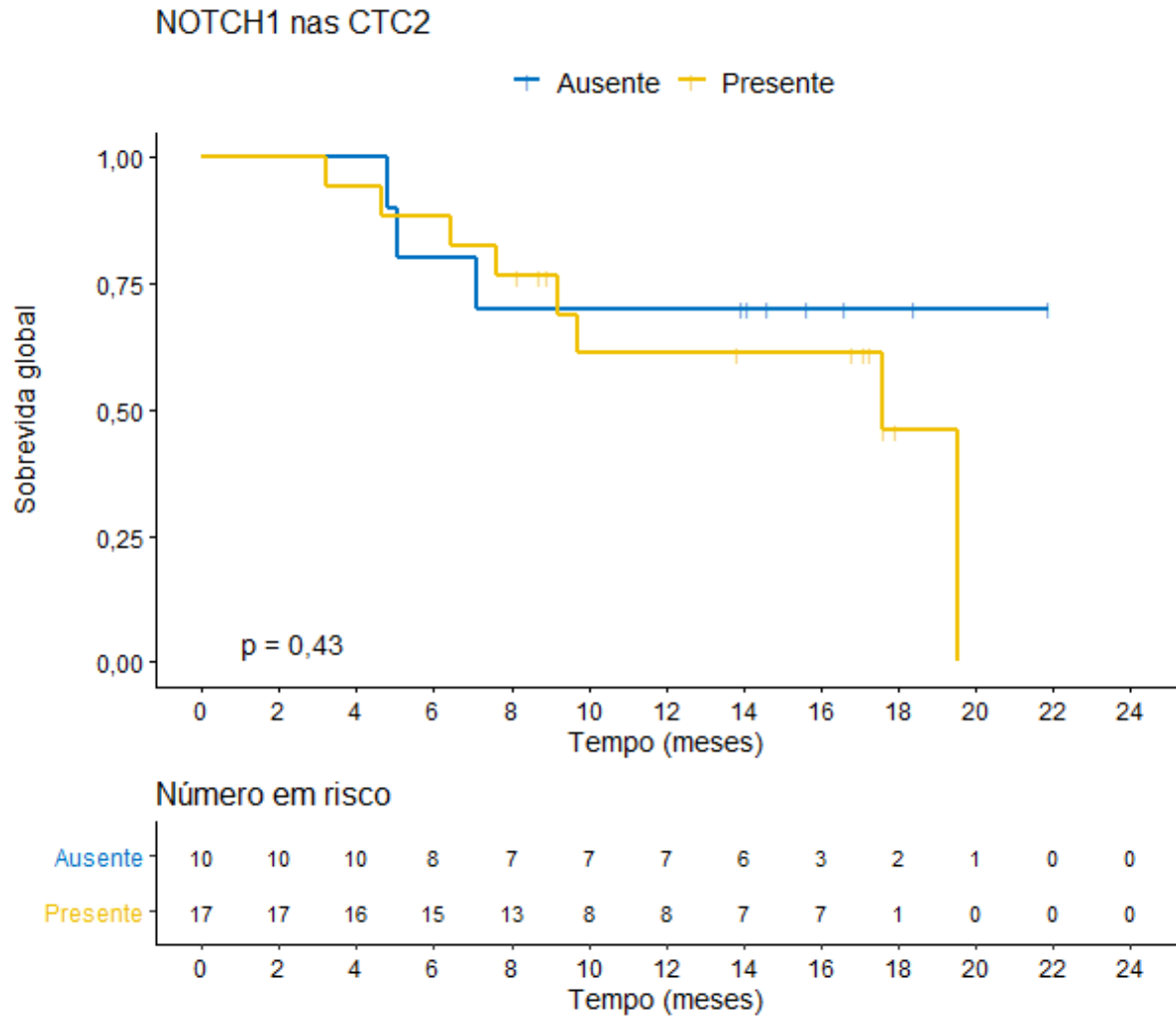


Figura 75 - SG atuarial estratificada pelo *status* da expressão de NOTCH1 nas CTC2.

4.35 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE HER2 NA SLPED

A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão presente e foi 14,8 meses nas pacientes com expressão ausente de HER2 nas CTC1 ($p = 0,21$; regressão de Cox não foi possível, pois não houve evento no grupo com expressão de HER2 presente) (Figura 76).

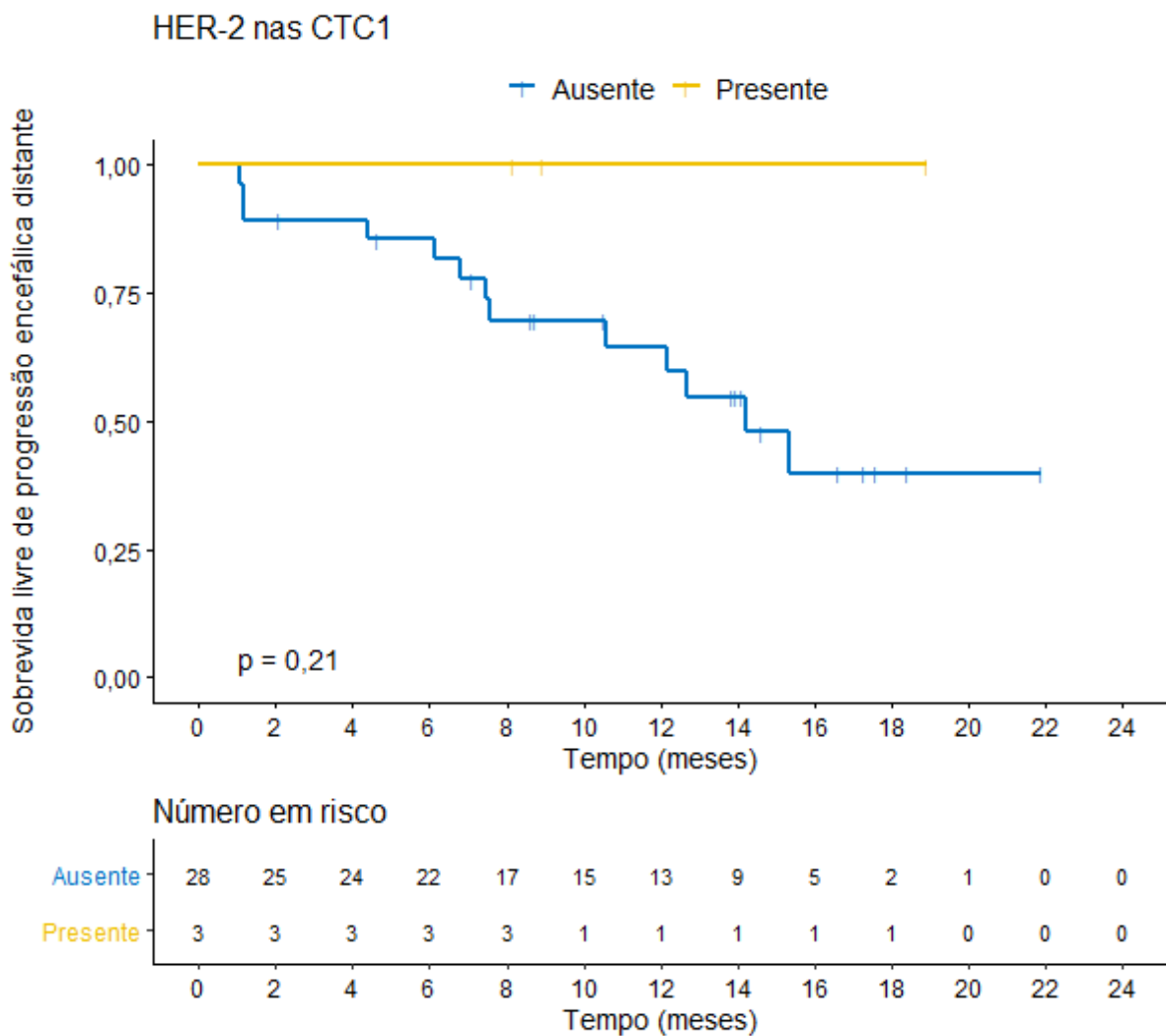


Figura 76 - SLPED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de HER2 nas CTC1.

A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão presente e foi 13 meses nas pacientes com expressão ausente de HER2 nas CTC2 ($p = 0,032$; regressão de Cox não foi possível, pois não houve evento no grupo com expressão de HER2 presente) (Figura 77).

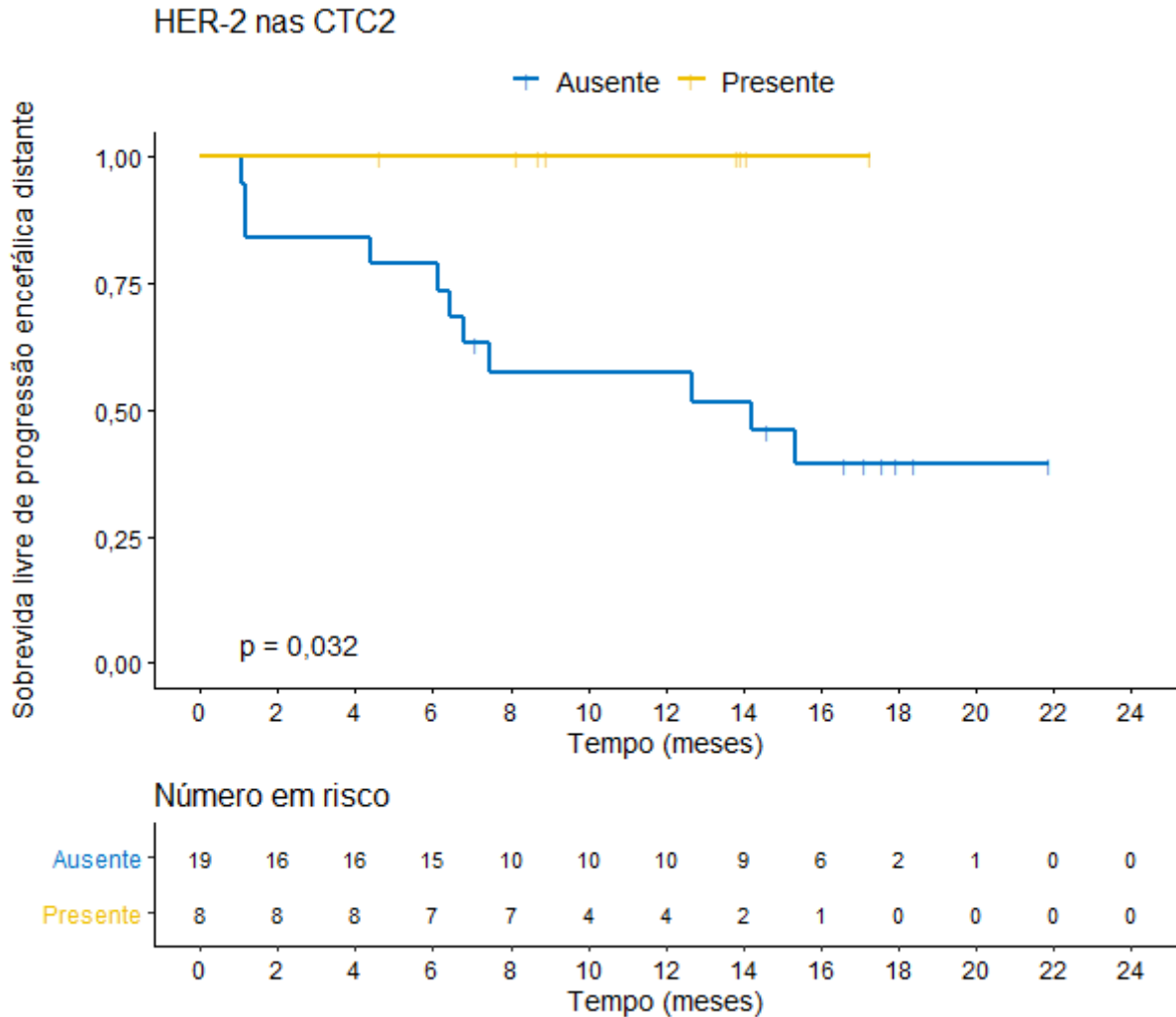


Figura 77 - SLPED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de HER2 nas CTC2.

Dentre as nove pacientes com expressão positiva de HER2, seja nas CTC1 ou nas CTC2, nenhuma evoluiu com PED e somente uma paciente, com imunofenótipo triplo negativo do tumor primário, faleceu por progressão de doença pulmonar no período de seguimento.

4.36 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE HER2 NA SLPED-ED

A SLPED-ED mediana não foi atingida nos dois grupos ($p = 0,42$; regressão de Cox não foi possível, pois não houve evento no grupo com expressão de HER2 presente) (Figura 78).

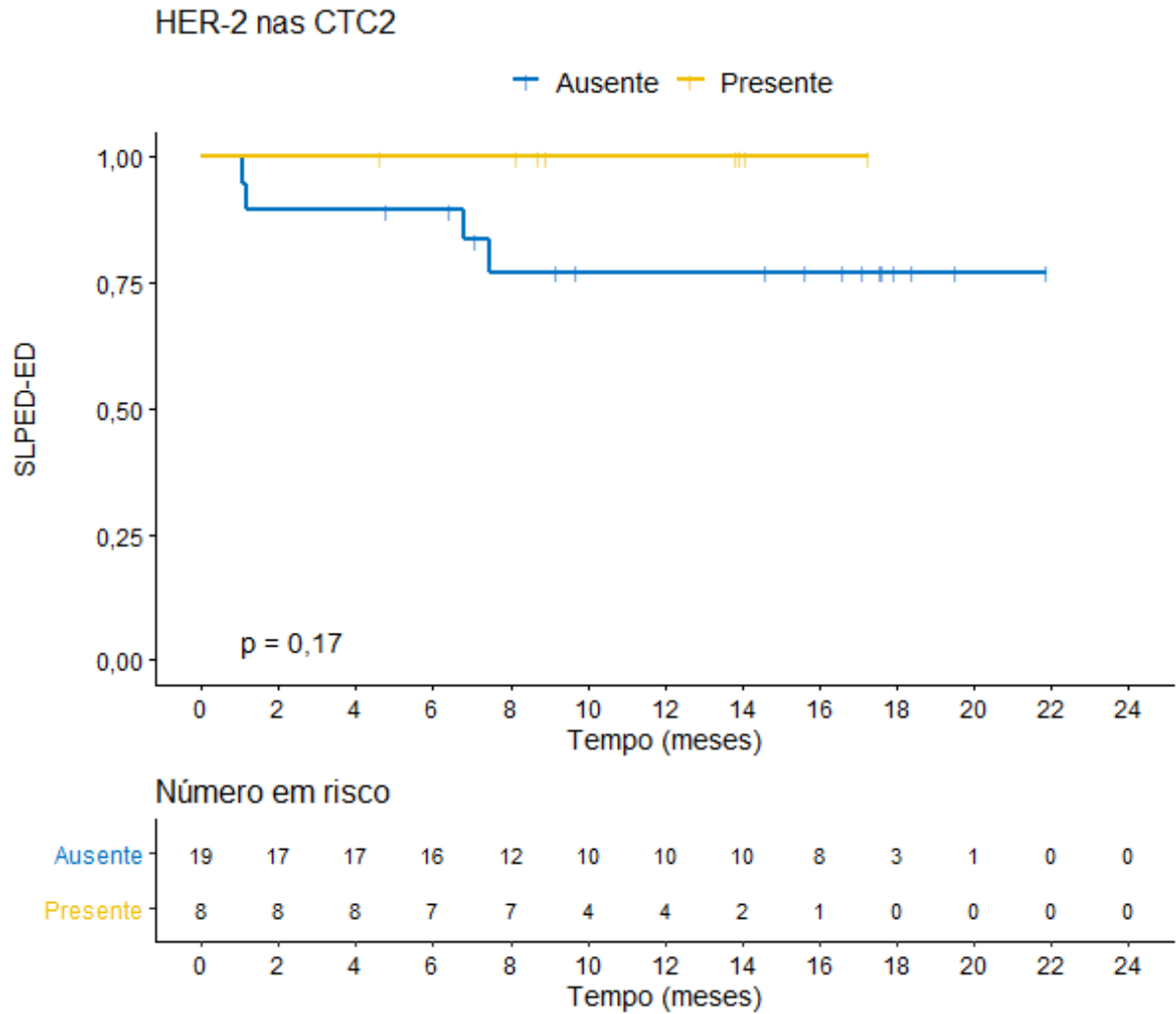


Figura 78 - SLPED-ED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de HER2 nas CTC1.

