

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES DE PACIENTES COM CÂNCER DE OVÁRIO

ANNA PAULA CARRETA RUANO

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

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Ludmilla Thomé Domingos
Chinen Co-orientador: Alexandre André Balieiro
Anastacio da Costa**

**São Paulo
Novembro de 2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Carreta Ruano, Anna Paula

**Avaliação e caracterização molecular de células tumorais
circulantes de pacientes com câncer de ovário/** Anna Paula Carreta Ruano
– São Paulo, 2024.

116p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Co-orientador: Alexandre André Balieiro Anastacio da Costa

Descritores: 1. Câncer de ovário/ovarian cancer. 2. Fusão Celular/fusion
cell. 3. Células Tumorais Circulantes/Circulating tumor cells.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Anna Paula Carreta Ruano

Título: Avaliação e caracterização molecular de células tumorais circulantes de pacientes com câncer de ovário

Aprovado em: 29/11/2024

Banca Examinadora

Orientador: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Co-orientador: Alexandre André Balieiro Anastacio da Costa

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dra. Vanessa Monteiro Sanvido

Instituição: Universidade Federal de São Paulo -UNIFESP

Membro da banca: Dra. Joao Paulo Da Silveira Nogueira

Instituição: A.C Camargo Cancer Center

Membro da banca: Dr. Dirce Maria Carraro

Instituição: A.C Camargo Cancer Center

Membro da banca: Dr. Tiago da Silva Medina

Instituição: A.C Camargo Cancer Center

APOIO FINANCEIRO: Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), bolsa de doutorado, processo 2021/04920-3 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, através de bolsa – processo GM/GD: 140440/2020-8 e da Faber Castell, Reserva SIGEO:5634.

*"A ciência é uma forma de amor ao
próximo." - Carl Sagan.*

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, cuja ausência sinto todos os dias, mas cuja presença continua viva em meu coração.

In memoriam, Neusa Maria Carreta Ruano e Paulo Antonio Ruano.

Neste momento de realização, olho para trás com gratidão pelas batalhas vencidas, pelos sacrifícios que fizeram por mim e pelos valores que sempre me ensinaram. Ainda que a vida os tenha levado para longe, sua influência permanece viva em cada conquista, e sinto a presença de vocês nos momentos de triunfo e de desafio.

Vocês foram os faróis que iluminaram o meu caminho desde o primeiro dia. Suas vidas foram testemunhos de amor incondicional, sacrifício e dedicação. Cada passo que dei na jornada da vida foi guiado pela sabedoria e valores que vocês gentilmente me ensinaram.

Mãe, sua gentileza, ternura e compaixão continuam a inspirar-me. Seu sorriso caloroso era capaz de acalmar as tempestades mais violentas em meu coração. Seu amor incondicional era o refúgio seguro para onde sempre podia voltar. Sua presença carinhosa é eternamente sentida em cada pensamento, em cada decisão.

Pai, sua força e determinação moldaram meu caráter e meu espírito. Seu compromisso incansável com a família e com seus ideais é uma lição que carrego comigo todos os dias. Sua voz sábia ainda ressoa em meus ouvidos, orientando-me em momentos de incerteza, incentivando-me a nunca desistir, mesmo nos momentos mais difíceis.

Juntos, vocês formaram um alicerce inabalável sobre o qual construí minha vida. A falta que vocês deixaram é profunda, mas o amor que cultivaram em meu coração é eterno. Enquanto embarco nesta jornada acadêmica, é com imensa gratidão e amor que dedico esta página da minha tese a vocês, que sempre acreditaram em mim, meus pais amados.

Que suas memórias permaneçam vivas em cada palavra que escrevo, em cada conquista que alcanço. Que eu possa honrar o legado que vocês deixaram, seguindo seus passos com humildade, coragem e amor.

Esta tese é dedicada a vocês, que mesmo não estando fisicamente presentes, são a luz que ilumina cada conquista.

Com amor e saudade eterna.

AGRADECIMENTOS

Aos inúmeros guerreiros que enfrentaram a batalha contra o câncer, e aos que ainda enfrentarão, dedico meus agradecimentos. A fé na ciência e na busca por tratamentos melhores é a força motriz de cada linha escrita nesta tese.

À Faber Castel, FAPESP e ao CNPQ, pelo auxílio financeiro que viabilizou esta pesquisa. Seu suporte foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da Oncologia Clínica, em especial à Dra. Andrea Guimarães, ao Dr. Alexandre Andre Balieiro, ao Dr. Virgílio Sousa, e à enfermeira de pesquisa Bruna Tirapelli, que têm trabalhado incansavelmente na linha de frente. Sua dedicação incansável é uma fonte constante de inspiração, motivando-nos a buscar avanços significativos na pesquisa.

Aos colegas do A.C. Camargo Cancer Center e do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino, agradeço pela troca de conhecimento e pelo ambiente colaborativo que enriqueceu minha jornada acadêmica.

À equipe da Pós-graduação e Biblioteca pelo suporte.

À minha querida orientadora, Ludmilla Thome Domingos Chinen, expresso minha mais profunda gratidão por sua presença constante e apoio incansável ao longo deste percurso acadêmico. Desde o momento em que embarquei nesta jornada desafiadora, você esteve ao meu lado, guiando-me com sabedoria, incentivando-me com palavras de encorajamento e compartilhando seu vasto conhecimento com generosidade.

Sua dedicação apaixonada pela pesquisa e pelo ensino deixou uma marca indelével em minha formação acadêmica e profissional. Suas orientações perspicazes não

apenas moldaram o conteúdo desta tese, mas também enriqueceram minha compreensão mais ampla do mundo acadêmico e do rigor exigido pela pesquisa científica.

Além de sua *expertise* profissional, quero expressar minha sincera admiração pela pessoa extraordinária que você é. Sua integridade, empatia e compromisso com o sucesso de seus alunos são verdadeiramente inspiradores. Sempre que enfrentei desafios pessoais ou acadêmicos, encontrei em você não apenas uma mentora, mas uma amiga e confidente em quem confiar.

É impossível expressar em palavras o quão profundamente sou grata por sua orientação e apoio ao longo desta jornada. Seu impacto transcende os limites desta tese; ele ecoará em cada conquista futura, em cada desafio superado e em cada nova fronteira da pesquisa que eu ousar explorar.

Que esta dedicatória sirva como um modesto tributo à sua dedicação incansável, sua paixão pela excelência e seu compromisso inabalável com os seus alunos. Que o mundo reconheça, assim como eu, a extraordinária contribuição que você faz para a academia e para as vidas daqueles que têm a sorte de cruzar seu caminho. Com profunda admiração e eterna gratidão.

Às minhas amigas/colegas de trabalho, Giovana Borella, pelo apoio nessa reta final do doutorado, Emne Ali Aballah, pela recepção no grupo e por todos os ensinamentos, Julia Cassin, pelo carinho e amizade ao longo desses anos, Jacqueline Torres, Pedro Henrique, Fernanda Lupinacci, Danilo, Debora, Estela e a todos os demais colegas de laboratório, cuja colaboração e amizade tornaram cada dia de trabalho mais relevante. Juntos, superamos obstáculos e celebramos vitórias.

À Alexcia Camila Braun, gostaria de expressar minha sincera gratidão, minha amiga e irmã do coração, por todo o apoio e companheirismo ao longo da minha jornada acadêmica. Sua presença foi fundamental em cada etapa do caminho, e seu apoio inabalável foi uma fonte constante de inspiração e força. Agradeço por estar sempre ao meu lado, compartilhando não apenas os momentos felizes, mas também os

desafios e as dificuldades. Sua amizade e sua sabedoria foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional, e tudo o que aprendi ao seu lado foi verdadeiramente enriquecedor. Sou imensamente grata por ter você como parte da minha vida e por todo o amor e apoio que você sempre me ofereceu.

A minha irmã Ana Carolina Carreta Ruano Abe, gostaria de expressar minha profunda gratidão, cujo apoio e encorajamento foram indispensáveis durante toda a realização desta tese. Sua paciência, compreensão e incentivo constante foram uma fonte inesgotável de motivação. A presença e o suporte que você me proporcionou ao longo desta jornada acadêmica fizeram uma diferença significativa e inestimável. Sou verdadeiramente grata por todo o amor e apoio que você me deu, sem os quais este trabalho não teria sido possível. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado e por acreditar em mim.

À minha querida afilhada Maria Clara Ruano Abe, com amor. Sua presença ilumina minha vida de uma forma que palavras não conseguem descrever. Sua alegria e inocência são um lembrete constante da beleza e simplicidade que devemos valorizar. Mesmo que ainda seja pequena, a energia e o amor que você traz para a minha vida são grandes e significativos. Obrigada por ser uma parte tão especial da minha vida e por me lembrar todos os dias do que realmente importa.

À minha família e amigos, gostaria de expressar minha profunda gratidão, cujo apoio e encorajamento foram fundamentais ao longo desta jornada acadêmica. À minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo amor, compreensão e incentivo, agradeço por serem meu porto seguro e minha fonte constante de força. Sua paciência e apoio foram essenciais para a realização deste trabalho. Aos meus amigos, agradeço por estarem presentes em todos os momentos, tanto nas vitórias quanto nas dificuldades. Sua amizade, conselhos e encorajamento foram de grande valor e me ajudaram a superar os desafios. Cada um de vocês teve um papel importante na minha vida e na conclusão desta tese. Sou eternamente grata por todo

o apoio e por fazerem parte da minha trajetória.

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que acreditam na ciência como uma ferramenta poderosa na busca por soluções para o câncer. A jornada pode ser árdua, mas é a esperança e a determinação coletiva que impulsionam nosso caminho em direção a um futuro mais promissor.