A SLPED-ED mediana não foi atingida nos dois grupos ($p = 0,17$; regressão de Cox não foi possível, pois não houve evento no grupo com expressão de HER2 presente) (Figura 79).

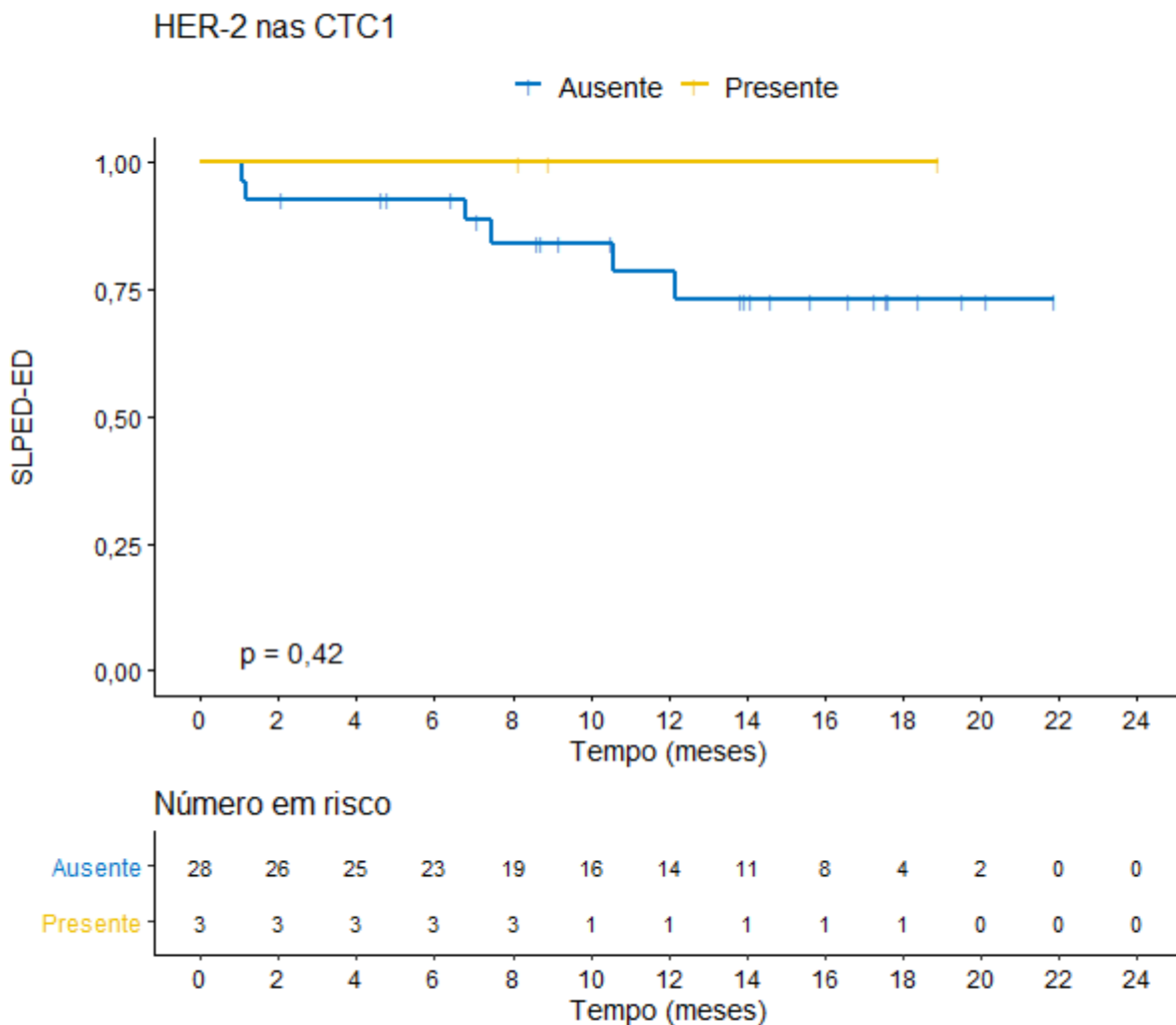


Figura 79 - SLPED-ED atuarial estratificada pelo *status* da expressão de HER2 nas CTC2.

4.37 IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE HER2 NA SG

A SG mediana não foi atingida nas pacientes com expressão presente e foi 17,1 meses nas pacientes com expressão ausente de HER2 nas CTC1 ($p = 0,22$; regressão de Cox não foi possível, pois não houve evento no grupo com expressão de HER2 presente) (Figura 80).

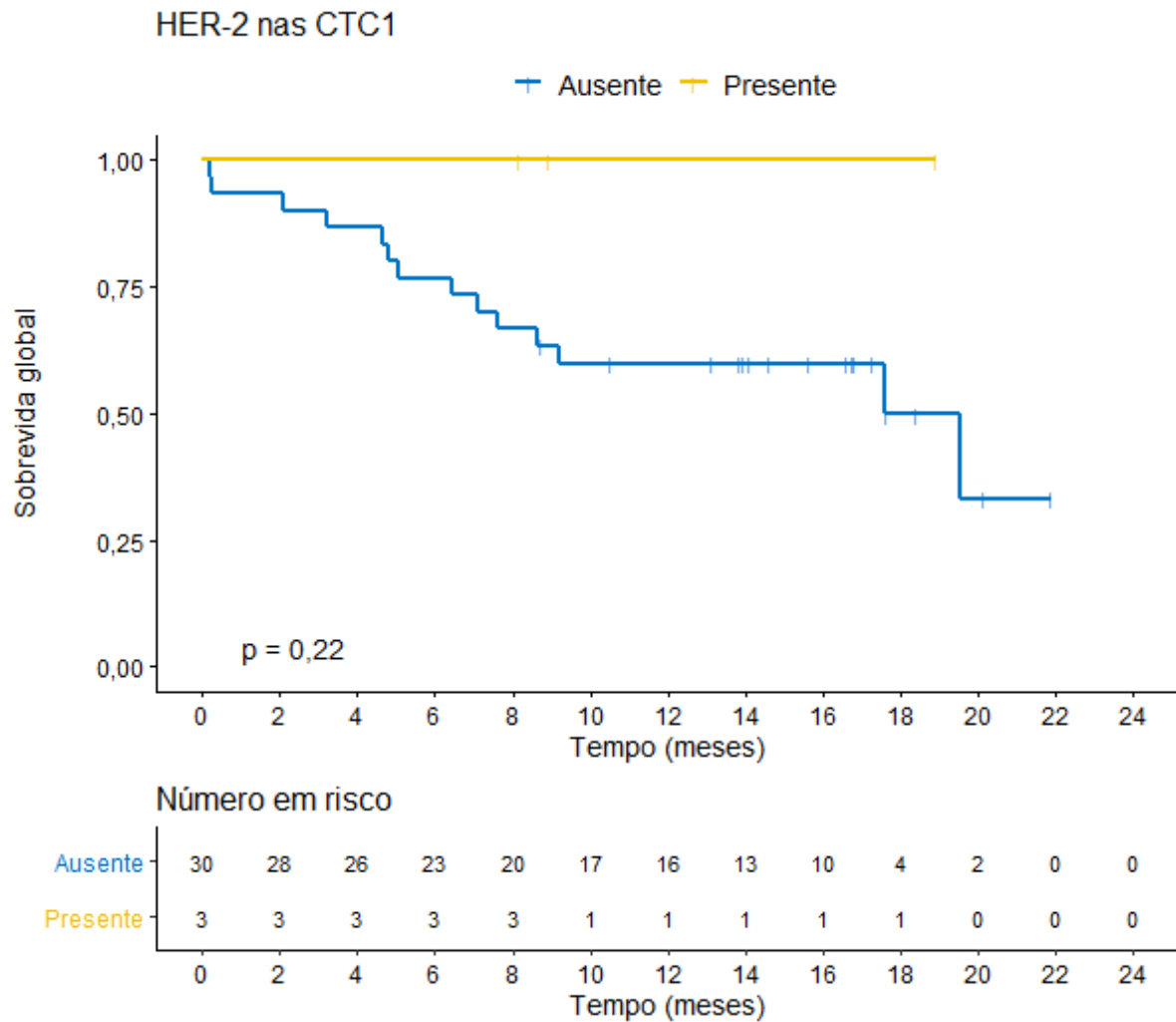


Figura 80 - SG atuarial estratificada pelo *status* da expressão de HER-2 nas CTC1.

A SG mediana não foi atingida nas pacientes com expressão presente e foi 17,6 meses nas pacientes com expressão ausente de HER2 nas CTC2 (HR = 0,30; IC95%:0,03–2,43; p = 0,26) (Figura 81).

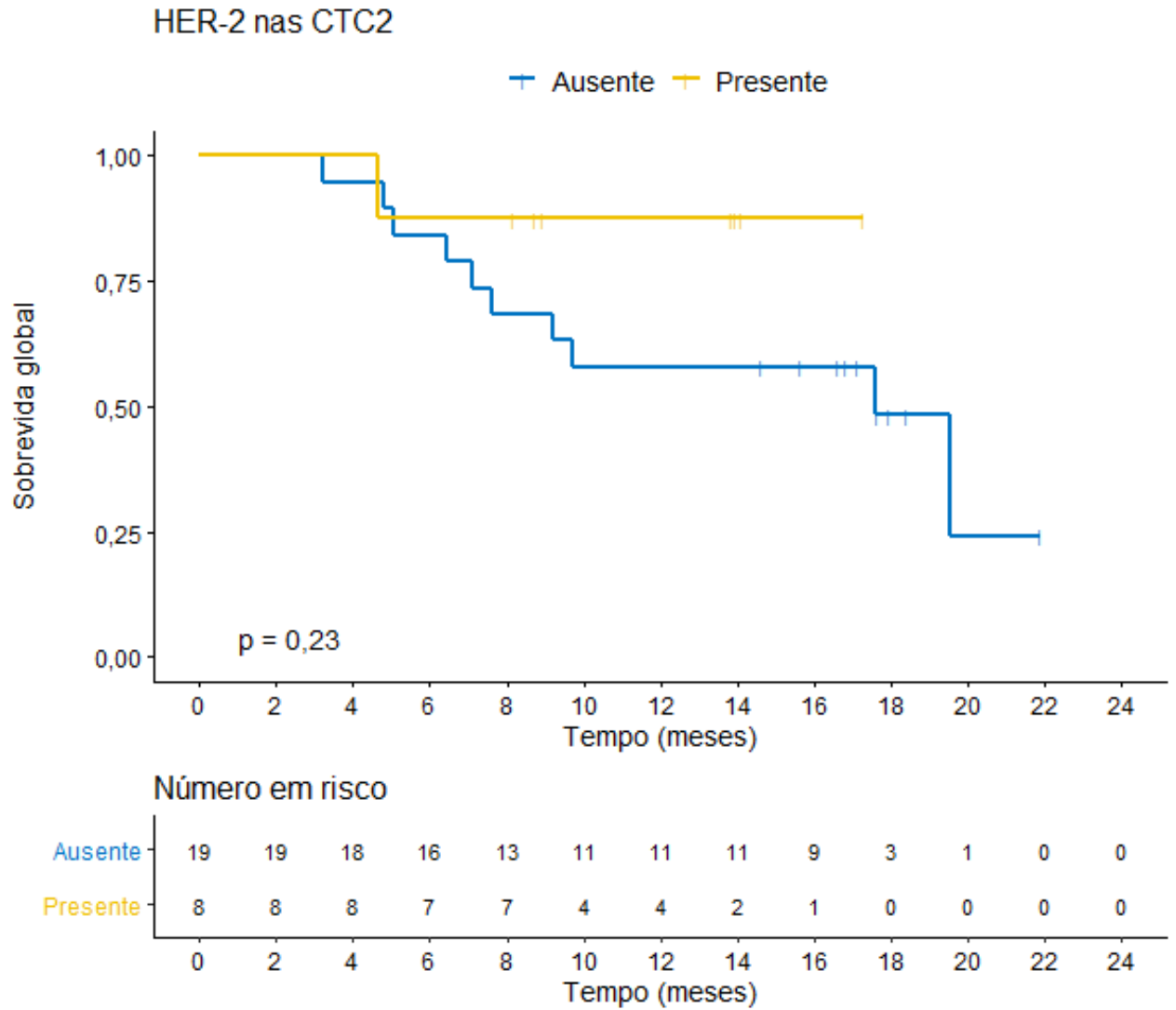


Figura 81 - SG atuarial estratificada pelo *status* da expressão de HER-2 nas CTC2.

4.38 FATORES PROGNÓSTICOS SIGNIFICATIVOS DE SLPED, SLPED-ED E SG

Os fatores prognósticos significativos de SLPED, SLPED-ED e SG estão listados abaixo (Tabela 7).

Tabela 7 – Fatores Prognósticos Significativos de SLPED, SLPED-ED e SG

Desfecho	Fatores Prognósticos
SLPED	CTC1 (\leq ou $>$ 0,5 CTC/mL) Imunofenótipo DS-GPA (\leq ou $>$ 3) Número de metástases encefálicas (\leq ou $>$ 5) NL/CTC2 (\leq ou $>$ 0,1) HER2 nas CTC2 (expressão ausente ou presente)
SLPED-ED	CTC1 (\leq ou $>$ 0,5 CTC/mL) Número de metástases encefálicas (\leq ou $>$ 6) NL/CTC1 (\leq ou $>$ 6,8)
SG	Imunofenótipo DS-GPA (\leq ou $>$ 2) NL/CTC1 (\leq ou $>$ 2,2)

4.39 MODELO DE REGRESSÃO MÚLTIPLO PARA SLPED

A fim de avaliar os possíveis fatores de risco para SLPED, o modelo de regressão de Cox foi ajustado aos dados. As variáveis significativas no modelo de Cox simples foram consideradas: número de ME (≤ 5 ou > 5), DS-GPA (≤ 3 ou > 3), imunofenótipo (triplo negativo, luminal B ou HER2) e contagem de CTC1 ($> 0,5$ ou $\leq 0,5$). A variável NL/CTC2 não foi considerada devido ao número limitado de pacientes com evento e a variável expressão de HER2 nas CTC2 não foi considerada pelo fato de não ter ocorrido nenhum evento no grupo com expressão de HER2.