Muito obrigada!

RESUMO

RUANO, A.P.C. [AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES DE PACIENTES COM CÂNCER DE OVÁRIO]. São Paulo; 2024. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O câncer de ovário, uma das neoplasias mais letais em mulheres, demanda caracterização precisa para tratamentos eficazes. Apesar dos avanços, a resistência ao tratamento com inibidores de PARP (iPARP) é comum, por mecanismos intrínsecos ou desenvolvidos ao longo do tempo. Tumores iniciais ou lesões metastáticas podem liberar na corrente sanguínea células tumorais circulantes (CTCs), apresentando uma notável diversidade. Uma área de pesquisa em destaque envolve a fusão celular, um processo em que duas ou mais células se fundem, resultando em uma entidade celular única após a fusão das membranas plasmáticas.

Objetivo: Este estudo prospectivo analisou CTCs em pacientes com câncer de ovário submetidas a tratamento com Olaparibe. A pesquisa visou identificar fusões celulares entre CTCs e leucócitos, além de avaliar a expressão gênica relacionada à resistência ao iPARP e avaliar se as relações neutrófilo/linfócito e plaquetas/linfócito são indicadores prognósticos acessíveis em pacientes em tratamento. **Metodologia:**

Realizamos uma pesquisa prospectiva, coletando amostras de sangue total de 14 pacientes em três momentos distintos: linha de base, após um mês (primeiro acompanhamento) e após três meses (segundo acompanhamento). Essas amostras passaram por processamento e filtragem utilizando o sistema ISET. Em etapas subsequentes, empregamos a técnica de imunocitoquímica com dupla marcação para avaliar a expressão proteica de MC1-R, GnT-V, CD45, EpCAM e SPARC. Adicionalmente, realizamos uma análise de poliploidia utilizando o método de hibridização *in situ* cromogênica. **Resultados:** No total foram realizadas 38 coletas de sangue das pacientes com câncer de ovário incluídas. Os níveis de CTCs das pacientes na coleta *baseline* variaram de 0,33 a 9,91 CTCs/ml e a mediana foi de 0,58 CTCs/ml. No 1º *follow-up*, a mediana foi de 0,60 CTCs/ml, com níveis de 0,20 CTCs/ml

a 7,20 CTCs/ml e no 2º *follow-up*, a mediana foi de 1 CTC/ml com níveis de 1,00 CTCs/ml a 8,58 CTCs/ml. Utilizamos marcadores com possível correlação com o fenômeno de fusão celular MC1-R, Epcam, GnT-V, SPARC e CD45, bem como a análise da expressão da sonda CEN8 pela técnica de CISH. Encontramos expressão de MC1-R, EpCAM e CD45 nas células (híbridas) em pelo menos um dos momentos de coleta. A proteína com maior taxa de expressão foi o MC1-R, apresentando uma taxa de 71,42% (10/14) no início do estudo, no primeiro *follow-up* 71,42% (10/14) e no segundo *follow-up* 50% (5/10). Além disso, a presença de microêmbolos tumorais circulantes (MTC) no primeiro *follow-up* foi associada a uma sobrevida livre de recorrência (SLR) ruim (5,2 vs. 12,2 meses; $p = 0,005$). A expressão de MC1-R em MTC no primeiro e segundo *follow-up* foi associada a um SLR mais curta ($p = 0,005$). A expressão de CEN8 em CTCs também foi relacionada a SLR mais curta ($p = 0,035$). Conclusão: Até o momento, nossas descobertas apresentam novas perspectivas sobre o microambiente tumoral. Estudos futuros, envolvendo diversos tipos de tumores e uma coorte mais ampla, têm o potencial de impactar significativamente a resposta imunológica. A presença das células híbridas pode ser considerada como um elemento-chave no mecanismo de metástase do câncer, podendo evoluir como um componente essencial no processo diagnóstico da doença.

Palavras-chave: células tumorais circulantes, fusão celular, câncer de ovário, hibridização in situ.

ABSTRACT

Title: RUANO, A.P.C. [EVALUATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN PATIENTS WITH OVARIAN CANCER]. São Paulo; 2024. [Doctoral Thesis - Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Ovarian cancer, one of the deadliest cancers in women, requires precise characterization for effective treatments. Despite advancements, resistance to PARP inhibitors (iPARP) is common, arising from intrinsic mechanisms or those developed over time. Early tumors or metastatic lesions can release circulating tumor cells (CTCs) into the bloodstream, exhibiting remarkable diversity. One prominent area of research involves cell fusion, a process in which two or more cells merge, resulting in a single entity after the fusion of plasma membranes. **Objective:** This prospective study analyzed CTCs in patients with ovarian cancer undergoing treatment with Olaparib. The research aimed to identify cell fusions between CTCs and leukocytes, assess gene expression related to resistance to iPARP, and evaluate whether the neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratios are accessible prognostic indicators in patients undergoing treatment. **Methodology:** We conducted a prospective study, collecting total blood samples from 14 patients at three distinct time points: baseline, one month after (first follow-up), and three months after (second follow-up). These samples were processed and filtered using the ISET system. Subsequent stages involved immunocytochemistry with dual labeling to evaluate the protein expression of MC1-R, GnT-V, CD45, EpCAM, and SPARC. Additionally, we performed a polyploidy analysis using chromogenic in situ hybridization (CISH). **Results:** A total of 38 blood collections were made from ovarian cancer patients included in the study. CTC levels in the baseline sample ranged from 0.33 to 9.91 CTCs/ml, with a median of 0.58 CTCs/ml. In the first follow-up, the median was 0.60 CTCs/ml, with levels ranging from 0.20 to 7.20 CTCs/ml, and in the second follow-up, the median was 1 CTC/ml, with levels ranging from 1.00 to 8.58 CTCs/ml. We used markers with potential correlation to the cell fusion phenomenon, including MC1-R, EpCAM, GnT-V, SPARC, and CD45, along with analysis of the CEN8 probe

expression using CISH. We found expression of MC1-R, EpCAM, and CD45 in hybrid cells at least at one of the collection time points. The protein with the highest expression rate was MC1-R, showing an expression rate of 71.42% (10/14) at the beginning of the study, 71.42% (10/14) at the first follow-up, and 50% (5/10) at the second follow-up. Moreover, the presence of circulating tumor microemboli (CTM) in the first follow-up was associated with poor recurrence-free survival (RFS) (5.2 vs. 12.2 months; $p = 0.005$). MC1-R expression in CTM at the first and second follow-ups was associated with shorter RFS ($p = 0.005$). The expression of CEN8 in CTCs was also related to shorter RFS ($p = 0.035$). **Conclusion:** So far, our findings provide new perspectives on the tumor microenvironment. Future studies, involving various tumor types and a larger cohort, have the potential to significantly impact immune response. The presence of hybrid cells may be considered a key element in the metastasis mechanism of cancer and could evolve into an essential component in the diagnostic process of the disease.

Keywords: circulating tumor cells, cell fusion, ovarian cancer, in situ hybridization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Representação anatômica do sistema reprodutor feminino
- Figura 2 Métodos de diagnóstico do câncer de ovário
- Figura 3 Efeito dos inibidores de PARP em células normais e tumorais
- Figura 4 Reparo de quebras de dupla hélice (DSBs) no DNA.
- Figura 5 Inibidores de PARP (PARPi)
- Figura 6 Esquema da proteína SLFN11
- Figura 7 Esquema da proteína REV7
- Figura 8 Esquema do BRCA1 na regulação da sinalização 53BP1
- Figura 9 Diagrama esquemático dos complexos Shelterin e CST
- Figura 10 Ilustrações históricas de células tumorais circulantes observadas por Thomas Ashworth
- Figura 11 Visão geral da cascata metastática
- Figura 12 Mecanismos de Disseminação das Células Tumorais
- Figura 13 Desenho Ilustrativo da Fusão Celular
- Figura 14 Tecnologias para enriquecimento, detecção e caracterização de CTCs
- Figura 15 Procedimento para Detecção de Células Tumorais Circulantes com o Sistema ISET

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela dos principais tipos de câncer de ovário
Tabela 2	Tabela do estadiamento mais comumente utilizado para o câncer de ovário
Tabela 3	Principais tipos de tratamento utilizados no manejo do câncer ovariano
Tabela 4	Métodos analíticos para isolamento de CTC para câncer de ovário
Tabela 5	Descrição e Diluições Padronizadas dos Anticorpos Utilizados
Tabela 6	Seleção dos Anticorpos para Análise de Expressão Proteica

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CO	Câncer de ovário
CTC	Células Tumorais Circulantes
CA-125	<i>Cancer Antigen 125</i>
HGSOC	Câncer de ovário seroso de alto grau
ICQ	Imunocitoquímica
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
ISET	<i>Isolation by size of tumor cells</i>
MTC	Microêmbolos Tumorais Circulantes
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
ddPCR	<i>Droplet Digital Polymerase Chain Reaction</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TME	Transição Mesênquima-Epitélio
TEM	Transição Epitélio-Mesênquima
DAB	Diaminobenzidina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
TC	Tomografia computadorizada
RM	Ressonância magnética
NAC	Quimioterapia neoadjuvante
CBDCA	Carboplatina
iPARP	Inibidores de PARP
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
PD-1	Proteína 1 de Morte Celular Programada
PD-L1	Ligante de Morte Programada 1
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
NHEJ	Junção de extremidades não homólogas
RRH	Reparo por recombinação homóloga
BRCA1	<i>Breast Cancer 1, early onset</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2, early onset</i>
TP53	Tumor Protein 53
BER	Reparo por excisão de bases
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related
Exo1	Exonuclease 1
Mre11-Rad50-Nbs1	Proteína MRN complex
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
HR	Recombinação Homóloga
SLFN11	Schlafen 11
REV7/MAD2L2	<i>Mitotic arrest deficient 2 likes 2</i>
53BP1	<i>p53-Binding Protein 1</i>
CTC1	Componente 1 do Complexo de Replicação de telômeros
MC1R	Receptor de melanocortina 1

EPCAM Antígeno Epitelial da Célula Adenocarcinoma
SPARC Proteína Secretada, Ácida e Rica em Cisteína
GNT-V Glucoamylase-N-transferase-V
CD45 *Cluster* de diferenciação 45
CEN 8Centrômero 8
EPISPOT *EPithelial ImmunoSPOT*
TBS *Tris Buffered Saline*
CISH Hibridização in situ cromogênica
DSBs *Double Strand Breaks* (reparo de dupla fita)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	22
1.1 Câncer de ovário	22
1.2 Câncer de ovário seroso de alto grau	24
1.3 Diagnóstico do câncer de ovário seroso de alto grau	25
1.4 Tratamento do câncer de ovário seroso de alto grau	30
1.5 BRCA1/BRCA2 e via de sinalização de reparo por recombinação homóloga.....	34
1.6 iPARP e genes ligados a recuperação da via de recombinação homóloga.....	37
1.7 Biópsia Tradicional.....	43
1.8 Biópsia Líquida	44
1.9 Células tumorais circulantes	45
1.10 Mecanismos de disseminação das CTCs.....	47
1.11 Interações entre células imunes e CTCs.....	51
1.12 Detecção de CTCs	56
2. Objetivos	60
2.1 Objetivos primários	60
2.2 Objetivos secundários.....	60
3. Materiais e métodos.....	61
3.1 Critérios Gerais de Inclusão e Exclusão.....	61
3.1.1 Critérios Gerais de Inclusão para pacientes com câncer de ovário: 61	
3.1.2 Critérios Gerais de Exclusão para pacientes com câncer de ovário: 61	
3.2 Detecção de células tumorais circulantes.....	62
3.3 Imunocitoquímica	62
3.4 Padronização de Anticorpos na Imunocitoquímica (ICC)	63
3.5 Extração de DNA e RNA de Células Tumorais Circulantes	65
3.6 Quantificação fluorométrica qubit.....	65
4. Resultados e Discussão	69
4.1 Fusão celular	69

4.2 Genes	70
4.3 Relação neutrófilo/linfócito (RNL) e a relação plaquetas/linfócitos (RPL)	70
5. Conclusão	72
6. Referências	74
7. Artigos Publicados	91
Anexo 1	93
APÊNDICE	112

1. Introdução

1.1 Câncer de ovário

O câncer de ovário (CO) é uma condição grave que afeta milhares de mulheres em todo o mundo. Em 2020, foram estimados cerca de 313.959 novos casos de câncer de ovário globalmente, representando aproximadamente 3,4% de todos os novos diagnósticos de câncer em mulheres (GLOBOCAN 2020). No Brasil, a estimativa para o biênio 2023-2024 indica cerca de 7.270 novos casos por ano, tornando o câncer de ovário o oitavo tipo de câncer mais comum entre as mulheres (INCA 2023). Esses números destacam a importância de abordagens eficazes para o diagnóstico e tratamento dessa doença, tornando-se uma das principais preocupações em saúde feminina. Este tipo de câncer pode se desenvolver a partir de diferentes tipos de células no ovário, resultando em vários subtipos histológicos, dependendo da origem celular. O carcinoma de células epiteliais é o mais comum e se desenvolve a partir das células que revestem a superfície externa dos ovários (**Figura 1**). É subdividido em subtipos, como seroso, mucinoso, endometrioides e de células claras, representando a maioria dos casos diagnosticados (**Tabela 1**).

Os tumores de células germinativas desenvolvem-se a partir das células que produzem os óvulos e podem apresentar características distintas em termos de comportamento e tratamento. Eles incluem teratomas e disgerminomas. Os tumores estromais originam-se dos tecidos de suporte dos ovários, chamados estroma. Um exemplo é o tumor de células da granulosa, que é raro.

Tabela 1. Tabela dos principais tipos de câncer de ovário, categorizados com base em sua origem e características histológicas. Cada tipo é acompanhado por uma breve descrição das características distintivas.

Tipos de tumor	Subtipo de tumor	Principais características	Ref.
Câncer de ovário epitelial	Tumores serosos de alto grau	70% de todos os tipos de tumor Prognóstico mais fatal Taxa de mortalidade em 10 anos de 70%	PUNZON-JIMENEZ et al. 2022
Câncer de ovário epitelial	Tumores serosos de baixo grau	<5% de todos os tipos de tumor Diagnosticado em idade mais jovem Melhor prognóstico do que tumores serosos de alto grau	BABAIER et al. 2022

Câncer de ovário epitelial	Carcinomas endometrioides	Pode ser originado da endometriose Bom prognóstico 10% dos casos	DE NONNEVILLE et al. 2021
Câncer de ovário epitelial	Carcinomas de células claras	10% dos cânceres epiteliais de ovário Frequentemente diagnosticado em estágios iniciais Se diagnosticado tardiamente tem mau prognóstico	DEL CARMEN et al. 2012
Câncer de ovário epitelial	Carcinoma mucinoso	Tipo menos comum de câncer epitelial de ovário Diagnóstico diferencial com metástases do trato gastrointestinal para o ovário	BABAIER et al. 2020 CRANE et al. 2018
Câncer de ovário de células estromais	Câncer de ovário de células estromais	Câncer de ovário menos comum Menos de 2% de todos os cânceres primários de ovário Raramente maligno Geralmente diagnosticado precocemente pode diminuir o risco	DAVIDSON et al. 2014 YOUNG et al. 2018
Câncer de ovário de células germinativas		Raro Representa apenas 3% de todos os cânceres de ovário São as neoplasias benignas ou malignas derivadas das células germinativas primitivas, correspondendo de 20 a 25% dos tumores de ovário (5% das neoplasias malignas do ovário) e acometem preferencialmente jovens de 10 a 30 anos.	SHAABAN et al. 2014 DEBUQUO Y et al. 2020

Diagnosticar o câncer de ovário pode ser complexo, especialmente porque os sintomas geralmente são vagos e podem ser atribuídos a outras condições. Isso significa que muitas vezes é detectado em estágios avançados (EBELL et al. 2016). Os sintomas podem incluir dor abdominal, inchaço, mudanças nos hábitos intestinais e urinários, fadiga e perda de peso inexplicada (STEWART et al. 2019). Os métodos de diagnóstico incluem exames de imagem, como ultrassonografia transvaginal e tomografia computadorizada, além de testes de marcadores tumorais, como o CA-125 (*cancer antigen 125*), um marcador tumoral que pode estar elevado em mulheres com câncer de ovário. No entanto, o CA-125 também pode estar elevado em outras condições benignas e em estágios iniciais do câncer de ovário, portanto, não é específico o suficiente para ser usado isoladamente para diagnóstico. O diagnóstico definitivo geralmente requer uma biópsia, na qual uma amostra de tecido é retirada e examinada microscopicamente (QING et al. 2022).

O tratamento do câncer de ovário é multifacetado e depende de fatores como o estágio da doença, a extensão do tumor e a saúde geral da paciente. Geralmente, envolve uma combinação de cirurgia, para remover o tumor e tecido afetado, e quimioterapia, para destruir quaisquer células cancerígenas remanescentes. Em

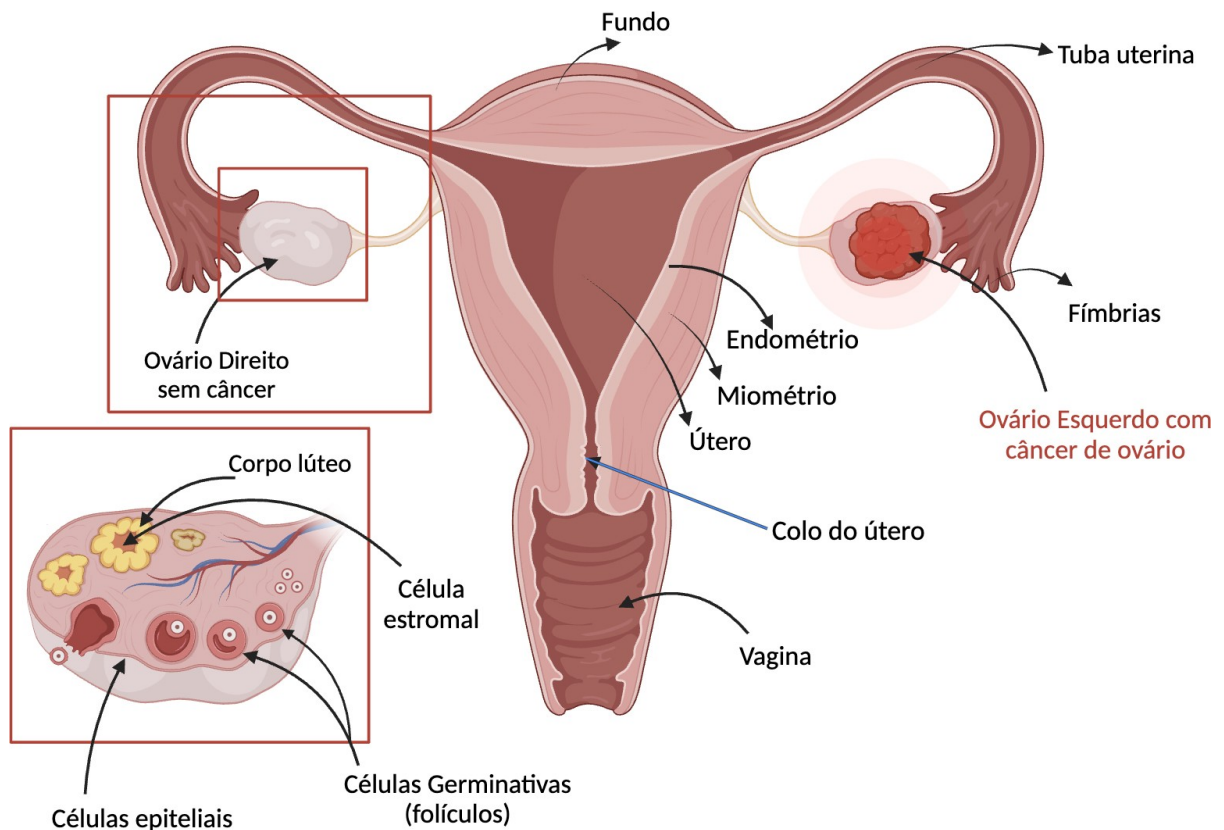
alguns casos, a radioterapia também pode ser recomendada (CORTEZ et al. 2017).