As variáveis independentes mencionadas anteriormente foram inseridas no modelo

inicial e, a partir da técnica de seleção de variáveis *stepwise (backward)*, o modelo final foi obtido. A partir dos resultados, podemos dizer que o imunofenótipo e a contagem de CTC1 foram fatores prognósticos independentes significativos da SLPED (Tabela 7).

Tabela 8 – Estimativa dos parâmetros do modelo de Cox múltiplo para SLPED

Variável	Categoria	RR	IC (95%) para RR		valor p
			Inferior	Superior	
Imunofenótipo	Triplo Negativo	Ref			
	Luminal B	0,924	0,239	3,588	0,908
	HER2	0,128	0,025	0,645	0,013
CTC1	> 0,5	Ref			
	≤ 0,5	8,278	2,121	32,308	0,002

RR (razão dos riscos); Ref (categoria de referência)

Os modelos de regressão com as estimativas dos parâmetros do modelo de riscos proporcionais para PED e PED-ED, tendo óbito como risco competitivo, estão disponíveis nos Apêndices 4 e 5.

4.40 MODELO DE REGRESSÃO MÚLTIPLO PARA SLPED-ED

A fim de avaliar os possíveis fatores de risco para SLPED-ED, o modelo de regressão de Cox foi ajustado aos dados. As variáveis significativas no modelo de Cox simples foram consideradas: NL/CTC1 ($\leq 6,8$ ou $> 6,8$), número de ME (≤ 6 ou > 6) e contagem de CTC1 ($> 0,5$ ou $\leq 0,5$).

As variáveis independentes mencionadas anteriormente foram inseridas no modelo inicial e, a partir da técnica de seleção de variáveis *stepwise (backward)*, o modelo final foi obtido. A partir dos resultados, podemos dizer que a contagem de CTC1 foi o único fator prognóstico independente significativo da SLPED-ED (Tabela 8).

Tabela 9 – Estimativa dos parâmetros do modelo de Cox múltiplo para SLPED-ED

Variável	Categoria	RR	IC (95%) para RR		valor p
			Inferior	Superior	
CTC1	> 0,5	Ref			
	≤ 0,5	10,228	1,996	52,414	0,005

RR (razão dos riscos); Ref (categoria de referência)

4.41 MODELO DE REGRESSÃO MÚLTIPLO PARA SG

A fim de avaliar os possíveis fatores de risco para SLPED-ED, o modelo de regressão de Cox foi ajustado aos dados. As variáveis significativas no modelo de Cox simples foram consideradas: DS-GPA (variável contínua), imunofenótipo (triplo negativo, luminal B ou HER2) e NL/CTC1 ($> 2,2$ ou $\leq 2,2$).

As variáveis independentes mencionadas anteriormente foram inseridas no modelo inicial e, a partir da técnica de seleção de variáveis *stepwise (backward)*, o modelo final foi obtido. A partir dos resultados, podemos dizer que o imunofenótipo e NL/CTC1 foram fatores prognósticos independentes significativos da SG (Tabela 9).

Tabela 10 – Estimativa dos parâmetros do modelo de Cox múltiplo para SG

Variável	Categoria	RR	IC (95%) para RR		valor p
			Inferior	Superior	
Imunofenótipo	Triplo Negativo	Ref			
	Luminal B	0,224	0,062	0,816	0,023
	HER2	0,073	0,018	0,288	<0,0001
NL/CTC1	> 2,2	Ref			
	$\leq 2,2$	0,159	0,050	0,505	0,002

RR (razão dos riscos); Ref (categoria de referência)

5 DISCUSSÃO

5.1 PACIENTES

Em se tratando de um estudo prospectivo envolvendo pacientes com ME de câncer da mama candidatas à radioterapia focal dentro de um contexto pragmático e com abordagem multidisciplinar atual, há a oportunidade de avaliarmos e validarmos os dados demográficos e clínico-patológicos encontrados.

Nesta coorte, a idade mediana foi 54 anos e o imunofenótipo mais frequente foi o HER2-positivo, em 51%, seguido do luminal B e triplo negativo, em 31% e 18% das pacientes, respectivamente. A idade mediana e a ordem de frequência dos imunofenótipos observadas foram similares às do estudo que refinou o DS-GPA para câncer da mama e relatou idade mediana de 53 anos e frequência dos imunofenótipos de 31%, 26%, 24% e 20% para HER2-positivo, luminal B, triplo negativo e luminal A, respectivamente (Sperduto et al. 2012). A diferença entre as séries é que, neste estudo, a proporção da frequência do imunofenótipo HER2-positivo entre as pacientes com ME foi maior, 51% *versus* 31%. De fato, maior incidência de ME em pacientes com imunofenótipo HER2-positivo tratadas com trastuzumabe tem sido relatada em publicações mais recentes, o que provavelmente está relacionada ao aumento da SG consequente à melhora do controle sistêmico proporcionada pela droga (Witzel et al. 2016).

A maior proporção de pacientes com imunofenótipo HER2-positivo e melhor *performance status*, como resultado da evolução das opções de tratamento sistêmico e consequente incremento do controle da doença, observados nesta série são fatores que podem explicar a maior proporção de pacientes com DS-GPA favorável, posto que o DS-GPA foi de 2,5-4 em 82,5% das pacientes. A mesma tendência foi observada em uma série recente de pacientes com 1-10 ME tratadas com RC entre 2012 e 2017, na qual o DS-GPA foi de 2,5-4 em 55% das pacientes com câncer da mama (Nagtegaal et al. 2019).

5.2 RADIOTERAPIA

A RTHE foi o método mais utilizado no manejo das ME por várias décadas e essa tendência mudou rapidamente na última década devido à preocupação com o seu impacto

cognitivo deteriorante associado (Suh et al. 2020). Pelo mesmo motivo, a estratégia de protelar a RTHE e empregar múltiplos cursos de radioterapia focal para o tratamento de novas ME pode ser empregada de maneira segura e efetiva (Schultz et al. 2015).

Radioterapia focal como abordagem primária foi realizada em 18 pacientes (46%), como resgate após RTHE em 8 (20%) e resgate após tratamento focal inicial (cirurgia, RC ou RTEHF) em 13 (33%) das 39 pacientes.

A modalidade de radioterapia focal mais utilizada foi a RC, realizada em 27 (69,2%) pacientes com dose média de 20 Gy. As demais 12 pacientes receberam RTEHF com dose média de 27,5 Gy em 5 frações. As doses médias empregadas com RC e RTEHF correspondem a uma dose biológica efetiva, com α/β de 12 Gy (BED_{12}), equivalente a 40 Gy, o que está associada a um controle local em 12 meses acima de 70% (Wiggenraad et al. 2011).

Além da dose prescrita, o volume mediano das lesões tratadas está associado ao controle local. Nesta série, o volume mediano das 97 lesões avaliáveis dentre as 119 lesões irradiadas foi 0,9 cc. Wolf et al. (2018), em um estudo prospectivo observacional de 220 pacientes com 1237 ME submetidos à RC, relataram um controle local de 100% em lesões com volume menor do que 0,1 cc ou diâmetro menor do que 6 mm. Em lesões com volume de 0,5–1 cc ou diâmetro menor do que 10,1–15 mm, similares ao volume mediano deste estudo, a dose mediana prescrita foi de 18 Gy e o controle local em 12 e 18 meses foi de 100 e 89%, respectivamente.

Portanto, a dose média prescrita (20 Gy com RC e 27,5 Gy com RTEHF) e o volume mediano (0,9 cc) das ME irradiadas nesta série são os prováveis determinantes da SLPEL de 100% em 6 meses, 97,93% em 12 meses e 96,89% em 24 meses.

5.3 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

As CTCs são fator prognóstico independente de SLP e SG no câncer da mama metastático (Cristofanilli et al. 2004; 2019). Entretanto, as CTCs são indetectáveis em cerca de 30–35% dessas pacientes (Riethdorf et al. 2007; Huebner et al. 2018) e em aproximadamente 50% das pacientes com ME (Pierga et al. 2013).

Neste estudo, a taxa de detecção foi de 100% nas 39 pacientes avaliadas antes e de 97% nas 35 pacientes avaliadas após a radioterapia focal. As altas taxas de detecção podem estar relacionadas ao método ISET de isolamento por filtração das CTCs quando comparado ao método *CellSearch*, que é o mais utilizado e baseado na separação de células expressoras de marcadores epiteliais (Farace et al. 2011; Huebner et al. 2018).

Um método confiável para identificar as CTCs deve apresentar, idealmente, alta sensibilidade e especificidade clínica e analítica, requisitos que são fortemente influenciados pela escolha dos anticorpos e ensaios imunocitoquímicos. Portanto, um método que se utiliza da expressão de EpCAM como mecanismo primário para a seleção positiva das CTCs terá uma sensibilidade limitada devido à expressão heterogênea dessas moléculas (Riethdorf et al. 2007). As CTCs que passam pela TEM sofrem alterações fenotípicas reversíveis a fim de alcançar a intravasão, sobrevida intravascular e extravasão. Ao adquirirem o fenótipo mesenquimal, as CTCs perdem as características epiteliais, com redução ou ausência da expressão de EpCAM e/ou citoqueratinas, e essa subpopulação mais agressiva e clinicamente relevante não é reconhecida pelos métodos de identificação de CTCs que sejam dependentes de marcadores epiteliais (Tayoun et al. 2019).

O número mediano da contagem de CTC1 foi 2 células/mL e o de CTC2 foi 2,33 células/mL nas 35 pacientes com 2 coletas ($p = 0,357$). Neste estudo, a realização da radioterapia focal entre as coletas não alterou significativamente o número de CTCs, uma vez que todos os outros fatores foram reproduzidos em cada coleta, inclusive o intervalo mínimo de 7 dias desde o último tratamento sistêmico. Além do método aplicado para a detecção, outros fatores podem influenciar o número de CTCs, como, por exemplo, o tipo de punção (venosa ou arterial), período do dia e até mesmo a eventual mobilização de CTCs por intervenção terapêutica, como biópsia, cirurgia ou radioterapia (Fabisiewicz et al. 2020).

Martin et al. (2014) observaram o aumento do número de CTCs após o início da radioterapia em pacientes com câncer do pulmão de células não-pequenas com doença locorregional e metastática; além disso, relataram aumento da capacidade proliferativa dessas CTCs. Embora não se tenha estabelecida uma ligação direta entre o surgimento de metástases e a mobilização das CTCs pelo início tratamento, esses achados indicam uma associação entre eles. Em relação à radioterapia, a maior mobilização das CTCs foi verificada na fase inicial, com dose subletal e em fracionamento convencional. É provável que, com o escalonamento de dose, a mobilização ou o número de CTCs viáveis seja menor. Porém, há ausência de dados a respeito da associação entre dose ablativa de radioterapia e a mobilização das CTCs (Martin et al. 2017). Sendo assim, os achados do nosso estudo ajudam a compor o corpo de evidência da possível ausência de relação entre radioterapia com dose ablativa e a mobilização das CTCs.

A avaliação da expressão de moléculas mediadoras da passagem das CTCs através da barreira hemato-encefálica (COX2, EGFR e ST6GALNAC5), marcadoras da TEM (NOTCH1) e HER2 por imunocitoquímica foi realizada em todas as pacientes com CTCs detectáveis em cada coleta. A detecção de múltiplas proteínas por imunocitoquímica é um processo desafiador,

principalmente pela variação da sensibilidade e risco de reações cruzadas entre os diferentes anticorpos (Keller e Pantel 2019). Neste estudo, a avaliação imunocitoquímica não foi automatizada e as CTCs foram analisadas separadamente para cada biomarcador. Tal fato elimina o risco de reação cruzada; por outro lado, há o risco de não se observar CTCs em cada um dos *spots* para os diferentes biomarcadores, o que justifica a variação do número de pacientes testadas para cada um deles, de 18 a 32, dentre as 39 avaliadas. Portanto, a variação do número de pacientes testadas foi uma limitação para avaliação da alteração da frequência de expressão dos biomarcadores.

Especificamente em relação à expressão do HER2 nas CTCs, quase metade das pacientes testadas apresentou discordância em relação ao imunofenótipo do tumor primário, tanto na coleta inicial (discordância em 15 das 32 pacientes testadas) quanto na coleta final (discordância em 14 das 27 pacientes testadas). A taxa de pacientes com tumor primário imunofenótipo HER2-negativo e CTCs com HER2-positivo foi 12% e 46% e a taxa de pacientes com tumor primário imunofenótipo HER2-positivo e CTC com HER2-negativo foi 93% e 86% nas coletas inicial e final, respectivamente. Fehm et al. (2010), em um estudo prospectivo e multicêntrico, avaliaram o *status* do HER2 nas CTCs e compararam dois métodos de detecção das CTCs em 254 pacientes com câncer da mama metastático. A taxa de pacientes com tumor primário imunofenótipo HER2-negativo e CTCs com HER2-positivo foi 32% e 49% e a taxa de pacientes com tumor primário imunofenótipo HER2-positivo e CTCs com HER2-negativo foi 42% e 59% com os métodos *CellSearch* e *AdnaTest BreastCancer*, respectivamente.

Não é possível definir se a mudança do *status* da expressão do HER2 nas CTCs ocorreu devido à eventual inacurácia dos métodos de avaliação, seja no tumor primário ou nas CTCs, ou se foi devido ao crescimento de subclones HER2-positivos inicialmente presentes no tumor primário HER2-negativo ou à supressão clonal de CTCs HER2-positivas pelo tratamento sistêmico empregado. Entretanto, observamos que a taxa de discordância entre o imunofenótipo do tumor primário e as CTCs nesta série oscilou entre os momentos das coletas e foi similar ao observado na literatura, com exceção das pacientes com tumor primário HER2-positivo e CTCs com HER2-negativo, que apresentaram taxas de 93% e 86% nas coletas inicial e final, respectivamente. O fato de 17 das 20 pacientes com imunofenótipo HER2-positivo estarem na vigência de terapia anti-HER2, sendo oito delas até com duplo bloqueio, talvez justifique a alta taxa de discordância pela inibição do subclone de CTCs com imunofenótipo HER2-positivo.

Jordan et al. (2016) analisaram CTCs de 19 mulheres com câncer da mama metastático com receptor de estrógeno-positivo e HER2-negativo e observaram que 84% adquiriu expressão do HER2 nas CTCs. A cultura dessas CTCs evidenciou subclones com

imunofenótipo HER2-negativo e positivo que podem se interconverter espontaneamente; além disso, mostrou ativação do NOTCH nas CTC com imunofenótipo HER2-negativo. A inibição do HER2 com o uso do lapatinibe levou ao aumento da expressão do NOTCH1. Embora ambos os imunofenótipos tenham apresentado potenciais de iniciação tumoral comparáveis, a proliferação diferencial favoreceu o *status* HER2-positivo, enquanto o *stress* oxidativo ou quimioterapia citotóxica estimularam a transição para o *status* HER2-negativo. No nosso estudo, 21 das 32 (66%) pacientes testadas na coleta inicial e 14 das 27 (52%) testadas na coleta final apresentaram expressão inversa entre HER2 e NOTCH1.

A expressão de NOTCH1 no nosso estudo foi observada em 19 das 32 (59,4%) pacientes testadas na coleta inicial e em 16 das 27 (59,3%) testadas na coleta final. Boral et al. (2017) revelaram expressão do NOTCH1 em 72% das CTCs das pacientes com ME e em 24% das CTCs das demais pacientes.

A expressão do EGFR nas CTCs EpCAM-negativas está associada a um maior risco de progressão metastática para o encéfalo (Zhang et al. 2013). Rimawi et al. (2010) verificaram o *status* do EGFR nos tumores primários da mama de 2567 pacientes e identificaram expressão do EGR em 18% delas, sendo mais comum em jovens e negras e associada a alta taxa de proliferação, instabilidade genômica e hiperexpressão de HER2. Na nossa série, a expressão de EGFR foi observada em 6 das 28 (21,4%) pacientes testadas na coleta inicial e em 9 das 18 pacientes (59%) testadas na coleta final. Entretanto, não houve relação com a expressão de HER2 nas CTCs, uma vez que somente uma das seis pacientes com expressão do EGFR apresentou expressão do HER2 na coleta inicial e somente duas das nove pacientes com expressão do EGFR apresentaram expressão do HER2 na coleta inicial.

A enzima COX2 está associada à migração intercompartimental entre o encéfalo, líquido e circulação sistêmica e pode representar um importante mecanismo de evasão e persistência tumoral das CTCs pelo mecanismo de auto-semeadura (Allen et al. 2014). Em uma série populacional de 1576 pacientes com câncer da mama, Ristimäki et al. (2002) observaram alta expressão de COX2 em 37,4% dos tumores e que foi associada a pior SLP da doença à distância ($p < 0,0001$). Na nossa série, houve alta frequência da expressão de COX2 nas CTCs avaliadas, que foi observada em 27 das 28 (96,4%) pacientes testadas na coleta inicial e em 24 das 25 pacientes (96 %) testadas na coleta final.

A molécula ST6GALNAC5 é uma mediadora específica da passagem das CTCs pela barreira hemato-encefálica, mas sua suprarregulação em células de câncer da mama diminuiu sua adesão ao componente endotelial em um modelo *in vitro* da barreira hemato-encefálica (Drolez et al. 2016; Pedrosa et al. 2018). Na nossa série, a expressão de ST6GALNAC5 nas

CTCs foi observada em 14 das 26 (53,8%) pacientes testadas na coleta inicial e em 12 das 18 pacientes (66,7 %) testadas na coleta final.

5.4 SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO ENCEFÁLICA DISTANTE

A estimativa da SLPED e sua correlação com fatores clínicos e biológicos tem potencial impacto na decisão entre radioterapia focal e RTHE e consequente otimização do controle da doença encefálica. Torna-se ainda mais oportuna essa definição com a evidência recente do estudo fase III NRG CC001, que mostrou a possibilidade de mitigar o efeito cognitivo da RTHE ao utilizar a técnica de radioterapia de intensidade modulada para preservação do hipocampo, além da memantina. Esse estudo comparou o impacto cognitivo da RTHE e memantina com a RTHE associada à preservação hipocampal e memantina. Este braço evoluiu com redução significativa do impacto cognitivo (HR = 0,74; IC95%:0,58–0,95; $p = 0,02$), mas sem diferença em relação à SLPED mediana (5,3 *versus* 5,0 meses, respectivamente; HR = 1,14; IC95%:0,93–1,41; $p = 0,21$) e SG mediana (7,6 *versus* 6,3 meses, respectivamente; HR = 1,13; IC95%:0,90–1,41; $p = 0,31$), quando comparado ao outro grupo, após um seguimento mediano de 7,9 meses (Brown et al. 2020).

Dentre as 39 pacientes tratadas neste estudo, 36 foram avaliáveis para SLPED após um seguimento mediano de 14,6 meses. A SLPED mediana foi 15,3 meses (IC95%: 12,2–não atingida). Ao estratificarmos pela contagem de CTC1, a SLPED mediana foi 6 meses nas pacientes com $CTC1 \leq 0,5$ CTC/mL e não atingida nas pacientes com $CTC1 > 0,5$ CTC/mL (HR = 4,97; IC95%:1,48–16,69; $p = 0,0041$). Se considerarmos o óbito como risco competitivo, a incidência cumulativa de PED aos 6 meses foi 40% nas pacientes com $CTC1 \leq 0,5$ CTC/mL e 8,82% nas pacientes com $CTC1 > 0,5$ CTC/mL ($p = 0,007$). Não houve correlação significativa entre a contagem de CTC2 e a SLPED.

A associação entre menor número de CTC1 e menor SLPED vai de encontro ao que os principais estudos com CTCs em pacientes com câncer da mama metastático têm demonstrado. Cristofanilli et al. (2004) evidenciaram, em um estudo prospectivo e multicêntrico com dosagem de CTCs antes e após nova linha de tratamento sistêmico em pacientes com câncer da mama metastático, que o número de CTCs antes do tratamento foi um fator prognóstico independente da SLP e SG. Bidard et al. (2104) e Cristofanilli et al. (2019), em análises retrospectivas multi-institucionais de dados individuais de milhares de pacientes com câncer da mama metastático e CTC detectadas pelo método *CellSearch*, mostraram associação entre maior número de CTCs e menor SLP e SG.

Entretanto, os resultados dos escassos estudos referentes à associação do número de CTCs e presença ou controle de ME, especificamente em pacientes com câncer da mama, são mais heterogêneos. PIERGA et al. (2013) avaliaram CTCs de pacientes com ME de câncer da mama HER2-positivo sem RTHE prévia e que participaram de um estudo fase II que investigou a eficácia da terapia sistêmica com a combinação de lapatinibe e capecitabina nas ME (LANDSCAPE *trial*). As CTCs foram detectadas pelo método *CellSearch* antes e 21 dias após o início do tratamento (D21), ainda antes do segundo ciclo. Dentre as 38 pacientes com CTC avaliáveis no D21, a taxa de resposta objetiva no SNC foi significativamente maior (80% *versus* 21%, $p = 0,01$) em pacientes sem evidência de CTCs quando comparada às pacientes com CTCs. A SG em 1 ano foi de 83,9% em pacientes sem CTCs no D21 e 42,9% nas pacientes com CTC ≥ 1 ($p = 0,02$). O tempo mediano para progressão, definida como o aumento das lesões existentes $\geq 40\%$ ou o surgimento de novas lesões intra ou extraencefálicas, foi 6 meses *versus* 4,3 meses nas pacientes sem ou com CTCs antes do início do tratamento, respectivamente ($p = 0,11$), e 5,6 meses *versus* 2,8 meses nas pacientes sem ou com CTCs no D21, respectivamente ($p = 0,25$). Apesar do pequeno número de pacientes, os resultados de SG foram similares aos encontrados nos estudos estudos seminais (Cristofanilli et al. 2004, 2019; Bidard et al. 2014). Porém, o desfecho tempo de progressão, que engloba a avaliação de novas lesões encefálicas, não apresentou relação significativa com o número de CTCs, antes ou após o tratamento.

Mego et al. (2011) fizeram uma análise retrospectiva de 292 pacientes consecutivas com câncer da mama metastático com o objetivo de avaliar os fatores prognósticos nas pacientes com CTCs indetectáveis. As CTCs foram enumeradas antes do início de uma nova linha de tratamento sistêmico através do método *CellSearch* e não foram detectadas em 105 (35,96%) pacientes, enquanto 119 (40,75%) pacientes apresentaram CTCs ≥ 5 . Após um seguimento mediano de 17,7 meses, pacientes com CTCs indetectáveis tiveram SG significativamente superior às pacientes com CTCs ≥ 5 (HR = 0,61; IC95%:0,42-0,90; $p = 0,01$). Somente 22 (7,5%) pacientes no estudo tinham ME; entretanto, as CTCs foram indetectáveis em 70% dessas pacientes. O *status* de CTCs indetectáveis foi positivamente relacionado com a presença de ME (HR = 6,17; IC95%:2,14-17,79; $p = 0,001$) e inversamente relacionado com a presença de metástases ósseas (HR = 0,47; IC95%:0,27-0,80; $p = 0,01$).

De maneira similar ao estudo de Mego et al. (2011), Hanssen et al. (2018) identificaram que pacientes com ME de câncer do pulmão tiveram um número reduzido de CTCs detectadas pelo método *CellSearch* ($n = 52$, 12,5% ≥ 2 e 8,9% ≥ 5 CTCs), especialmente naqueles com ME como único sítio de doença metastática, definidos como doença oligometastática ($n = 34$,

5,9% ≥ 2 e 2,9% ≥ 5 CTC). Também, valores de corte de CTCs ≥ 2 ou ≥ 5 foram fatores prognósticos independentes de pior SG.

Dentre os poucos estudos publicados, acima descritos, que correlacionaram a contagem de CTCs com a presença de ME, observou-se uma relação entre ME e número menor de CTCs. O único estudo que descreveu um desfecho que permite inferência do controle da doença encefálica foi o publicado por Pierga et al. (2013), que não mostrou diferença significativa no tempo mediano para progressão entre as pacientes sem ou com CTCs antes do início do tratamento. Neste estudo, utilizamos a SLPED como desfecho para avaliar o controle da doença encefálica, que é o desfecho utilizado nos principais estudos que desenvolveram nomogramas para a estimativa do risco de PED precoce (Ayala-Peacock et al. 2017; Press et al. 2017). Até a elaboração desta discussão, não se encontrou nenhum estudo publicado que avaliasse a relação entre CTCs e controle das ME em pacientes submetidos a tratamento focal; além disso, o fato deste estudo ter sido desenvolvido em um contexto pragmático torna ainda mais relevante nossos achados.

Sperduto et al. (2020), em uma recente atualização do DS-GPA em pacientes com ME de câncer da mama tratadas entre 2006 e 2017, observaram um menor tempo entre o diagnóstico do tumor primário e o surgimento de ME nas pacientes sem doença extra-encefálica quando comparadas àquela com doença extra-encefálica presente. Ao descreverem essa interessante observação, sugeriram que algumas pacientes poderiam ter ME oculta ao diagnóstico de um câncer da mama inicial não adequadamente tratadas pela terapia sistêmica ou ter um câncer de mama com um fenótipo com tropismo para o desenvolvimento de ME.

O achado da associação significativa entre menor número de CTC1 e pior controle da doença encefálica com menor SLPED neste estudo pode ser definido como contraintuitivo e, eventualmente, ter sido enviesado pelo número limitado de pacientes avaliados. Contudo, algumas hipóteses com plausibilidade biológica devem ser consideradas. É plausível, por exemplo, que micrometástases encefálicas já estivessem presentes na fase precoce da progressão neoplásica e que, portanto, o número de CTCs não reflita a real atividade da doença no encéfalo no momento da avaliação. Em nossa série, apenas 4 das 39 pacientes foram detectadas com ME no mesmo momento ou até 4 meses após o diagnóstico do câncer primário da mama, o que torna inviável uma comparação entre dois grupos com diferentes momentos de progressão da doença para o encéfalo. Outra possibilidade é que a barreira hemato-encefálica restrinja o retorno das CTCs para a circulação sanguínea sistêmica, conforme sugerido por Mego et al. (2011). Entretanto, somente seis mulheres neste estudo tinham ME exclusivas. Além disso, em pacientes com ME, a barreira hemato-tumoral é mais permeável que a barreira

hemato-encefálica e, portanto, a passagem das CTCs não seria tão comprometida (Arvanitis et al. 2020). Há, ainda, a possibilidade da terapia anti-HER2, vigente em quase metade das pacientes, ter normalizado o número de CTCs durante o tratamento, também de acordo com o que foi aventado por Mego et al. (2011).

Recentemente, Zhang et al. (2020) demonstraram, em um modelo experimental de ME originárias de linhagens celulares de câncer da mama e melanoma em camundongos, que neutrófilos imunossupressores infiltrados no encéfalo propiciam um ambiente pré-metastático e que sua quantidade foi diretamente associada à proliferação celular tumoral das ME de câncer da mama. Portanto, é possível que o ambiente pré-metastático mais ávido de algumas das pacientes com ME recrute mais CTCs da circulação e, por consequência, justifique a relação inversa entre o número de CTCs e PED.

Adicionalmente, a ausência ou menor número de CTCs na circulação periférica não exclui a possibilidade de que as CTCs sejam liberadas por uma lesão tumoral em progressão e imediatamente aprisionadas no primeiro leito capilar adiante. Esse cenário seria consistente com uma alta habilidade das CTCs em disseminar a sítios distantes e aderir às células endoteliais nos capilares antes de atingir a periferia, possivelmente levando ao estabelecimento de novas metástases (Aceto 2019). Nesse contexto, é plausível ponderarmos que, além da quantidade, a análise qualitativa pode refinar o prognóstico do controle da doença encefálica.

A avaliação da cinética das CTCs tem sido utilizada na monitorização da resposta ao tratamento do câncer da mama. Neste estudo, não houve correlação entre a razão CTC2/CTC1, com o valor do ponto de corte sugerido em 0,3, e a SLPED. Yan et al. (2017) realizaram uma metanálise de estudos publicados com a mensuração das CTCs antes e após o tratamento em pacientes com câncer da mama e observaram uma redução significativa da taxa de positividade das CTCs, seja definida como ≥ 1 CTC/7,5 mL ou ≥ 5 CTC/7,5 mL, após o tratamento (HR = 0,68; IC95%:0,61-0,76; $p < 0,00001$). A redução da positividade das CTCs foi associada à menor probabilidade de progressão da doença (OR = 0,54; IC95%:0,33-0,89; $p = 0,01$), maior SG (diferença média = 11,61 meses, IC95%:8,63-14,59; $p < 0,00001$) e maior SLP (diferença média = 5,07 meses, IC95%:2,70-7,44; $p < 0,0001$). Entretanto, análises de subgrupo revelaram que tratamentos sistêmicos com finalidade neoadjuvante, adjuvante ou na doença metastática reduziram a positividade das CTCs, mas a cirurgia não provocou alteração. Em se tratando de uma abordagem local, como a cirurgia, a radioterapia focal realizada em nosso estudo provavelmente pouco influenciaria na quantidade de CTCs.