Em resumo, o câncer de ovário, incluindo o subtipo seroso de alto grau, é uma condição séria que requer vigilância e tratamento diligentes. A pesquisa contínua nessa área é crucial para melhorar as opções de diagnóstico e tratamento, bem como para aumentar as taxas de sobrevivência e qualidade de vida para as mulheres afetadas por essa doença devastadora.

1.2 Câncer de ovário seroso de alto grau

Dentro do espectro do câncer de ovário, o carcinoma seroso de alto grau é uma forma particularmente agressiva da doença (o subtipo mais prevalente e letal do câncer de ovário, responsável por 70-80% das mortes associadas). Tende a se espalhar rapidamente para outros órgãos e tecidos, dificultando o tratamento e reduzindo as taxas de sobrevivência. Seu diagnóstico e tratamento seguem princípios semelhantes aos do câncer de ovário em geral, mas pode exigir abordagens mais agressivas devido à sua natureza invasiva (SUNG et al. 2021).

O HGSOC ou carcinoma seroso de alto grau de ovário (*High-Grade Serous Ovarian Carcinoma*) é caracterizado por sua agressividade e alta instabilidade genômica. A doença é frequentemente diagnosticada em estágio avançado, com uma taxa de sobrevivência de 5 anos. Evidências indicam que a tuba uterina, especialmente em mulheres com mutações *BRCA* (*Breast Cancer*), pode ser o local primário de origem do HGSOC. A doença tende a se espalhar dentro da cavidade peritoneal e é diagnosticada tardiamente devido a sintomas inespecíficos (LISIO et al. 2019).



Fonte: Autora, 2024. Biorender.

Figura 1: Representação anatômica do sistema reprodutor feminino. Na figura, observa-se uma representação anatômica do sistema reprodutor feminino, destacando os ovários como estruturas pequenas, em forma de amêndoa, localizadas bilateralmente na pelve, próximas às extremidades das tubas uterinas. O útero é identificado como uma estrutura maior, em forma de pêra, situada centralmente na pelve, entre os ovários e acima da vagina. A vagina é mostrada como um canal muscular que se estende do útero até a vulva, a abertura externa do sistema reprodutor feminino. Pode-se observar a presença de massas tumorais nos ovários, representadas por crescimentos anormais e indesejados de células. Essas massas podem variar em tamanho e localização dentro dos ovários, podendo também se estender para as trompas de Falópio ou outras estruturas adjacentes, como o útero ou os tecidos circundantes da pelve.

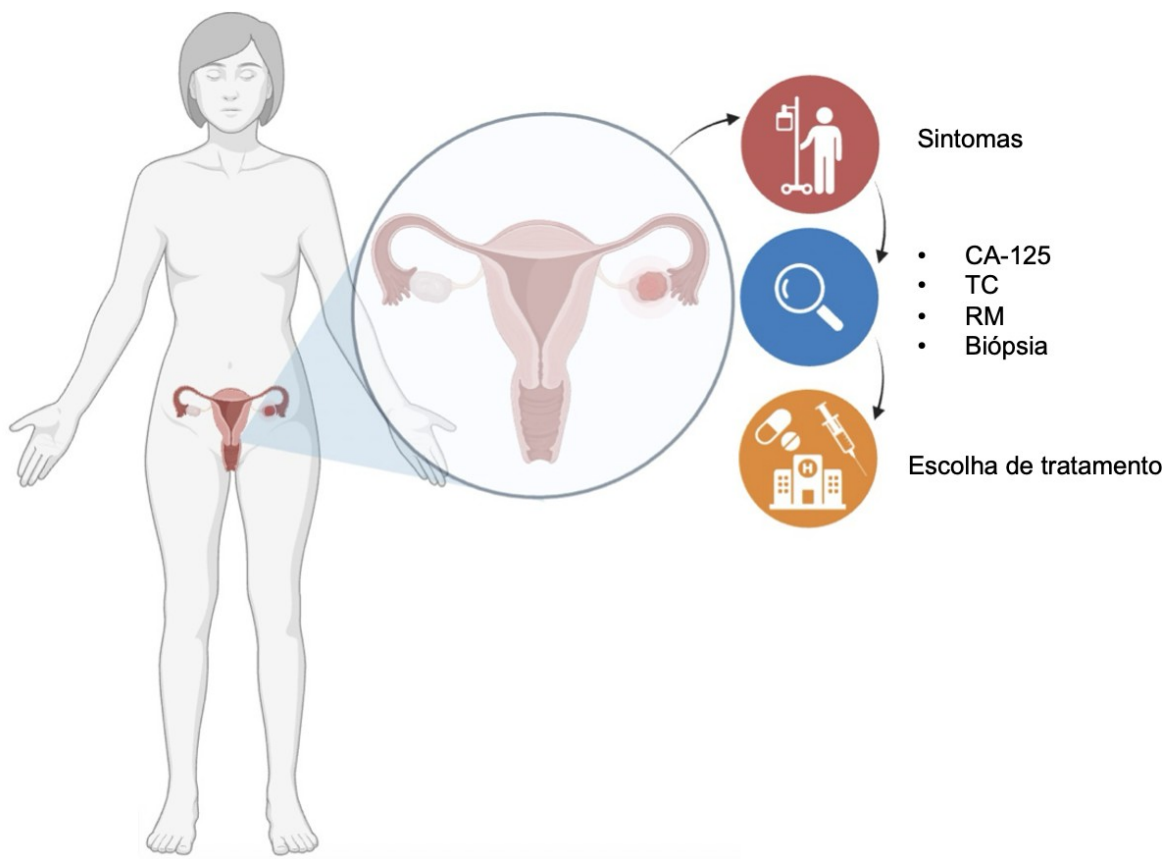
Geneticamente, o HGSOC é marcado por mutações em TP53 (Tumor Protein 53) e defeitos na via de recombinação homóloga, além das mutações nos genes BRCA1 (Breast Cancer 1, early onset) BRCA2 (Breast Cancer 2, early onset) (RAMUS et al. 2009).

1.3 Diagnóstico do câncer de ovário seroso de alto grau

O diagnóstico do câncer de ovário seroso de alto grau é um processo complexo e desafiador, que envolve um alto índice de suspeição. Este tipo agressivo de câncer ovariano demanda uma investigação minuciosa para garantir um diagnóstico preciso e uma estratégia terapêutica eficaz.

Inicialmente, o diagnóstico muitas vezes começa com a apresentação clínica da paciente e a análise de sintomas inespecíficos, como dor abdominal, distensão abdominal, mudanças no hábito intestinal ou urinário, perda de peso inexplicada e fadiga persistente, além de análises de sangue para detectar marcadores tumorais, como o CA-125. Um exame físico cuidadoso, incluindo um exame pélvico, pode revelar a presença de uma massa anormal nos ovários ou no abdômen, levando à suspeita inicial de câncer de ovário (BANKHEAD et al. 2005; KOBAYASHI et al. 2012; MUINAO et al. 2019; CHAN et al. 2022).

Para confirmar o a suspeita diagnóstica, exames de imagem como ultrassonografia pélvica e abdominal, tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) são frequentemente realizados para avaliar a extensão do tumor e determinar se houve disseminação para outros órgãos (**Figura 2**). Esses exames podem ajudar a guiar o próximo passo no processo diagnóstico, que muitas vezes inclui uma biópsia do ovário ou de uma lesão suspeita para análise patológica (LIU et al. 2007; FISCHEROVÁ et al. 2014).



Fonte: Autora, 2024. Biorender.

Figura 2: Métodos de diagnóstico do câncer de ovário: Incluem exames de imagem, dosagem de marcadores tumorais, procedimentos de biópsia e análises laboratoriais. Esses elementos proporcionam uma compreensão abrangente dos métodos utilizados para identificar a doença e avaliar a condição da paciente.

O diagnóstico é fechado a partir da análise patológica da amostra de tecido obtida em cirurgia, e é essencial para confirmar o diagnóstico de câncer de ovário seroso de alto grau. O patologista examina microscopicamente as células tumorais para identificar características específicas associadas a esse tipo de câncer, como atipia celular, padrões de crescimento anormal e marcadores moleculares distintivos (VANG et al. 2009; LEE et al. 2020).