O imunofenótipo do tumor primário foi correlacionado à SLPED neste estudo. A SLPED mediana foi 7 meses nas pacientes com imunofenótipo triplo negativo e não foi atingida

nas pacientes com imunofenótipo luminal B (HR = 0,20; IC95%:0,04–0,94; p = 0,04) e HER2-positivo (HR = 0,25; IC95%:0,07–0,89; p = 0,03). Miller et al. (2017) fizeram uma análise retrospectiva de 547 pacientes com ME de câncer da mama e, entre as aquelas que receberam RC sem RTHE associada, a incidência cumulativa de ME distante em 1 ano foi 24% para luminal A (IC95%, 8%-41%), 38% para luminal B (IC95%, 13%-62%), 53% para HER2-positivo (IC95%, 26%-81%) e 34% para triplo negativo (IC95%, 18%-49%), sem diferença significativa entre as mesmas (p = 0,87). Vern-Gross et al. (2012) avaliaram, retrospectivamente, 154 pacientes com ME de câncer da mama submetidas à RC e o imunofenótipo foi fator preditivo da SLPED em 1 ano, com taxas de 24%, 53%, 53% e 64% nos imunofenótipos, triplo negativo, luminal A/B, HER2 e luminal HER2, respectivamente (p < 0,001). O imunofenótipo triplo negativo também foi correlacionado à pior SLPED em nossa série, mas não observamos o mesmo nas pacientes com imunofenótipo HER2-positivo, embora estejam mais propensas a progredir com ME, conforme discutido anteriormente. A radioterapia focal realizada e a quebra da barreira hemato-encefálica associada pode ter propiciado a penetração da terapia anti-HER2 no SNC (Stemmler et al. 2007). Tal fato justificaria a maior SLPED nesse subgrupo.

Observou-se correlação significativa entre a SLPED e o DS-GPA neste estudo. A SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com DS-GPA > 3 e foi 7,47 meses nas pacientes com DS-GPA ≤ 3 (HR = 0,34; IC95%:0,12–0,95; p = 0,04). Até o momento desta revisão, não se identificou nenhum estudo que mostrasse associação entre o DS-GPA, índice prognóstico elaborado para a estimativa da SG, e o controle da doença encefálica. Um dos motivos é que os principais grupos que elaboraram nomogramas com fatores preditivos para estimar o risco de PED os fizeram com ME originárias de diferentes sítios primários (Ayala-Peacock et al. 2017, Press et al. 2017). Tendo em vista a maior SLPED nas pacientes com imunofenótipo HER2-positivo e que este é um dos três fatores que compõem o DS-GPA, é provável que o imunofenótipo tenha contribuído para essa correlação entre o DS-GPA e a SLPED.

Diferentemente do DS-GPA, diversos estudos mostraram a associação entre o número de ME e o controle da doença encefálica. Em nossa série, a SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com ≤ 5 lesões e foi 10,6 meses nas pacientes com > 5 lesões (HR = 3,60; IC95%:1,08–12,05; p = 0,037). O maior número de ME como fator preditivo de pior SLPED em pacientes submetidos à radioterapia focal inicial foi demonstrado em diferentes avaliações multi-institucionais (Ayala-Peacock et al. 2017, Press et al. 2017). Mctyre et al. (2018) avaliaram 2657 pacientes provenientes de 8 centros acadêmicos tratados com RC isolada como abordagem inicial das ME e, após análise multivariada de riscos competitivos dos fatores

preditivos de SLPED, identificaram o número crescente de ME como principal fator preditivo da progressão encefálica distante, com maior número de ME no momento da falha e maior probabilidade de RTHE de resgate precoce.

A necessidade da identificação de fatores de risco associados à SLPED ou ao tempo para a indicação de RTHE de resgate, com o intuito de auxiliar a decisão entre RT focal ou RTHE, levou ao desenvolvimento de nomogramas, já descritos, e, mais recentemente, de uma nova métrica denominada velocidade de ME (VME). A VME foi definida como o número cumulativo de novas ME que surgem no período, em anos, desde a primeira RC e elaborada a partir de uma base de dados de 737 pacientes tratados com RC sem RTHE entre 2000 e 2014 em única instituição (Farris et al. 2017). A VME classificada como baixa (<4) foi correlacionada, após análise multivariada, à maior SG ($p < 0,0001$), menor necessidade de RTHE de resgate ($p = 0,02$) e morte neurológica ($p = 0,008$) após progressão encefálica distante depois da RC isolada. Dentre as 53 pacientes com ME de câncer da mama, uma análise exploratória mostrou que o imunofenótipo HER2-positivo foi associado à menor VME. A VME foi validada em um estudo multi-institucional com 2092 pacientes provenientes de nove centros acadêmicos (Mctyre et al. 2020). Embora seja uma potencial ferramenta para o auxílio na tomada de decisão, a VME foi elaborada a partir de uma coorte retrospectiva de pacientes com diferentes tumores primários tratados em um período prolongado e, objetivamente, somente possível de calcular após a primeira RC. Por esse motivo, o mesmo grupo desenvolveu uma nova métrica, denominada VME inicial, que foi calculada como o número de ME no momento da primeira RC dividido pelo período, em anos, do diagnóstico inicial do câncer até a primeira RC e mostrou correlação com VME e SG (Soike et al. 2018).

O surgimento de nomogramas e fatores prognósticos como a VME, elaborados com a finalidade de estimar a SLPED, mostraram a lacuna existente na identificação de um fator ou marcador mais robusto e nos estimulou a considerar a avaliação da relação entre duas variáveis quantitativas que tiveram correlação com SLPED. Trata-se da relação entre o número de ME e CTC, definida como NL/CTCs. Essa relação embute uma análise qualitativa, pois, quanto maior a relação, podemos inferir que um menor número de CTCs está associado a um maior número de ME e, que, portanto, essas CTCs são mais propensas a gerar ME. A SLPED mediana foi 10,59 meses nas pacientes com $NL/CTC1 > 2$ e 15,33 meses nas pacientes com $NL/CTC1 \leq 2$ (HR = 2,6; IC95%:0,93–7,29; $p = 0,067$). Em relação à avaliação após a radioterapia focal, a SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com $NL/CTC2 > 0,1$ e foi 1,8 meses nas pacientes com $NL/CTC2 \leq 0,1$ (HR = 0,17; IC95%:0,036–0,81; $p = 0,026$), porém o número de pacientes foi muito pequeno no grupo com $NL/CTC2 \leq 0,1$.

O momento de maior interesse para a avaliação de um eventual fator associado à SLPED é anterior ao tratamento, uma vez que poderia auxiliar na decisão da modalidade mais adequada de radioterapia, entre focal e RTHE. Apesar de NL/CTC1 com ponto de corte de 2 não ter mostrado correlação significativa com a SLPED, houve uma tendência à maior SLPED nas pacientes NL/CTC1 ≤ 2 . Portanto, é um fator que merece ser explorado em futuros estudos prospectivos que envolvam CTCs e ME.

A identificação de CTCs associadas com ME do câncer da mama é desejável para a detecção precoce e avaliação da resposta terapêutica das ME. Zhang et al. (2013) descreveram a potencial assinatura proteica das CTCs competentes para o desenvolvimento de ME, que foram confirmadas e caracterizadas pela expressão de HER2/EGFR/NOTCH1/heparanase. Mais recentemente, Boral et al. (2017) avaliaram 10 pacientes com câncer da mama metastático, dentre as quais 5 tinham lesões sugestivas de ME identificadas pela RM e, por análise do transcriptoma e imunocitoquímica das CTC, identificaram uma assinatura genética das CTC associadas com ME, que também foram confirmadas e caracterizadas pela expressão de Ki67, do receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase, da integrina beta-1 e/ou de NOTCH1.

Neste estudo, fizemos uma análise qualitativa das CTCs a partir da expressão de moléculas mediadoras da passagem através da barreira hemato-encefálica (COX2, EGFR e ST6GALNAC5), marcadoras da TEM (NOTCH1) e de HER2 e avaliamos a correlação com SLPED. A molécula COX2 foi expressa em quase todas as CTC1 (27 em 28 pacientes) e CTC2 (24 em 25 pacientes) e, portanto, não foi possível fazer a correlação com SLPED. Não houve correlação entre a expressão de EGFR, ST6GALNAC5 e NOTCH1 com a SLPED, tanto nas CTC1 quanto nas CTC2. Entretanto, a SLPED mediana não foi atingida nas pacientes com expressão presente e foi 13 meses nas pacientes com expressão ausente de HER2 nas CTC2 ($p = 0,032$). A mesma tendência, embora não significativa, foi observada na avaliação das CTC1.

O fato da molécula COX2 ter sido expressa em uma alta proporção das pacientes avaliadas em ambos os momentos da coleta sanguínea e o achado da associação significativa entre menor número de CTC1 e pior controle da doença encefálica com menor SLPED neste estudo é uma relação que deve ser explorada. Se COX2 está associada à migração intercompartimental entre o encéfalo, líquor e a circulação sistêmica é plausível ponderarmos que CTCs com expressão de COX2 tenham maior mobilidade para migração do sistema circulatório sanguíneo para o encéfalo. Desse modo, embora o número de CTCs no sangue seja baixo, as pacientes estariam sujeitas à progressão no SNC. Além do estudo de Allen et al. (2014), já citado, Liu et al. (2013) identificaram mediadores inflamatórios derivados de células

mielóides e estimulados por COX2 que propiciam um ambiente pré-metastático no cérebro de camundongos.

A utilização de um biomarcador que possa prever o controle da doença encefálica após o tratamento focal de ME, embora tenha um apelo evidente, ainda não foi devidamente explorada. Há um único trabalho, recentemente publicado, que avaliou a expressão de CD138, um marcador celular plasmocitário, em linfócitos infiltrantes de tumor presentes nas ME ressecadas de 13 pacientes (Soike et al. 2019). O tecido tumoral de pacientes com altos níveis de plasmócitos com expressão de CD138 foi associado à melhora significativa da SG quando comparado ao tecido de pacientes com baixa expressão de CD138 ($p = 0,01$). Somente 1 dos 4 pacientes com alta expressão plasmocitária evoluiu com PED e 7 dos 9 pacientes com baixa expressão plasmocitária evoluíram com PED ($p = 0,11$). O fato de ser um estudo retrospectivo, com pequeno número de pacientes e diferentes tipos de tumores primários (mama, melanoma e pulmão) traz limitações que o fazem ser visto com ressalva, mas traz resultados geradores de hipótese.

Em nosso estudo, houve tendência de correlação entre a expressão presente de HER2 nas CTCs e maior SLPED, o que vai ao encontro da correlação demonstrada entre imunofenótipo HER2-positivo do tumor primário e maior SLPED. Dado que Jordan et al. (2016) evidenciaram a possibilidade de interconversão da expressão de HER2 nas CTCs, independentemente do imunofenótipo do tumor primário, a determinação do *status* da expressão de HER2 nas CTCs com um método confiável e reprodutível e sua correlação com o controle da doença encefálica merece ser explorada em estudos subsequentes.

Apesar de não considerarmos o *status* da expressão de HER2 nas CTCs de maneira agrupada, ou seja, definirmos como positivo se expressão presente nas CTC1 ou CTC2, a análise exploratória das nove pacientes com expressão positiva de HER2 em um dos dois momentos, sendo que sete não apresentavam imunofenótipo HER2-positivo no tumor primário, evidenciou que nenhuma evoluiu com PED e somente uma paciente, com imunofenótipo triplo negativo do tumor primário, faleceu por progressão de doença pulmonar no período de seguimento

Entretanto, importante ressaltar que, após a análise multivariada, o imunofenótipo do tumor primário e a contagem de CTC1 prevaleceram como os fatores prognósticos independentes significativos da SLPED em nosso estudo.

Após a avaliação dos múltiplos fatores associados à SLPED e revisão dos nossos resultados e evidências clínicas e experimentais da literatura recente, acreditamos que o achado da associação significativa, e contraintuitiva, entre menor número de CTC1 e pior controle da

doença encefálica com menor SLPED neste estudo não seja, embora possível, resultado de viés estatístico devido ao limitado número de pacientes. Ponderamos que, nas pacientes com ME de câncer da mama, e provavelmente de outros sítios primários também, ocorra o desenvolvimento de um ambiente cerebral pré-metastático que envolve a infiltração de neutrófilos imunossupressores e a redução de células T citotóxicas (Zhang et al. 2020), além da infiltração de células mielóides que produzem quimiocinas e atraem células mielóides adicionais e CTCs, com consequente proliferação das ME (Liu et al. 2013). As células mielóides são estimuladas pela COX2 dos tumores primários e observamos sua elevada expressão nos 2 momentos de coleta das CTCs no nosso estudo. Tendo em vista que COX2 está associada à migração intercompartimental entre o cérebro, líquido e sangue (Allen et al. 2014), podemos inferir que o ambiente cerebral já favorável à formação de metástases, lembrando que todas as pacientes do estudo já apresentavam ME, tende a atrair as CTCs para o encéfalo e reduzir sua quantidade na circulação sanguínea. Desse modo, pacientes com ME e menor contagem de CTCs no sangue teriam maior risco de novas ME, pois é provável que o maior volume de CTCs esteja no compartimento cerebral. Por outro lado, pacientes com maior número de CTCs no sangue teriam um mecanismo de evasão do ambiente de atração cerebral. O caminho que se vislumbra para continuar este projeto e testar nossa hipótese é realizar um estudo para avaliar e comparar CTCs no sangue e no líquido de pacientes com ME de câncer da mama.

5.5 SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO ENCEFÁLICA DISTANTE– ENVOLVIMENTO DIFUSO

Diante de uma paciente com progressão da doença metastática no encéfalo, tão importante quanto o número das ME é o padrão de progressão da doença encefálica. O desenvolvimento dos métodos de imagem e de radioterapia tem permitido a indicação de irradiação focal em pacientes com um número cada vez maior de ME e o consequente adiamento da RTHE sem impacto negativo na SG.

Yamamoto et al. (2014) mostraram que não houve diferença na SG entre pacientes submetidos à RC para 2-4 e 5-10 ME, conforme descrito previamente. Entretanto, houve risco significativamente maior de progressão com DLM nos pacientes com 5-10 ME quando comparados àqueles com 2-4 ME (HR = 1,58; IC95%:1,04–2,40; p = 0,035). Uma vez que os pacientes com mais do que 4 lesões têm maior risco de DLM e que esta é usualmente tratada

com RTHE, consideramos avaliar o desfecho sobrevida livre de progressão encefálica distante com envolvimento difuso (SLPED-ED).

A SLPED-ED foi definida como progressão com o surgimento de mais do que 4 novas ME ou DLM e, em última análise, é um indicador de potencial indicação de RTHE. Neste estudo, dentre as 12 pacientes com PED, 6 apresentaram envolvimento difuso, sendo 3 pacientes com DLM e 3 com mais de 4 novas ME. Nenhuma das pacientes que evoluiu com DLM havia recebido radioterapia focal pós-operatória

A SLPED-ED mediana foi 6 meses nas pacientes com $CTC1 \leq 0,5$ CTC/mL e não atingida nas pacientes com $CTC1 > 0,5$ CTC/mL (HR = 10,22; IC95%:1,99–52,4; $p = 0,005$). Ao considerarmos o óbito como risco competitivo, a incidência cumulativa de PED-ED aos 6 meses foi 40% nas pacientes com $CTC1 \leq 0,5$ CTC/mL e zero nas pacientes com $CTC1 > 0,5$ CTC/mL ($p = 0,005$). Não houve correlação significativa entre a contagem de CTC2 e SLPED-ED.