Além disso, os testes genéticos desempenham um papel cada vez mais importante na compreensão de características específicas de cada câncer de ovário seroso de alto grau. Os testes de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são especialmente relevantes, pois mutações nesses genes estão frequentemente associadas a esse tipo de câncer. A identificação de mutações genéticas específicas pode não apenas confirmar o diagnóstico, mas também fornecer informações valiosas sobre o prognóstico e orientar as opções de tratamento, como terapias direcionadas

ou profilaxia contra o câncer em familiares de alto risco (McALPINE et al. 2012; TURASHVILI et al. 2020).

Além de um papel no diagnóstico do câncer de ovário, a cirurgia tem um papel fundamental no estadiamento, que envolve determinar a extensão do câncer no corpo (**Tabela 2**). Isso inclui avaliar o tamanho do tumor, acometimento linfonodal e se há metástase para outros órgãos, como o fígado ou os pulmões. O estadiamento é crucial para orientar o plano de tratamento e prever o prognóstico da paciente. O sistema de estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) classifica o câncer com base na extensão do tumor, na invasão dos tecidos circundantes e na disseminação para outros órgãos (MUTCH et al. 2014; PRAT et al. 2015).

Tabela 2. Sistema de estadiamento de câncer de ovário, trompa de Falópio e peritoneal FIGO 2014 e TNM correspondente. Este sistema classifica o estágio do câncer com base no tamanho e na extensão do tumor primário (T), na presença de metástases em linfonodos regionais (N) e na presença de metástases à distância (M). Cada estágio é designado por uma combinação de letras e números que indicam o grau de progressão da doença, permitindo uma melhor compreensão da sua extensão e orientando o planejamento do tratamento. Adaptado de MUTCH et al. 2014; PRAT et al. 2015).

Estadiamento FIGO para o Câncer de Ovário	
Estágio	Descrição
Estágio 1 T1-N0-M0	O câncer está confinado aos ovários ou trompa(s) de falópio
T1a-N0-M0	IA: tumor limitado a um ovário (cápsula intacta) ou trompa de Falópio; nenhum tumor na superfície do ovário ou da trompa de Falópio; nenhuma célula maligna na ascite ou nas lavagens peritoneais
T1b-N0-M0	IB: tumor limitado a ambos os ovários (cápsulas intactas) ou trompas de Falópio; nenhum tumor na superfície do ovário ou da trompa de Falópio; nenhuma célula maligna na ascite ou nas lavagens peritoneais
T1c1-N0-M0	CI: tumor limitado a um ou ambos os ovários ou trompas de Falópio, com qualquer um dos seguintes: IC1: derramamento cirúrgico

T1c2-N0-M0	IC2: cápsula rompida antes da cirurgia ou tumor na superfície do ovário ou da trompa de Falópio
T1c3-N0-M0	IC3: células malignas na ascite ou lavados peritoneais
Estágio II. T2-N0-M0	O tumor envolve um ou ambos os ovários ou trompas de falópio com extensão pélvica (abaixo da borda pélvica) ou câncer peritoneal primário
T2a-N0-M0	IIA: extensão e/ou implantes no útero e/ou trompas de falópio e/ou ovários
T2b-N0-M0	IIB: extensão para outros tecidos intraperitoneais pélvicos
Estágio III. T1/T2-N1-M0	O tumor envolve um ou ambos os ovários ou trompas de falópio, ou câncer peritoneal primário, com disseminação confirmada citológica ou histologicamente para o peritônio fora da pelve e/ou metástase para os linfonodos retroperitoneais
T3a2-N0/N1-M0	IIIA1: apenas linfonodos retroperitoneais positivos (comprovados citologicamente ou histologicamente): IIIA1(i) Metástase de até 10 mm na maior dimensão IIIA1(ii) Metástase maior que 10 mm na maior dimensão IIIA2: envolvimento peritoneal microscópico extrapélvico (acima da borda pélvica) com ou sem linfonodos retroperitoneais positivos
T3b-N0/N1-M0	IIIB: metástase peritoneal macroscópica além da pelve até 2 cm na maior dimensão, com ou sem metástase para os linfonodos retroperitoneais
T3c-N0/N1-M0	IIIC: metástase peritoneal macroscópica além da pelve, com mais de 2 cm na maior dimensão, com ou sem metástase para os linfonodos retroperitoneais (inclui extensão do tumor para a cápsula do fígado e baço sem envolvimento parenquimatoso de qualquer órgão)
Estágio IV.	Metástase à distância, excluindo metástases peritoneais
Qualquer T, qualquer N, M1	Estágio IVA: derrame pleural com citologia positiva Estágio IVB: metástases parenquimatosas e metástases para órgãos extra-abdominais (incluindo linfonodos inguinais e linfonodos fora da cavidade abdominal)

Em resumo, o diagnóstico do câncer de ovário seroso de alto grau é um processo desafiador pelos sintomas inespecíficos com que a doença se apresenta que envolve um alto índice de suspeição e aplica uma variedade de abordagens clínicas, laboratoriais e genéticas. Uma abordagem multidisciplinar e personalizada é essencial para garantir um diagnóstico e um prognóstico preciso e fornecer a melhor estratégia de tratamento para cada paciente.

1.4 Tratamento do câncer de ovário seroso de alto grau

O tratamento do câncer de ovário geralmente envolve uma abordagem multidisciplinar que pode incluir cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapias direcionadas (**Tabela 3**). A escolha do tratamento depende de vários fatores, incluindo o estágio do câncer, o tipo histológico, a idade e a saúde geral da paciente, bem como suas preferências pessoais. A cirurgia é frequentemente o primeiro passo no tratamento do câncer de ovário. O objetivo da cirurgia no tratamento é remover o máximo possível do tumor, bem como qualquer tecido circundante afetado. A cirurgia deve incluir necessariamente uma histerectomia total abdominal, salpingooforectomia abdominal e omentectomia, e inspeção de toda a cavidade abdominal com o objetivo de retirar completamente qualquer foco visível de doença. (ARMSTRONG et al. 2021).

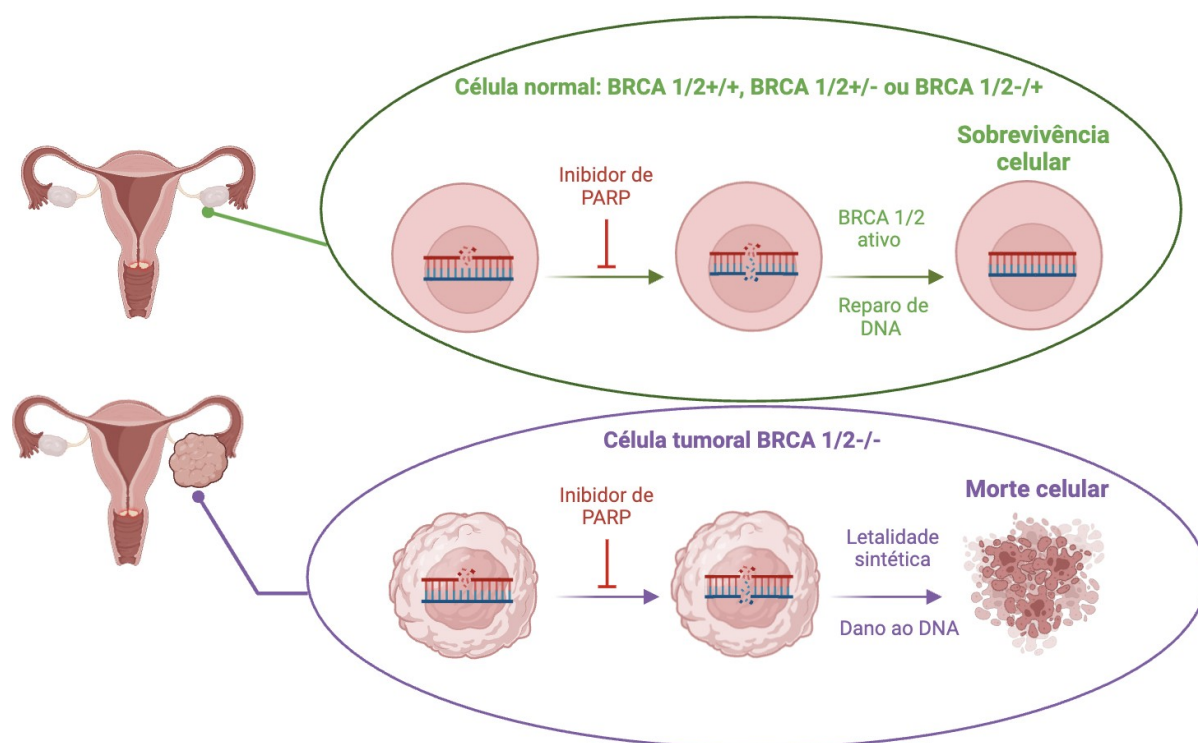
No caso do carcinoma seroso de alto grau, mesmo nos estágios mais iniciais a cirurgia deve ser seguida por quimioterapia para reduzir o risco de recidiva. A quimioterapia é frequentemente usada após a cirurgia para destruir as células cancerosas e prevenir a recorrência (QUERLEU et al. 2017). Mas, também, pode ser administrada antes da cirurgia (quimioterapia neoadjuvante) para reduzir o tamanho do tumor e facilitar a remoção cirúrgica (VERGOTE et al. 2010). A quimioterapia também pode ser usada como tratamento principal em pacientes com câncer de ovário avançado que não são candidatas à cirurgia (KEHOE et al. 2015). As drogas comumente utilizadas no tratamento são: a) Carboplatina: um agente de platina que é o principal grupo de drogas no tratamento do câncer de ovário. As platinas se ligam ao DNA formando monoadutos de DNA, e ligações cruzadas entre as fitas de DNA e dentro de uma mesma fita de DNA (*"intra-strand and inter-strand cross links"*). Estas lesões vão, em última instância, gerar lesões de dupla fita de DNA que levará à morte celular caso não sejam reparadas por um sistema funcionante de reparo de DNA, principalmente a via da recombinação homóloga. b) Paclitaxel: um agente anti-microtubular que é frequentemente administrado em combinação com carboplatina ou outros agentes quimioterápicos (MAHMOOD et al. 2020).

Tabela 3. Principais tipos de tratamento utilizados no manejo do câncer ovariano, incluindo cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia alvo, imunoterapia, hormonoterapia e cuidados paliativos. Adaptado de CORTEZ et al. 2017; ZHU et al. 2016; YANG et al. 2019; KUROI et al. 2020).

Tipo de Tratamento	Descrição
Cirurgia	Histerectomia Total: Remoção do útero. Salpingo-ooforectomia Bilateral: Remoção de ambos os ovários e trompas de Falópio. Omentectomia: Remoção do omento (uma camada de tecido adiposo no abdômen). Citorredução Tumoral: Remoção do máximo possível do tumor.
Quimioterapia	Paclitaxel (Taxol): Medicamento que interfere no crescimento das células cancerígenas. Carboplatina: Agente alquilante que causa danos no DNA das células cancerígenas. Cisplatina: Medicamento que causa ligações cruzadas no DNA, impedindo a replicação celular.
Radioterapia	Radioterapia Externa: Uso de uma máquina para direcionar radiação para o tumor. Braquiterapia: Colocação de material radioativo diretamente dentro ou próximo ao tumor.
Terapia Alvo	Bevacizumabe (Avastin): Inibidor de angiogênese que impede a formação de novos vasos sanguíneos que alimentam o tumor. Olaparibe: Inibidor de PARP que interfere no reparo do DNA em células cancerígenas com mutações BRCA.
Imunoterapia	Pembrolizumabe: Inibidor de PD-1 que ajuda o sistema imunológico a reconhecer e atacar células cancerígenas.
Hormonoterapia	Tamoxifeno: Modulador seletivo do receptor de estrogênio usado para bloquear o efeito do estrogênio nas células cancerígenas. Letrozol: Inibidor de aromatase que reduz a produção de estrogênio no corpo.
Cuidados Paliativos	Manejo da Dor: Uso de analgésicos como opióides (morfina, oxicodona) e não opióides (paracetamol, ibuprofeno). Suporte Nutricional: Dieta balanceada e, se necessário, nutrição parenteral ou enteral. Controle de Sintomas: Medicamentos para

	náuseas, vômitos, fadiga, e outros sintomas associados ao câncer e ao seu tratamento.
--	---

Terapias direcionadas, como os inibidores de PARP (olaparibe), têm se mostrado eficazes em pacientes com mutações genéticas específicas, como as mutações nos genes *BRCA*, demonstrando uma sobrevida livre de progressão (SLP) mediana de 11,2 meses com olaparibe versus 4,3 meses com placebo (LEDERMANN et al. 2014) no cenário de tratamento de recidiva platina sensível. Além disso, o tratamento de manutenção com olaparibe melhorou a sobrevida global (SG), razão de risco (HR, do inglês *Hazard Ratio*) para SG foi de 0,52 (MATULONIS et al. 2016). Esses medicamentos visam bloquear os mecanismos de reparo do DNA nas células cancerosas, impedindo-as de se multiplicarem e se espalharem. O olaparibe é um avanço revolucionário no tratamento do câncer de ovário. Sua ação é profunda e precisa: ao inibir a enzima PARP, ele interfere na capacidade das células cancerosas de reparar seu próprio DNA, levando-as à morte seletiva. Esse mecanismo é particularmente eficaz em pacientes com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, pois essas mutações tornam as células tumorais especialmente sensíveis à inibição da PARP (TEW et al. 2020) (**Figura 3**).



Fonte: Autora, 2024. Biorender.

Figura 3. A imagem ilustrativa dos efeitos dos inibidores de PARP em células normais e tumorais. Em células normais com *BRCA* funcional, o reparo do DNA continua levando à sobrevivência celular. Em células tumorais com mutação *BRCA*, a inibição de PARP impede o reparo do DNA, causando danos acumulados e morte celular. Este mecanismo é utilizado no tratamento de cânceres associados a mutações *BRCA*.

Outro tipo de terapia direcionada é o tratamento com Bevacizumabe: um anticorpo monoclonal que visa o *VEGF* (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*), que desempenha um papel importante no crescimento dos vasos sanguíneos que alimentam o tumor. Um estudo de fase III avaliou a combinação de olaparibe e bevacizumabe como terapia de manutenção em pacientes com câncer de ovário avançado, independente do status de mutação *BRCA*. A combinação mostrou um aumento significativo na SLP com mediana de 22,1 meses para o grupo olaparibe versus 16,6 meses para o placebo. A maior vantagem foi observada em pacientes com tumores com deficiência de recombinação homóloga (HRD, do inglês *Homologous Recombination Deficiency*), incluindo aqueles sem mutação *BRCA* que apresentavam deficiência de recombinação homóloga por outras causas. Os eventos adversos foram consistentes com os perfis de segurança conhecidos dos

medicamentos (RAY-COQUARD et al. 2019).

Além dessas modalidades, a imunoterapia, uma abordagem inovadora que estimula o sistema imunológico a reconhecer e atacar as células cancerosas, está sendo investigada para o tratamento do câncer de ovário. É o caso dos inibidores de *checkpoint* imunológico: os inibidores de *PD-1/PD-L1* estão sendo investigados para o tratamento do câncer de ovário seroso de alto grau. Uma meta-análise avaliou a eficácia dos inibidores de *PD-1/PD-L1* em câncer de ovário, mostrando uma taxa de resposta geral de 19%. Os inibidores monoespecíficos tiveram uma taxa de resposta geral de 9%, enquanto a combinação de inibidores de *PD-1/PD-L1* com quimioterapia apresentou a maior taxa de resposta geral de 36% (ZHU et al. 2021). Os resultados sugerem que os inibidores de *PD-1/PD-L1* sozinhos têm eficácia limitada, mas a combinação com quimioterapia pode ser uma estratégia promissora para estudos futuros.

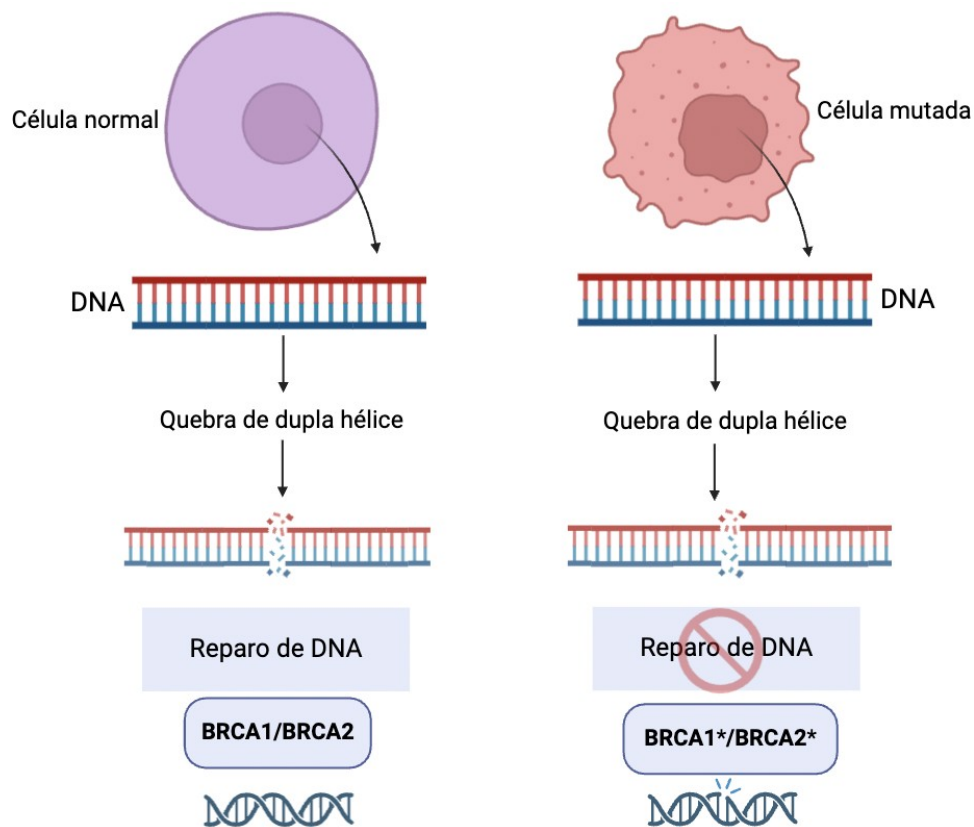
Em resumo, o tratamento do câncer de ovário é complexo e personalizado, variando de acordo com o estágio da doença, as características individuais da paciente e outras considerações clínicas.

1.5 *BRCA1/BRCA2* e via de sinalização de reparo por recombinação homóloga

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são genes supressores de tumor que desempenham um papel crucial no reparo do DNA e na manutenção da integridade genômica. Quando funcionam corretamente, esses genes ajudam a prevenir o desenvolvimento de câncer, impedindo o crescimento descontrolado das células. No entanto, mutações ou alterações nestes genes podem aumentar significativamente o risco de uma pessoa desenvolver câncer, incluindo câncer de ovário seroso de alto grau (ROY et al. 2011).

As mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* estão particularmente associadas a um risco aumentado de câncer de ovário hereditário, além de câncer de mama. Portadores de mutações nesses genes têm um risco significativamente maior de desenvolver câncer de ovário em comparação com a população em geral. Essas mutações hereditárias são transmitidas de pai para filho e podem ser passadas de geração em geração em padrões familiares específicos (FARMER et al. 2005; LOBODA et al. 2023).