Além da contagem de CTC1, o número de ME e a relação NL/CTC1 tiveram correlação significativa com SLPED-ED. A SLPED-ED mediana não foi atingida nas pacientes com ≤ 6 lesões e foi 10,6 meses nas pacientes com > 6 lesões (HR = 10,72; IC95%:2,13–53,82; $p = 0,004$). A SLPED-ED mediana foi 12,1 meses nas pacientes com $NL/CTC1 > 6,8$ e não foi atingida nas pacientes com $NL/CTC1 \leq 6,8$ (HR = 7,37; IC95%:1,34–40,5; $p = 0,022$). A incidência cumulativa de progressão encefálica distante com envolvimento difuso (PED-ED) aos 6 meses, tendo o óbito como risco competitivo, foi de 25% nas pacientes com $NL/CTC1 > 6,8$ e 2,86% nas pacientes com $NL/CTC1 \leq 6,8$, com tendência à significância estatística ($p = 0,063$).

Em uma análise de fatores de risco associados à DLM em 805 pacientes submetidos à RC por ME entre 1999 e 2012, a incidência cumulativa de DLM em 795 pacientes avaliáveis foi 6,2%, com um tempo mediano de 7,4 meses entre a RC e a DLM. Dentre os fatores de risco analisados, ME de câncer colorretal ou mama, PED, idade menor e ME em maior número foram independentemente associados a maior risco de DLM (Huang et al. 2014).

Trifiletti et al (2015) avaliaram 126 pacientes submetidas à RC por ME de câncer da mama entre 1995 e 2014 e identificaram 18 pacientes (14%) que evoluíram com DLM após a RC. Dentre os fatores de risco analisados, a presença de doença pulmonar ativa no momento da RC foi o único associado ao desenvolvimento de DLM ($p = 0,038$).

Gorovets et al. (2017) desenvolveram um nomograma preditivo da sobrevida livre de RTHE após a RC a partir de dados multi-institucionais de 895 pacientes com 2095 ME, sendo que a RTHE foi geralmente recomendada para pacientes com mais de 4 lesões ativas, *performance status* do *Eastern Cooperative Oncology Group* ≥ 2 ou expectativa de SG < 3

meses. Observaram uma sobrevida livre de RTHE de 8 meses (0,1 – 139 meses) e os fatores preditivos independentes para menor sobrevida livre de RTHE foram maior idade, diagnóstico de câncer da mama HER2-negativo ou câncer colorretal, maior número de ME, presença de sintomas neurológicos, doença sistêmica progressiva e maior volume de doença extraencefálica. Ao aplicarmos esse nomograma nas seis pacientes que evoluíram com PED-ED na nossa série e, conseqüentemente, com potencial indicação de RTHE, verificamos que a probabilidade estimada de sobrevida livre de RTHE em 6 e 12 meses foi, em média, 64% e 45%, respectivamente. Portanto, além dos potenciais fatores de viés presentes em uma análise retrospectiva e com variação na definição da indicação de RTHE entre diferentes instituições, a ausência de um marcador biológico tumoral no momento da indicação da RC no nomograma de Gorovets et al. (2017) provavelmente não permitiu uma estimativa da sobrevida livre de RTHE condizente com a PED-ED observada no nosso estudo.

Em nosso estudo, dentre as pacientes com PED, três evoluíram com DLM, o que corresponde a cerca de 8,3% das 36 pacientes avaliáveis. O tempo médio entre a RC e a PED-ED foi 6,2 meses. O número de ME, a relação NL/CTC1 e contagem de CTC1 como fatores de risco para PED-ED são coerentes com os achados relativos à PED e evidenciam que a associação entre o número de ME e a contagem de CTCs antes do tratamento focal merece ser explorada em futuros estudos.

Não houve correlação entre a expressão de EGFR, ST6GALNAC5 e NOTCH1 e HER2 com a SLPED-ED, tanto nas CTC1 quanto nas CTC2. Como a molécula COX2 foi expressa em quase todas as CTC1 e CTC2, não foi possível fazer a correlação com a SLPED-ED.

Após a análise multivariada, o modelo final ajustado mostrou a contagem de CTC1 como único fator prognóstico independente significativo da SLPED-ED.

5.6 SOBREVIDA GLOBAL

A SG mediana nesta coorte foi 19,5 (IC95%: 16,1–22,9) meses e compatível com uma atualização recente dos resultados do DS-GPA em pacientes com ME de câncer da mama. Sperduto et al. (2020) avaliaram 2473 pacientes ME recém-diagnosticadas tratadas entre 2006 e 2017 e relataram uma SG mediana de 16 meses, sendo que os fatores prognósticos significativos foram o imunofenótipo, KPS, idade, número de ME e o *status* da doença extraencefálica.

Em nossa série, que não foi restrita a pacientes com ME recém-diagnosticadas, os fatores prognósticos com impacto significativo na SG, após análise univariada, foram o DS-

GPA, como variável contínua e discreta, o imunofenótipo e a relação NL/CTC1. A SG mediana foi 19,54 meses nas pacientes com DS-GPA > 2 e 7,6 meses nas pacientes com DS-GPA ≤ 2 (HR = 0,23; IC95%: 0,08–0,65; $p = 0,006$) e foi 4,8 meses nas pacientes com imunofenótipo triplo negativo e não foi atingida nas pacientes com imunofenótipo luminal B (HR = 0,29; IC95%:0,08–1,0; $p = 0,05$) e HER2-positivo (HR = 0,15; IC95%:0,04–0,5; $p = 0,002$).

Sperduto et al. (2020) relataram SG mediana de 6 (2,5–12,3) meses nas pacientes com DS-GPA 0-1, 12,9 (5,6–27) meses com DS-GPA 1,5 – 2, 23,5 (11,1–47) meses com DS-GPA 2,5–3 e 36,3 (18,5 – 78,1) meses com DS-GPA 3,5–4 ($p < 0,001$). Em relação ao imunofenótipo, a SG mediana foi 27 (13–55) meses no luminal B, 25 (11–47) meses no HER2-positivo, 14 (5–30) meses no luminal A e 9 (4–19) meses no triplo negativo ($p < 0,001$). O fato de nossos resultados de SG, estratificados pelo DS-GPA e imunofenótipo, se apresentarem similares aos recentemente relatados por Sperduto et al. (2020), é uma amostra da qualidade assistencial e validação dos dados coletados.

A contagem de CTCs em ambos os momentos não apresentou correlação significativa com a SG neste estudo. No entanto, houve uma tendência à maior SG nas pacientes com CTC1 $> 0,5$ CTC/mL quando comparadas às pacientes com CTC1 $\leq 0,5$ CTC/mL (SG mediana de 19,5 *versus* 8,6 meses; HR = 3,07; IC95%:0,95–9,82; $p = 0,047$). Mais uma vez, esse achado pode estar relacionado ao pequeno número de pacientes avaliados. Embora tenha sido coerente com o achado de correlação significativa entre maior contagem de CTC1 e maior SLPED e SLPED-ED relatado previamente, a eventual correlação entre a contagem de CTC1 e SG foi marginal. Essa ausência de correlação entre a contagem de CTCs e a SG vai de encontro a importantes estudos prospectivos que mostraram correlação significativa entre maior contagem de CTCs e pior SG em pacientes com câncer da mama metastático (Cristofanilli et al. 2004; 2019).

Porém, quando se observam somente as pacientes com câncer da mama metastático que tenham ME, a correlação entre CTCs e SG é mais heterogênea. Mego et al. (2011) avaliaram 22 pacientes com ME e não evidenciaram correlação entre a contagem de CTCs e SG (HR = 0,68; IC95%:0,27–1,72; $p = 0,34$). Riebensahm et al. (2019) compararam dois métodos de purificação para análise de CTCs em pacientes com ME de câncer da mama. No método de purificação EpCAM-dependente, houve piora significativa da SG entre as pacientes com CTC detectáveis ≥ 5 ($p < 0,001$, log-rank), confirmada após análise multivariada (HR = 7,19; IC95%:1,73–29,95; $p = 0,0067$). No método EpCAM-independente, também houve piora da SG entre as pacientes com CTCs detectáveis ($p = 0,41$, log-rank), mas sem significância após análise multivariada. Esses dados sugerem que em um método de purificação EpCAM-

independente das CTCs, como o método ISET utilizado em nosso estudo, a qualidade das CTCs tem uma importância maior do que a quantidade na estimativa da SG. De fato, em nossa série, a SG mediana foi 8,65 meses nas pacientes com $NL/CTC1 > 2,2$ e 19,54 meses nas pacientes com $NL/CTC1 \leq 2,2$ (HR = 3,32; IC95%:1,19–9,26; $p = 0,02$), sendo que essa relação NL/CTCs representa um indicador qualitativo do risco de novas ME.

Também não houve correlação entre a expressão de EGFR, ST6GALNAC5 e NOTCH1 com a SG, tanto nas CTC1 quanto nas CTC2. Entretanto, embora sem significância, foi possível observar uma tendência a maior SG nas pacientes com expressão presente de HER2, tanto nas CTC1 quanto nas CTC2, o que é coerente com os achados anteriormente descritos a respeito da associação entre o imunofenótipo HER2-positivo do tumor primário e maior SG.

Após análise multivariada, o modelo final ajustado revelou o imunofenótipo e a relação NL/CTC1 como fatores prognósticos independentes significativos da SG. O método ISET, que é EpCAM-independente, tende a detectar maior número de CTC com características mesenquimais, que é um padrão típico nas pacientes com imunofenótipo triplo negativo. Além disso, pode identificar CTC EpCAM negativas que tenham propensão a desenvolver ME e pulmonares (Zhang et al.2013).

Curiosamente, dentre as 16 mortes observadas durante o período de seguimento em nossa série, 11 (68%) ocorreram por progressão da doença fora do sistema nervoso central, predominantemente no pulmão (9 das 11 mortes). Podemos inferir, portanto, que a identificação de CTC mesenquimais competentes tanto para a progressão encefálica quanto pulmonar por um método EpCAM-independente, como o ISET, serviria como fator prognóstico de morte por progressão nesses sítios e estimativa da SG. Em nosso estudo, a progressão encefálica ou pulmonar foi a causa de 14 das 16 (87,5%) mortes observadas.

A relação entre CTCs, identificadas por um método EpCAM-independente, e o padrão de progressão da doença encefálica e pulmonar e sua associação com a sobrevida livre de progressão encefálica, pulmonar e SG em pacientes com câncer da mama metastático, com dados pragmáticos e contemporâneos, merece ser explorada em estudos subsequentes.

6 CONCLUSÕES

A contagem de CTC1 foi fator prognóstico independente da sobrevida livre de progressão encefálica distante e sobrevida livre de progressão encefálica distante com envolvimento difuso.

O imunofenótipo do tumor primário foi fator prognóstico independente da sobrevida livre de progressão encefálica distante e da sobrevida global.

O DS-GPA foi potencial preditor da sobrevida livre de progressão encefálica distante e sobrevida global.

O número de metástases encefálicas foi potencial preditor da sobrevida livre de progressão encefálica distante e sobrevida livre de progressão encefálica distante com envolvimento difuso.

A relação entre o número de lesões e a contagem CTC1 (NL/CTC1) foi fator prognóstico independente da sobrevida global e potencial preditor da sobrevida livre de progressão encefálica distante com envolvimento difuso

A avaliação de biomarcadores nas CTCs através de imunocitoquímica foi factível. Houve forte expressão de COX2 nas CTCs e a expressão de HER2 nas mesmas mostrou potencial papel preditor da sobrevida livre de progressão encefálica distante.

7 REFERÊNCIAS

Aceto N. Fluctuating numbers of circulating tumor cells in cancer patients and the meaning of zero counts. *Oncotarget*. 2019;10(28):2658-9.

Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med*. 2012;63:199–215.

Allen JE, Patel AS, Prabhu VV, Dicker DT, Sheehan JM, Glantz MJ, et al. COX-2 drives metastatic breast cells from brain lesions into the cerebrospinal fluid and systemic circulation. *Cancer Res*. 2014;74(9):2385-90.

Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2020(1);20:26-41.

Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Austr Med J*. 1869;14:146-7.

Ayala-Peacock DN, Attia A, Braunstein SE, Ahluwalia MS, Hepel J, Chung C, et al. Prediction of new brain metastases after radiosurgery: validation and analysis of performance of a multi-institutional nomogram. *J Neurooncol*. 2017;135(2):403-11.

Bachelot T, Romieu G, Campone M, Diéras V, Cropet C, Dalenc F, et al. Lapatinib plus capecitabine in patients with previously untreated brain metastases from HER2-positive metastatic breast cancer (LANDSCAPE): a single-group phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013;14(1):64-71.

Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):406-14.

Bielciková Z, Jakabová A, Pinkas M, Zemanová M, Kolostová K, Bobek V. Circulating tumor cells: what we know, what do we want to know about them and are they ready to be used in clinics? *Am J Transl Res.* 2017;9(6):2807-23.

Boral D, Vishnoi M, Liu HN, Yin W, Sprouse ML, Scamardo A, et al. Molecular characterization of breast cancer CTCs associated with brain metastasis. *Nat Commun.* 2017;8(1):196.

Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.* 2009;459(7249):1005-9.

Brown PD, Gondi V, Pugh S, Tome WA, Wefel JS, Armstrong TS, et al. Hippocampal avoidance during whole-brain radiotherapy plus memantine for patients with brain metastases: Phase III Trial NRG Oncology CC001. *J Clin Oncol.* 2020;38(10):1019-29.

Brown PD, Jaeckle K, Ballman KV, Farace E, Cerhan JH, Anderson SK, et al. Effect of Radiosurgery Alone vs Radiosurgery with Whole Brain Radiation Therapy on Cognitive Function in Patients With 1 to 3 Brain Metastases: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2016;316(4):401-9.

Chang EL, Wefel JS, Hess KR, Allen PK, Lang FF, Kornguth DG, et al. Neurocognition in patients with brain metastases treated with radiosurgery or radiosurgery plus whole-brain irradiation: a randomized trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(11):1037-44.

Chinen LT, Mello CA, Abdallah EA, Ocea LM, Buim ME, Breve NM, et al. Isolation, detection, and immunomorphological characterization of circulating tumor cells (CTCs) from patients with different types of sarcoma using isolation by size of tumor cells: a window on sarcoma-cell invasion. *Onco Targets Ther.* 2014;7:1609-17.

Clayton AJ, Danson S, Jolly S, Ryder WDJ, Burt PA, Stewart AL, et al. Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab for metastatic breast cancer. *Br J Cancer.* 2004;91(4):639-43.

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

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(8):781-91.

Cristofanilli M, Pierga JY, Reuben J, Rademaker A, Davis AA, Peeters DJ, et al. The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging metastatic breast cancer (MBC): International expert consensus paper. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;134:39-45.

Cruz-Muñoz W, Kerbel RS. Preclinical approaches to study the biology and treatment of brain metastases. *Semin Cancer Biol.* 2011;21(2):123–30.

De Azevedo Santos TR, Tundisi CF, Ramos H, Maia MAC, Pellizzon ACA, Silva MLG, et al. Local control after radiosurgery for brain metastases: predictive factors and implications for clinical decision. *Radiat Oncol.* 2015;10:63.

Drolez A, Vandehaute E, Delannoy CP, Dewald JE, Gosselete F, Cecchelli R, et al. ST6GALNAC5 Expression Decreases the Interactions between Breast Cancer Cells and the Human Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci.* 2016;17(18):E1309.

Fabisiewicz A, Szostakowska-Rodzios M, Zaczek AJ, Grzybowska EA. Circulating Tumor Cells in Early and Advanced Breast Cancer; Biology and Prognostic Value. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):E1671.

Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumor cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer.* 2011;105(6):847-53.

Farris M, McTyre ER, Cramer CK, Hughes R, Randolph DM, Ayala-Peacock DN, et al. Brain metastasis velocity: a novel prognostic metric predictive of overall survival and freedom from whole-brain radiation therapy after distant brain failure following upfront radiosurgery alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2017;98(1):131-41.

Fehm T, Müller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, et al. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;124(2):403-12.

Felding-Habermann B, Habermann R, Saldivar E, Ruggeri ZM. Role of beta3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. *J Biol Chem.* 1996;271(10):5892-900.

Fine JP, Gray RJ. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J Amer Statist Assoc.* 1999;94:496-509.

Fox BD, Cheung VJ, Patel AJ, Suki D, Rao G. Epidemiology of metastatic tumors. *Neurosurg Clin N Am.* 2011;22(1):1-6.

Fu L, Liu F, Fu H, Liu L, Yuan S, Gao Y, et al. Circulating tumor cells correlate with recurrence in stage III small-cell lung cancer after systemic chemoradiotherapy and prophylactic cranial irradiation. *Jpn J Clin Oncol.* 2014;44(10):948-55.

Gaspar L, Scott C, Rotman M, Asbell S, Phillips T, Wasserman T, et al. Recursive partitioning analysis (RPA) of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) brain metastases trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997;37(4):745-51.

Giordano A, Egleston BL, Hajage D, Bland J, Hortobagyi GN, Reuben JM, et al. Establishment and validation of circulating tumor cell-based prognostic nomograms in first-line metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2013;19(6):1596-602.

Giuliano M, Giordano A, Jackson S, De Giorgi U, Mego M, Cohen EN, et al. Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination. *Breast Cancer Res.* 2014;16(5):440.

Golden DW, Lamborn KR, McDermott MW, Kunwar S, Wara WM, Nakamura JL, et al. Prognostic factors and grading systems for overall survival in patients with radiosurgery for brain metastases: Variation by primary site. *J Neurosurg.* 2008;109:77-86.

Gorovets D, Ayala-Peacock D, Tybor DJ, Rava P, Ebner D, Cielo D, et al. Multi-institutional nomogram predicting survival free from salvage whole brain radiation after radiosurgery in patients with brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017;97(2):246-53.

Grambsch PM, Therneau TM. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika*. 1994;81(3):515-26.

Halabi S, Owzar K. The importance of identifying and validating prognostic factors in oncology. *Semin Oncol*. 2010;37(2):e9-18.

Hanssen A, Riebensahm C, Mohme M, Joosse SA, Velthaus JL, Berger LA, et al. Frequency of circulating tumor cells (CTC) in patients with brain metastases: implications as a risk assessment marker in oligo-metastatic disease. *Cancers (Basel)*. 2018;10(12):527.

Huang AJ, Huang KE, Page BR, Ayala-Peacock DN, Lucas Jr JT, Lesser GJ, et al. Risk factors for leptomeningeal carcinomatosis in patients with brain metastases who have previously undergone stereotactic radiosurgery. *J Neurooncol*. 2014;120(1):163-9.

Huebner H, Fasching PA, Gumbrecht W, Jud S, Rauh C, Matzas M, et al. Filtration based assessment of CTCs and CellSearch® based assessment are both powerful predictors of prognosis for metastatic breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2018;18:204.

Jordan NV, Bardia A, Wittner BS, Benes C, Ligorio M, Zheng Y, et al. HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells. *Nature*. 2016;537(7618):102-6.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Statist Assoc*. 1958;53(282):457-81.

Kayama T, Sato S, Sakurada K, Mizusawa J, Nishikawa R, Narita Y, et al. Effects of Surgery With Salvage Stereotactic Radiotherapy Versus Surgery With Whole-Brain Radiation Therapy in Patients With One to Four Brain Metastases (JCOG0504): A Phase III, Noninferiority, Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol*. 2018;36(33):3282-9.

Keller L, Pantel K. Unravelling tumour heterogeneity by single-cell profiling of circulating tumor cells. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(10):553-67.

Kocher M, Wittig A, Piroth MD, Treuer H, Seegenschmiedt H, Ruge M, et al. Stereotactic radiosurgery for treatment of brain metastases: a report of the DEGRO working group on stereotactic radiotherapy. *Strahlenther Onkol*. 2014;190(6):521-32.

Konigsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol* 2011; 50(5):700-10.

Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, 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(2):306-15.

Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall FH. Circulating tumor cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol*. 2010;2(6):351-65.

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

Leyland-Jones B. Human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and central nervous system metastases. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5278-86.

Linskey ME, Andrews DW, Asher AL, Burri SH, Kondziolka D, Robinson PD, et al. The role of stereotactic radiosurgery in the management of patients with newly diagnosed brain metastases: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol*. 2010;96(1):45-68.

Liu Y, Kosaka A, Ikeura M, Kohanbash G, Fellows-Mayle W, Snyder LA, et al. Premetastatic soil and prevention of breast cancer brain metastasis. *Neuro Oncol*. 2013;15(7):891-903.

Martin OA, Anderson RL, Narayan K, MacManus MP. Does the mobilization of circulating tumour cells during cancer therapy cause metastasis? *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(1):32-44.

Martin OA, Anderson RL, Russel PA, Ashley-Cox R, Ivashkevich A, Swierczak A, et al. Mobilization of viable tumor cells into the circulation during radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;88(2):395-403.

Masucci GL. Hypofractionated radiation therapy for large brain metastases. *Front Oncol*. 2018;8:379.

McTyre E, Ayala-Peacock D, Contessa J, Corso C, Chiang V, Chung C, et al. Multi-institutional competing risk analysis of distant brain failure and salvage patterns after upfront radiosurgery without whole brain radiotherapy for brain metastasis. *Ann Oncol*. 2018;29(2):497-503.

McTyre ER, Soike MH, Farris M, Ayala-Peacock D, Hepel JT, Page BR, et al. Multi-institutional validation of brain metastasis velocity, a recently defined predictor of outcomes following stereotactic radiosurgery. *Radiother Oncol*. 2020;142:168-74.

Mego M, De Giorgi U, Dawood S, Wang X, Valero V, Andreopoulou E, et al. Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells. *Int J Cancer*. 2011;129(2):417-23.

Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(12):693-701.

Miller JA, Kotecha R, Ahluwalia MS, Mohammadi AM, Chao ST, Barnett GH, et al. Overall survival and the response to radiotherapy among molecular subtypes of breast cancer brain metastases treated with targeted therapies. *Cancer*. 2017;123(12):2283-93.

Nagtegaal S, Claes A, Suijkerbuijk K, Schramel F, Snijders T, Verhoeff J. Comparing survival by the diagnosis-specific Graded Prognostic Assessment (DS-GPA) to actual survival in patients with 1 – 10 brain metastases treated with stereotactic radiosurgery. *Radiother Oncol*. 2019;138:173-9.

Patchell RA. The management of brain metastases. *Cancer Treat Rev*. 2003;29(6):533-40.

Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Letters*. 2007;253(2):180-204.

Pecot CV, Bischoff FZ, Mayer JA, Wong KL, Pham T, Bottsford-Miller J, et al. A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs. *Cancer Discovery*. 2011;1(7):580-6.

Pedrosa RMSM, Mustafa DA, Soffietti R, Kros JM. Breast cancer brain metastasis: molecular mechanisms and directions for treatment. *Neuro Oncol*. 2018;20(11):1439-49.

Pierga JY, Bidard FC, Cropet C, Tresca P, Dalenc F, Romieu G, et al. Circulating tumor cells and brain metastasis outcome in patients with HER2-positive breast cancer: the LANDSCAPE trial. *Ann Oncol*. 2013;24(12):2999-3004.

Press RH, Boselli DM, Symanowski JT, Lankford SP, McCammon RJ, Moeller BJ, et al. External validity of a risk stratification score predicting early distant brain failure and salvage whole brain radiation therapy after stereotactic radiosurgery for brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017;98(3):632-8.

Riebensahm C, Joosse SA, Mohme M, Hanssen A, Matschke J, Goy Y, et al. Clonality of circulating tumor cells in breast cancer brain metastasis patients. *Breast Cancer Res*. 2019;21:101.

Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch™ system. *Clin Cancer*. 2007;13(3):920-8.

Rimawi MF, Shetty PB, Weiss HL, Schiff R, Osborne CK, Chamness GC, et al. Epidermal growth factor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. *Cancer*. 2010;116(5):1234-42.

Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*. 2002;62(3):632-5.

Sauerbrei W, Taube SE, McShane LM, Cavenagh MM, Altman DG. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (remark): an abridged explanation and elaboration. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110:803-11.

Schoenfeld D. Partial residuals for the proportional hazards regression model. *Biometrika.* 1982;69(1):239-41.

Shaw E, Scott C, Souhami L, Dinapoli R, Kline R, Loeffler J, et al. Single dose radiosurgical treatment of recurrent previously irradiated primary brain tumors and brain metastases: final report of RTOG protocol 90-05. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;47(2):291-8.

Shultz DB, Modlin LA, Jayachandran P, Von Eyben R, Gibbs IC, Choi CYH, et al. Repeat courses of stereotactic radiosurgery (SRS), deferring whole-brain irradiation, for new brain metastases after initial SRS. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015; 92(5):993-9.

Siewverts AM, Kraan J, Bolt J, Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(1):61-6.

Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol.* 2014;32(31):3483-9.

Soffietti R, Abacioglu U, Baumert B, Combs SE, Kinhult S, Kros JM, et al. Diagnosis and treatment of brain metastases from solid tumors: guidelines from the European Association of Neuro-Oncology (EANO). *Neuro Oncol.* 2017;19(2):162-74.

Soffietti R, Cornu P, Delattre JY, Grant R, Graus F, Grisold W, et al. EFNS Guidelines on diagnosis and treatment of brain metastases: report of an EFNS Task Force. *Eur J Neurol.* 2006;13(7):674-81.

Soike MH, Logue J, Qasem S, Hughes RT, McTyre ER, Su J, et al. CD138 plasma cells may predict brain metastasis recurrence following resection and stereotactic radiosurgery. *Sci Rep.* 2019;9:14385.

Soike MH, McTyre ER, Hughes RT, Farris M, Cramer CK, LeCompte MC, et al. Initial brain metastasis velocity: does the rate at which cancers first seed the brain affect outcomes? *J Neurooncol.* 2018;139(2):461-7.

Sperduto PW, Berkey B, Gaspar LE, Mehta M, Curran W. A new prognostic index and comparison to three other indices for patients with brain metastases: an analysis of 1,960 patients in the RTOG database. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008;70(2):510-4.

Sperduto PW, Chao ST, Sneed PK, Luo X, Suh J, Roberge D, et al. Diagnosis-specific prognostic factors, indexes, and treatment outcomes for patients with newly diagnosed brain metastases: a multi-institutional analysis of 4259 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;77(3):655-61.

Sperduto PW, Kased N, Roberge D, Xu Z, Shanley R, Luo X, et al. Effect of tumor subtype on survival and the graded prognostic assessment for patients with breast cancer and brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;82(5):2111-7.

Sperduto PW, Mesko S, Li J, Cagney D, Aizer A, Lin NU, et al. Beyond an updated graded prognostic assessment (Breast GPA): a prognostic index and trends in treatment and survival in breast cancer brain metastases from 1985 to today. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2020;107(2):334-43.

Stemmler HJ, Heinemann V. Central nervous system metastases in HER-2-overexpressing metastatic breast cancer: a treatment challenge. *Oncologist.* 2008;13(7):739-50.

Stemmler HJ, Schmitt M, Willems A, Bernhard H, Harbeck N, Heineman V. Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier. *Anticancer Drugs.* 2007;18(1):23-8.

Suh JH, Kotecha R, Chao ST, Ahluwalia MS, Sahgal A, Chang EL. Current approaches to the management of brain metastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2020;17(5):279-99.

Sundstrom JT, Minn H, Lertola KK, Nordman E. Prognosis of patients treated for intracranial metastases with whole-brain irradiation. *Ann Med*. 1998;30(3):296-9.

Tayoun T, Faugeroux V, Oulhen M, Aberlenc A, Pawlikowska P, Farace F. CTC-Derived Models: A Window into the Seeding Capacity of Circulating Tumor Cells (CTCs). *Cells*. 2019;8(10):1145.

Trifiletti DM, Romano KD, Xu Z, Reardon KA, Sheehan J. Leptomeningeal disease following stereotactic radiosurgery for brain metastases from breast cancer. *J Neurooncol*. 2015;124(3):421-7.

Tsao MN, Rades D, Wirth A, Lo SS, Danielson BL, Gaspar LE, et al. Radiotherapeutic and surgical management for newly diagnosed brain metastasis(es): An American Society for Radiation Oncology evidence-based guideline. *Pract Radiat Oncol*. 2012;2(3):210-25.

Vern-Gross TZ, Lawrence JA, Case LD, McMullen KP, Bourland JD, Metheny-Barlow LJ, et al. Breast cancer subtype affects patterns of failure of brain metastases after treatment with stereotactic radiosurgery. *J Neurooncol*. 2012;110(3):381-8.

Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*. 2000;156(1):57-63.

Weltman E, Salvajoli JV, Brandt RA, Hanriot RM, Prisco FE, Cruz JC, et al. Radiosurgery for brain metastases: a score index for predicting prognosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;46(5):1155-61.

Wen PY, Loeffler JS. Management of brain metastases. *Oncology*. 1999;13(7):941-54, 957-61; discussion 961-2,9.

Wiggenraad R, Kanter AV, Kal HB, Taphoorn M, Vissers T, Struikmans H. Dose-effect relation in stereotactic radiotherapy for brain metastases. a systematic review. *Radiother Oncol*. 2011;98(3):292-7.

Witzel I, Oliveira-Ferrer L, Pantel K, Müller V, Wikman H. Breast cancer brain metastases: biology and new clinical perspectives. *Breast Cancer Res.* 2016;18(1):8.

Wolf A, Kvint S, Chachoua A, Pavlik A, Wilson M, Donahue B, et al. Toward the complete control of brain metastases using surveillance screening and stereotactic radiosurgery. *J Neurosurg.* 2018;128(1):23-31.

Yamamoto M, Serizawa T, Shuto T, Akabane A, Higuchi Y, Yamanaka K, et al. Stereotactic radiosurgery for patients with multiple brain metastases (JLGK0901): a multi-institutional prospective observational study. *Lancet Oncol.* 2014;15(4):387-95.

Yan WT, Cui X, Chen Q, Li YF, Cui YH, Wang Y, et al. Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2017;7:43464.

Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol.* 2011;192(3):373-82.

Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD, Ngo J, Yin W, Kumar D, et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci Transl Med.* 2013;5(180):180ra48.

Zhang L, Yao J, Wei Y, Zhou Z, Ping L, Qu J, et al. Blocking immunosuppressive neutrophils deters pY696-EZH2-driven brain metastases. *Sci Transl Med.* 2020;12(545):eaaz5387.

Zimm S, Wampler GL, Stablein D, Hazra T, Young HF. Intracerebral metastases in solid-tumor patients: natural history and results of treatment. *Cancer.* 1981;48(2):384-94.