Em termos de via de sinalização, os genes *BRCA1* e *BRCA2* estão envolvidos em várias vias importantes relacionadas à reparo do DNA, incluindo a via de reparo por recombinação homóloga. Essa via desempenha um papel fundamental na correção de danos no DNA, especialmente danos de dupla hélice, que podem ocorrer devido a várias fontes, como radiação ou agentes químicos carcinogênicos. Esta via é particularmente importante durante a fase S do ciclo celular, quando as cromátides irmãs estão disponíveis como molde para o reparo do DNA que está sendo replicado (GUDMUNDSDOTTIR et al. 2006) (**Figura 4**).



Fonte: Autora, 2024. Biorender.

Figura 4. Ilustração do reparo de recombinação homóloga. A imagem mostra a diferença entre uma célula normal e uma célula mutada em relação ao reparo de quebras de dupla hélice (DSBs, do inglês Double-Strand Breaks) no DNA. Célula Normal (à esquerda): Reparo de DNA eficiente: Células normais utilizam os genes *BRCA1* e *BRCA2* para reparar DSBs através da recombinação homóloga, mantendo a integridade genômica. Célula Mutada (à direita): Reparo de DNA comprometido: Em células com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (*BRCA1**/*BRCA2**), o reparo de DSBs é ineficaz, resultando em falha na recombinação homóloga e aumento do risco de instabilidade genômica e câncer.

Se ocorrerem danos extensos no DNA ou se a recombinação homóloga for impedida por algum motivo, as células podem recorrer a outras vias de reparo, como a via de reparo por junção de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *Non-Homologous End Joining*) ou a via de reparo por excisão de bases (BER, do inglês *Base Excision Repair*) (LORD et al. 2012; KUBELAC, 2018). A via de reparo por recombinação homóloga ocorre quando há um dano no DNA por meio de uma quebra de dupla hélice no DNA, seja por danos externos ou durante a replicação, as proteínas sensoras de danos, como a proteína ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) e a proteína ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related*), detectam o dano e sinalizam para a célula iniciar o processo de reparo. Primeiramente, a quebra de dupla hélice é processada por enzimas nucleases, como a Exonuclease 1 (Exo1) e a proteína MRN complex (Mre11-Rad50-Nbs1), que removem pequenos trechos de DNA em torno do local danificado, expondo as regiões de DNA homólogas em cromátides irmãs ou em cromossomos homólogos (CHOI et al. 2016). Uma das extremidades de DNA ressecada invade a cromátide irmã ou o cromossomo homólogo, formando o chamado filamento invadente.

A recombinação homóloga ocorre quando o filamento “invasor” promove a troca de informações genéticas entre o DNA danificado e a cromátide irmã ou cromossomo homólogo. Isso resulta na restauração precisa da sequência de DNA original, corrigindo o dano. Por fim, o DNA reparado é então selado por outras proteínas envolvidas na síntese de DNA, resultando na restauração completa da dupla hélice original (JASIN et al. 2013).

Quando há uma mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, a capacidade das células de reparar danos no DNA fica comprometida, o que pode levar a uma acumulação de mutações genéticas e, eventualmente, ao desenvolvimento de câncer. Além disso, essas mutações também podem influenciar outras vias de sinalização celular, contribuindo para a progressão do câncer e a resistência a certos tratamentos. Além do papel central dos genes *BRCA1* ou *BRCA2* na via de reparo por recombinação homóloga (HR), existem mecanismos independentes dessa via que podem estar envolvidos na resposta ao tratamento com inibidores de PARP em cânceres associados a mutações nessas proteínas. Portanto, entender o papel dos genes *BRCA1* ou *BRCA2* no câncer de ovário seroso de alto grau é essencial para o diagnóstico, prognóstico e desenvolvimento de estratégias de tratamento direcionadas a pacientes com mutações nesses genes.

1.6 iPARP e genes ligados a recuperação da via de recombinação homóloga

Os inibidores de PARP (iPARP) representam uma classe inovadora de medicamentos que têm se mostrado promissores no tratamento de diversos tipos de câncer, especialmente aqueles associados a defeitos na via de reparo do DNA por reparo de recombinação homóloga (RRH). A poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) é uma enzima fundamental para a reparo de quebras de fita simples do DNA. Ao inibir a atividade dessa enzima, os iPARPs impedem a correção de danos celulares e, conseqüentemente, promovem a acumulação de quebras de fita dupla durante a replicação do DNA. Essa acumulação é particularmente letal para células cancerígenas que já possuem deficiências na via de recombinação homóloga, como aquelas com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (KEUNG et al. 2019).

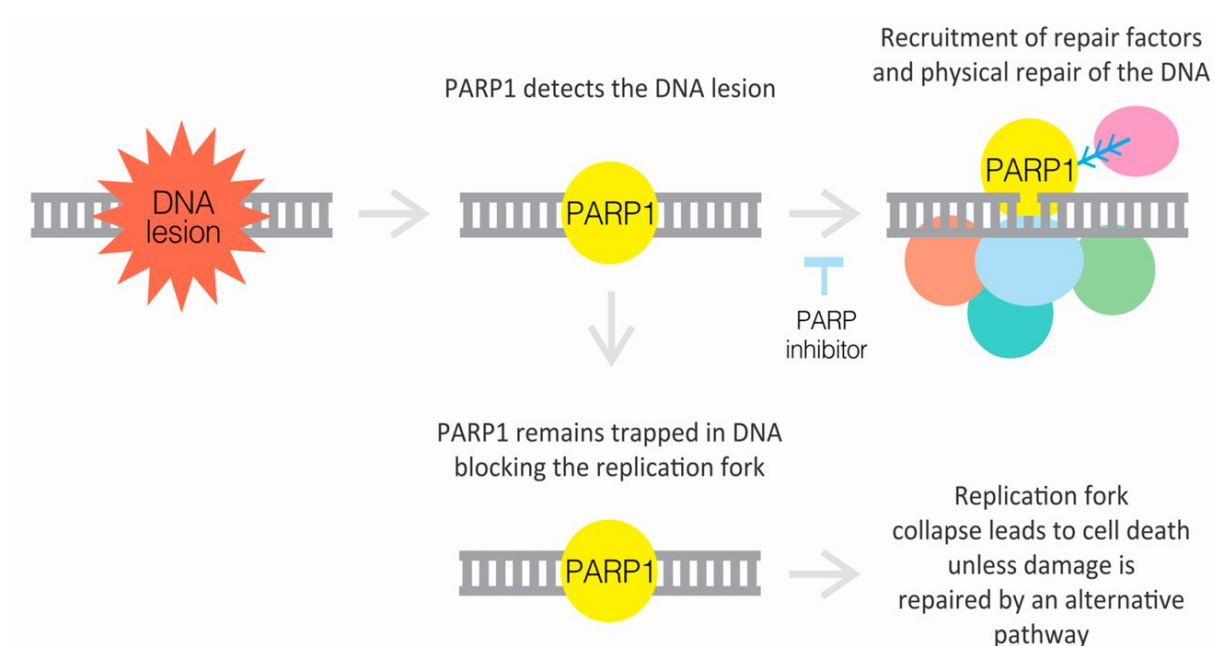


Figura 5: Inibidores de PARP (iPARP) reduzem a atividade catalítica das PARPs.

Além disso, os iPARP aprisionam as PARPs no local do dano ao DNA, impedindo que elas se descolem do DNA. Complexos citotóxicos de PARP-DNA impedem o avanço da forquilha de replicação e levam à morte celular, a menos que o dano seja reparado. Adaptado de Virtanen, Verner, Kreetta Paunu, Johanna K. Ahlskog, Reka Varnai, Csilla Sipeky, and Maria Sundvall. 2019. "PARP Inhibitors in Prostate Cancer—the Preclinical Rationale and Current Clinical Development" *Genes* 10, no. 8: 565. <https://doi.org/10.3390/genes10080565>.

Inibidores de PARP (iPARP) reduzem a atividade catalítica das enzimas PARP e

aprisionam PARP no local de dano ao DNA, impedindo sua dissociação do DNA. Os complexos citotóxicos PARP-DNA bloqueiam a progressão da forquilha de replicação, levando a um alto estresse de replicação que pode culminar em morte celular caso o dano não seja reparado (**Figura 5**). Todos os iPARP suprimem a atividade catalítica de PARP1 e PARP2, impedindo a ligação de NAD⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e inibindo a adição de polímeros de ADP-ribose aos alvos. A potência do aprisionamento de enzimas PARP varia entre os inibidores, com talazoparibe sendo o mais potente, seguido por niraparibe, olaparibe e rucaparibe, e finalmente veliparibe (VIRTANEN et al. 2019).

Os principais inibidores de PARP atualmente aprovados incluem olaparibe, rucaparibe, niraparibe e talazoparibe. O olaparibe, comercializado sob o nome de Lynparza, é indicado para o tratamento de cânceres de ovário, mama, próstata e pâncreas associados a mutações de *BRCA1* ou *BRCA2* (KAUFMAN et al. 2015; GOLAN et al. 2019; DiSILVESTRO et al. 2022). Além disso, novas combinações terapêuticas estão sendo estudadas para superar a resistência adquirida aos iPARP, potencializando a letalidade sintética ao atacar múltiplas vulnerabilidades moleculares no tumor.