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



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

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 **04/10/2016**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **20/09/2016**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2258/16** intitulado: “**Avaliação prospectiva da correlação entre células tumorais circulantes e controle da doença encefálica após radioterapia focal de metástases de câncer da mama no sistema nervoso central**”.

Pesquisador responsável: Douglas Guedes de Castro

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

São Paulo, 04 de outubro de 2016.

Atenciosamente,

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

Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PARTICIPANTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO:CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO:CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
-

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DA CORRELAÇÃO ENTRE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES E CONTROLE DA DOENÇA ENCEFÁLICA APÓS RADIOTERAPIA FOCAL DE METÁSTASES DE CÂNCER DA MAMA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Douglas Guedes de Castro.
3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:
- Antônio Cássio Assis Pellizzon – Departamento de Radioterapia do A.C.Camargo Cancer Center.
Ludmilla Thomé Domingos Chinen – Departamento de Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center.
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 meses.
-

III - INFORMAÇÕES À PARTICIPANTE

A senhora está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa “Avaliação prospectiva da correlação entre células tumorais circulantes e controle da doença encefálica após radioterapia focal de metástases de câncer da mama no sistema nervoso central”, que será realizada no A.C.Camargo Cancer Center.

Este convite é realizado às pacientes com diagnóstico de câncer da mama que tenham indicação de radioterapia focal em campos restritos às lesões metastáticas no cérebro no momento da avaliação inicial no Departamento de Radioterapia do A.C.Camargo Cancer Center.

Rubrica do
pesquisador

Rubrica do
participante:

IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo deste estudo é avaliar o número de células tumorais circulantes (CTC) antes e 4 a 5 semanas após a radioterapia focal e correlacionar esses dados com resultados clínicos (controle da doença cerebral e sobrevida).

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

As CTC têm potencial fator de previsão desses resultados clínicos e de implementação na prática clínica para avaliação do tratamento mais adequado das metástases cerebrais.

VI – DESENHO DA PESQUISA

Estudo prospectivo (procedimentos realizados e dados coletados conforme protocolo de pesquisa previamente definido), unicêntrico (A.C.Camargo Cancer Center) em um grupo único de participantes da pesquisa.

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

As CTC serão avaliadas no sangue periférico, que será coletado através da punção da veia no braço. A coleta do sangue será realizada em 2 momentos: no mesmo dia do planejamento da radioterapia e entre 4 a 5 semanas após a radioterapia focal.

Não haverá nenhuma mudança na técnica dos exames de imagem necessários ao procedimento ou mesmo na técnica da radioterapia focal em relação aos pacientes que não participam da pesquisa. Portanto, os únicos procedimentos adicionais, serão as 2 coletas do sangue periférico, que serão oportunamente realizadas no momento em que vier para o planejamento da radioterapia (coleta inicial) e, posteriormente, quando retornar para realizar a ressonância de seguimento 4 a 5 semanas após a radioterapia focal (coleta final). A sua participação no estudo não implicará em nenhum custo para você ou convênios.

As amostras coletadas serão processadas e armazenadas pelo Banco de Macromoléculas do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, e o excedente não utilizado por este projeto de pesquisa poderá ser utilizado em outros projetos no futuro, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

Os riscos envolvidos estão relacionados à quebra de confidencialidade dos participantes de pesquisa. Há, também, os riscos inerentes à punção endovenosa para a coleta do sangue periférico no braço. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados, o que diminui as chances de complicações.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Os resultados obtidos neste estudo poderão beneficiar todos os pacientes com metástases encefálicas que tenham indicação de radioterapia, uma vez que poderá auxiliar na tomada de decisão entre radioterapia focal ou de todo o encéfalo.

Rubrica do
pesquisador

Rubrica do
participante:

X - CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação neste estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS, REAÇÕES ADVERSAS OU QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO: (011) 2189-5000 – ramais: 5104, 5105, entrar em contato com Douglas Guedes de Castro.

XIII. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

As amostras coletadas serão processadas pelo Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center. O excedente, não utilizado por este projeto de pesquisa, poderá ser descartado ou, se autorizado pelo participante, ser armazenado e utilizado em outros projetos, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Dependendo da escolha do participante, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que a senhora escolha uma das seguintes opções quanto ao armazenamento de sua amostra biológica:

() Autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa.

() Não autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa. Desta forma, compreendo que o excedente será inutilizado pelo Biobanco da instituição.

Em caso da utilização das suas amostras em outras pesquisas, favor assinalar uma das opções:

() Quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C.Camargo Cancer Center. () Não quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C.Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa

Em casos de óbito ou condições incapacitantes, a senhora tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

() Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

() Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Rubrica do
pesquisador

Rubrica do
participante:

Os dados fornecidos, coletados e obtidos neste protocolo de pesquisa, poderão ser utilizados em estudos futuros. A partir de seu material biológico armazenado, futuras pesquisas poderão realizar novas abordagens científicas com o intuito de, por exemplo, investigar a ocorrência de outras alterações em seu DNA;

Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

XIV. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dr. Douglas Guedes de Castro.

Departamento de Radioterapia do A.C.Camargo Cancer Center - São Paulo.

Telefones para contato: (11) 2189-5000 ramais 5104 / 5105.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C.Camargo Cancer Center pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

Na impossibilidade de contato com as referências acima, o senhor (a) pode solicitar informações do estudo para a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do telefone (61) 3315-2951 / fax (61) 3226-6453 / ou e-mail conep@saude.gov.br.

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu,

declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida** autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

Assinatura do responsável pela pesquisa

(Douglas Guedes de Castro)

Apêndice 2 – Tabela com as variáveis analisadas

Nº	Data Rcir	Idade	KS	Nº lesões	Vol lesões cc	Dça Extra	Imuno	DS-GPA	Status SLPDE	Padrao PDE	Status SG	CTC2/CTC1	NL/CTC1	CTC 1C	CTC 2C
1	23/11/2016	60	90	1	0,027	1	2	3,5	1	1	1	4	4	0,25	1
2	24/11/2016	46	90	4	0,9	1	2	4	1	0	1	0,67	0,76	5,25	3,5
3	14/12/2016	44	90	2	0,7	1	3	3,5	0	0	0	1	1,33	1,5	1,5
4	30/12/2016	49	90	8	1,05	1	3	3,5	1	1	0	3	32	0,25	0,75
5	06/01/2017	40	90	8	14,1	1	3	3,5	0	0	1	0,57	4,57	1,75	1
6	23/12/2016	53	90	1	3,88	1	3	3,5	0	0	1	0,6	0,2	5	3
7	12/01/2017	56	70	15	39,18	1	4	1,5			1		15	1	
8	01/02/2017	47	100	1	0,345	2	4	2	1	0	1	3	0,23	4,25	13
9	10/02/2017	57	100	6	1,57	1	3	3,5	1	0	0	0	2,18	2,75	0
10	09/03/2017	40	100	2	0,59	1	2	4	0	0	0	0,21	0,57	3,5	0,75
11	07/04/2017	50	90	1	14,13	1	4	2	1	0	0	0,55	0,44	2,25	1,25
12	06/04/2017	42	90	1	0,37	1	2	4			1		0,57	1,75	
13	30/03/2017	55	90	3	0,69	2	3	3,5	0	0	0	1,33	4	0,75	1
14	31/03/2017	54	90	2	0,66	1	4	2	1	1	1	1,78	0,44	4,5	8
15	18/04/2017	57	100	5	12,63	2	3	3,5	0	0	0	1,33	6,67	0,75	1
16	11/04/2017	54	90	3	18,46	1	2	4	0	0	0	4,17	2	1,5	6,25
17	12/04/2017	45	80	1	0,34	1	3	2,5	0	0	0	6,33	1,33	0,75	4,75
18	05/05/2017	38	90	1	0,08	1	3	3,5	1	1	0	0,67	1,33	0,75	0,5
19	19/05/2017	48	90	7	1,13	1	3	3,5	1	1	0	1,83	4,67	1,5	2,75
20	23/05/2017	34	100	4	3,86	1	3	3,5	1	0	0	1	5,33	0,75	0,75
21	24/05/2017	49	90	1	0,46	1	3	3,5	0	0	0	0,2	0,4	2,5	0,5
22	07/06/2017	54	70	3	3,97	1	3	3	1	0	0	3,77	0,92	3,25	12,25
23	23/06/2017	37	90	3	15,21	2	4	2	0	0	1	1,8	2,4	1,25	2,25
24	30/06/2017	62	90	7	1,13	1	3	3	1	1	1	7,5	14	0,5	3,75
25	07/07/2017	68	80	1	5,6	2	2	3	0	0	0	1,23	0,15	6,5	8
26	19/07/2017	45	90	2	0,31	1	3	3,5	0	0	0	4,75	2	1	4,75
27	28/07/2017	37	90	1	13,9	1	3	3,5	0	0	0	3,5	1	1	3,5
28	26/07/2017	61	100	1	2,23	1	2	3,5	0	0	0	2,12	0,5	2	4,25
29	27/09/2017	60	90	4	1,29	1	4	1,5	0	0	1		0,8	5	
30	20/10/2017	49	90	1	0,46	2	3	3,5	0	0	0	0,3	0,05	20,5	6,25
31	20/10/2017	56	100	1	0,04	1	3	3,5	1	0	1	0,4	0,2	5	2
32	25/10/2017	69	70	6	0,9	1	2	3			1		2,4	2,5	
33	23/10/2017	56	90	2	5,72	1	3	3,5	0	0	0	0,4	0,4	5	2
34	01/11/2017	49	90	4	0,69	1	3	3,5	0	0	1	2,64	16	0,25	0,66
35	17/11/2017	60	90	2	0,11	1	2	3,5	0	0	0	0,07	0,14	13,75	1
36	22/12/2017	70	80	1	0,17	1	4	1	1	0	1	1,05	0,28	3,5	3,66
37	06/12/2017	64	70	1	8,28	1	2	3	1	0	1	9,32	4	0,25	2,33
38	07/02/2018	61	100	1	0,14	1	2	3,5	0	0	0	2,33	0,27	3,75	8,75
39	31/01/2018	62	90	1	0,37	1	2	3,5	0	0	0	0,64	0,18	5,5	3,5

Dça Extra: 1 sim, 2 não; Imunof: 1 lum B, 3 HER2, 4 TN; Status SLPED: 1 progressão, 2 sem progressão; PadrãoPDE: 1 difusa, 2 oligoprogr.

Status SG: 1 morto, 2 vivo

Apêndice 3 – Riscos competitivos

Tabela 10 - Teste de Fine-Gray entre as funções de incidências.

Variável	Evento	valor p	Evento	valor p
CTC 1 ($\leq 0,5$ vs $> 0,5$)	PED	0,007	PED-ED	0,005
	Morte	0,984	Morte	0,734
NL/CTC1 ($\leq 2,2$ vs $> 2,2$)	PED	0,568	PED-ED	0,085
	Morte	0,063	Morte	0,144
NL/CTC1 (≤ 2 vs > 2)	PED	0,341	PED-ED	0,121
	Morte	0,097	Morte	0,410
NL/CTC1 ($\leq 6,8$ vs $> 6,8$)	PED	0,430	PED-ED	0,063
	Morte	0,093	Morte	0,325
Número de lesões (≤ 3 vs > 3)	PED	0,545	PED-ED	0,353
	Morte	0,011	Morte	0,249
Número de lesões (≤ 5 vs > 5)	PED	0,505	PED-ED	0,142
	Morte	0,783	Morte	0,612
Número de lesões (≤ 6 vs > 6)	PED	0,825	PED-ED	0,244
	Morte	0,713	Morte	0,931
Imunofenótipo	PED	0,396	PED-ED	0,752
	Morte	0,158	Morte	0,022
DS-GPA (≤ 2 vs > 2)	PED	0,210	PED-ED	0,875
	Morte	0,060	Morte	0,009
DS-GPA (≤ 3 vs > 3)	PED	0,214	PED-ED	0,958
	Morte	0,293	Morte	0,026
DS-GPA ($\leq 3,5$ vs $> 3,5$)	PED	0,381	PED-ED	0,364
	Morte	0,830	Morte	0,693

Apêndice 4 – Modelo de regressão PED

Tabela 11 - Estimativas dos parâmetros do modelo de riscos proporcionais para a subdistribuição (desfecho PED na presença do óbito).

Variável	Categoria	RR	IC(95%)		valor p
			Inferior	Superior	
CTC 1	Contínua	0,919	0,772	1,090	0,340
CTC 1	≤0,5	Ref			
	>0,5	0,227	0,069	0,745	0,014
NL/CTC1	Contínua	1,03	0,992	1,070	0,120
NL/CTC1	≤2,2	Ref			
	>2,2	1,47	0,523	4,150	0,460
NL/CTC1	≤2	Ref			
	>2	1,77	0,649	4,82	0,270
NL/CTC1	≤6,8	Ref			
	>6,8	1,520	0,339	6,84	0,580
Número de lesões	Contínua	1,000	0,862	1,170	0,970
Número de lesões	≤3	Ref			
	>3	1,500	0,564	3,980	0,420
Número de lesões	≤5	Ref			
	>5	1,620	0,531	4,960	0,400
Número de lesões	≤6	Ref			
	>6	1,210	0,381	3,820	0,750
Imunofenótipo	HER2	Ref			
	Luminal B	0,656	0,180	2,390	0,520
	TN	1,719	0,542	5,450	0,360
DS-GPA	Contínua	0,679	0,378	1,220	0,200
DS-GPA	≤2	Ref			
	>2	0,508	0,168	1,54	0,230
DS-GPA	≤3	Ref			
	>3	0,508	0,191	1,350	0,180
DS-GPA	≤3,5	Ref			
	>3,5	0,430	0,076	2,440	0,340

Apêndice 5 – Modelo de regressão PED-ED

Tabela 12 - Estimativas dos parâmetros do modelo de riscos proporcionais para a subdistribuição (desfecho PED-ED na presença do óbito).

Variável	Categoria	RR	IC(95%)		valor p
			Inferior	Superior	
CTC 1	Contínua	0,582	0,237	1,430	0,240
CTC 1	<0,5	Ref			
	≥0,5	0,109	0,024	0,486	0,004
NL/CTC1	Contínua	1,070	1,040	1,110	<0,0001
NL/CTC1	≤2,2	Ref			
	>2,2	4,230	0,832	21,500	0,082
NL/CTC1	≤2	Ref			
	>2	3,710	0,729	18,900	0,110
NL/CTC1	≤6,8	Ref			
	>6,8	5,120	1,080	24,200	0,040
Número de lesões	Contínua	1,110	0,932	1,320	0,240
Número de lesões	≤3	Ref			
	>3	2,190	0,482	9,970	0,310
Número de lesões	≤5	Ref			
	>5	3,510	0,739	16,700	0,110
Número de lesões	≤6	Ref			
	>6	2,740	0,565	13,300	0,210
Imunofenótipo	HER2	Ref			
	Luminal B	0,442	0,051	3,860	0,460
	TN	0,698	0,085	5,760	0,740
DS-GPA	Contínua	1,060	0,462	2,440	0,890
DS-GPA	≤2	Ref			
	>2	1,140	0,142	9,190	0,900
DS-GPA	≤3	Ref			
	>3	1,010	0,183	5,550	0,990
DS-GPA	≤3,5	Ref			
	>3,5	NA			