Um outro aspecto intrigante na recuperação da via de recombinação homóloga é observado na perda de expressão de proteínas inibidoras de PARP, o que pode levar a uma restauração funcional da via de reparo independente de *BRCA* (CAREY et al. 2018). Neste contexto, o *SLFN11* (Schlafen 11) emerge como um componente crucial. O *SLFN11* é um gene que codifica uma proteína envolvida na resposta ao dano do DNA. Ele atua bloqueando a progressão do ciclo celular em resposta a tratamentos que causam dano ao DNA, como quimioterapia e radioterapia. A função específica do *SLFN11* ainda está sendo investigada, mas estudos sugerem que o *SLFN11* bloqueia a reativação da replicação, levando a um aumento do estresse de replicação. A perda de expressão de *SLFN11* pode contribuir para a resistência quimioterápica por levar a uma maior tolerância ao estresse de replicação causado por estas medicações (JO et al. 2021) (**Figura 6**).

Uma das descobertas mais significativas relacionadas ao *SLFN11* é sua associação com a resposta a certos tratamentos quimioterápicos, como os inibidores de PARP e os inibidores de topoisomerase. Pesquisas mostraram que níveis mais altos de expressão de *SLFN11* estão correlacionados com uma maior sensibilidade a esses tratamentos em certos tipos de câncer, enquanto níveis mais baixos podem estar associados a uma menor eficácia do tratamento e maior resistência às drogas

(MARKETA et al. 2022).

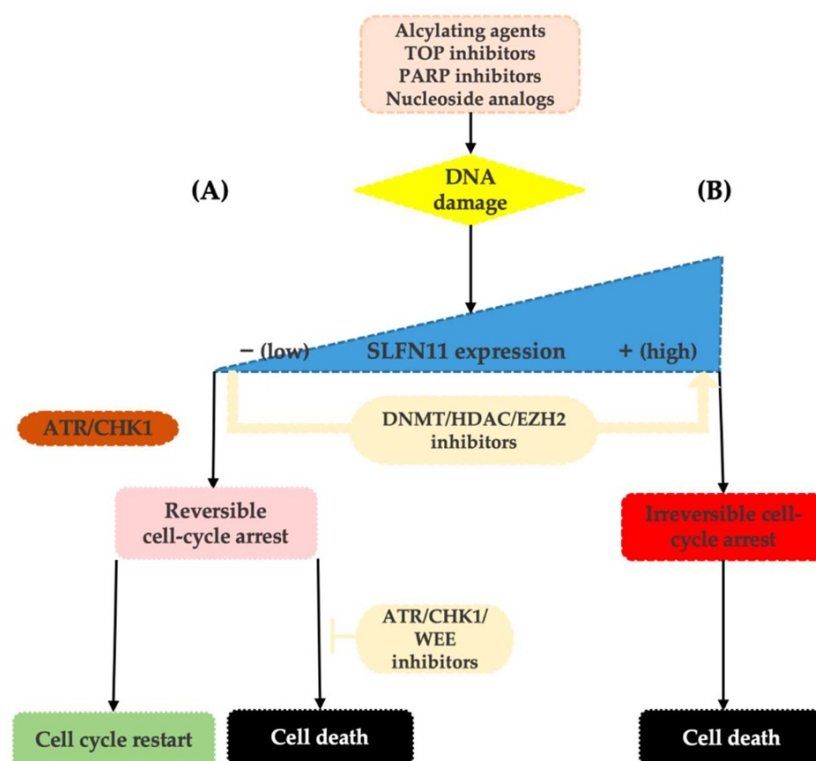


Figura 6: Via de expressão do gene *SLFN11*. Quando ocorre estresse replicativo causado por diferentes tipos de agentes que danificam o DNA (DDA), células com a proteína *SLFN11* ativa sofrem uma parada forçada na fase G1/S do ciclo celular, o que eventualmente leva à morte celular. Em contraste, células deficientes em *SLFN11*, que dependem da via *ATR/CHK1*, reentram no ciclo celular, progridem lentamente pela fase S e, após a reparo do DNA, podem sobreviver. A expressão de *SLFN11* pode ser reativada por inibidores de moduladores epigenéticos, como inibidores de DNA metiltransferase (DNMT), desacetilase de histonas (HDAC) ou *EZH2*. A resistência das células deficientes em *SLFN11* pode ser superada com a combinação de inibidores de *ATR/CHK1/WE1*.

Adaptado de Bednarikova, Marketa, Jitka Hausnerova, Lucie Ehrlichova, Kvetoslava Matulova, Eliska Gazarkova, Lubos Minar, and Vit Weinberger. 2022. "Can Schlafen 11 Help to Stratify Ovarian Cancer Patients Treated with DNA-Damaging Agents?" *Cancers* 14, no. 10: 2353. <https://doi.org/10.3390/cancers14102353>

Outros genes ligados à via da recombinação homóloga independentemente do *BRCA*, contribuem para a funcionalidade da via. O *REV7* também desempenha um

papel na via de reparo de recombinação homóloga e na resposta ao dano ao DNA. Ele está associado à resistência a inibidores de PARP (*Poly* (ADP-ribose) *polymerase*) em células cancerígenas. Podendo atuar como um regulador negativo da recombinação homóloga, promovendo a ligação dos fatores de recombinação ao local do dano. A presença de *REV7* pode ajudar as células a se adaptarem e sobreviverem a esses tratamentos, uma vez que ele está envolvido na junção de extremidades não homólogas (NHEJ), um caminho alternativo de reparo do DNA. Assim, quando *REV7* é expresso em níveis altos, ele pode permitir que as células cancerígenas contornem a toxicidade induzida pela inibição de PARP, contribuindo para a resistência ao tratamento (CLAIRMONT et al. 2021). (**Figura 7**).

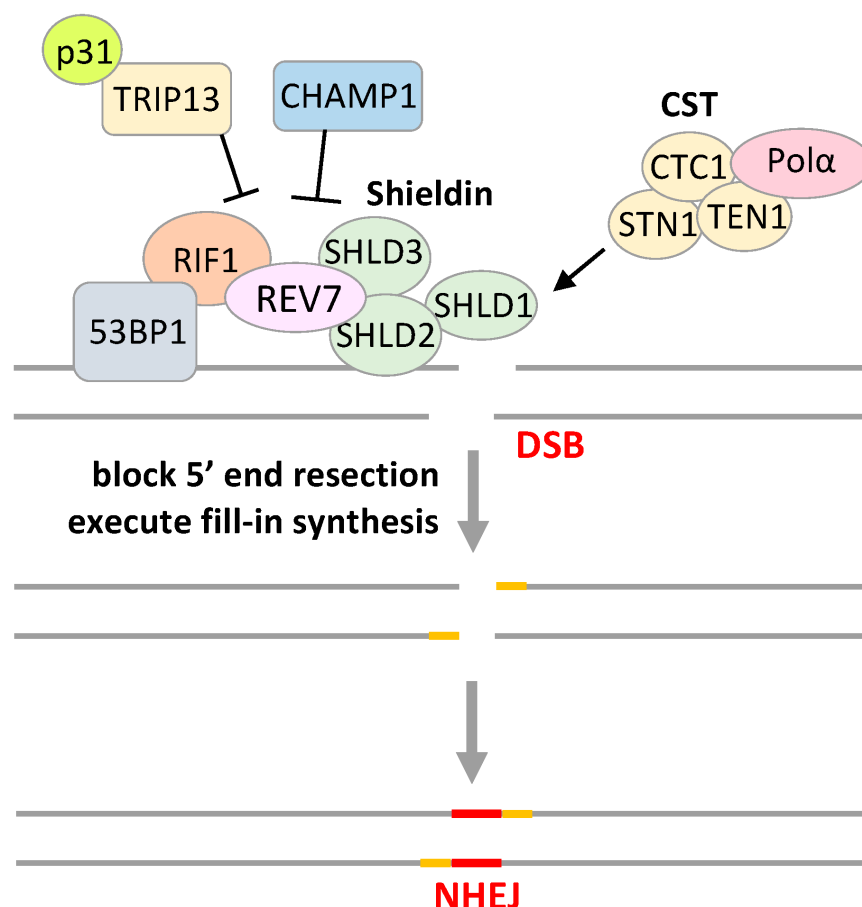


Figura 7. Envolvimento do *REV7* no reparo de quebra de fita dupla (DSB). O *REV7* desempenha um papel crucial no reparo de quebras de fita dupla (DSB) no DNA. Quando ocorre uma lesão DSB, a proteína 53BP1–RIF1 recruta o complexo Shieldin, que inclui o *REV7*, para impedir a ressecção das extremidades do DNA. O Shieldin também atrai o complexo CST e a DNA polimerase α para realizar a síntese

de preenchimento, favorecendo a junção de extremidades não homólogas (*NHEJ*) em vez da recombinação homóloga (*HR*).

Adaptado de Murakumo, Yoshiki, Yasutaka Sakurai, Takuya Kato, Hiroshi Hashimoto, and Masaaki Ichinoe. 2023. "REV7 in Cancer Biology and Management" *Cancers* 15, no. 6: 1721. <https://doi.org/10.3390/cancers15061721>

A proteína 53BP1 é uma proteína que se liga ao DNA danificado e atua como um mediador na resposta ao dano ao DNA. Ele desempenha um papel crucial no reparo de quebras de fita dupla através da via de reparo não-homólogo (*NHEJ*) e regula a escolha entre *NHEJ* e *HRR*. A presença de 53BP1 pode impedir a recombinação homóloga ao competir com os fatores de *HRR* pelo acesso ao DNA danificado. Em células deficientes em *BRCA1*, a função de 53BP1 é especialmente importante, e a inibição ou perda de 53BP1 pode restaurar parcialmente a capacidade de *HRR*, conferindo resistência a inibidores de PARP (MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI et al. 2019) (**Figura 8**).

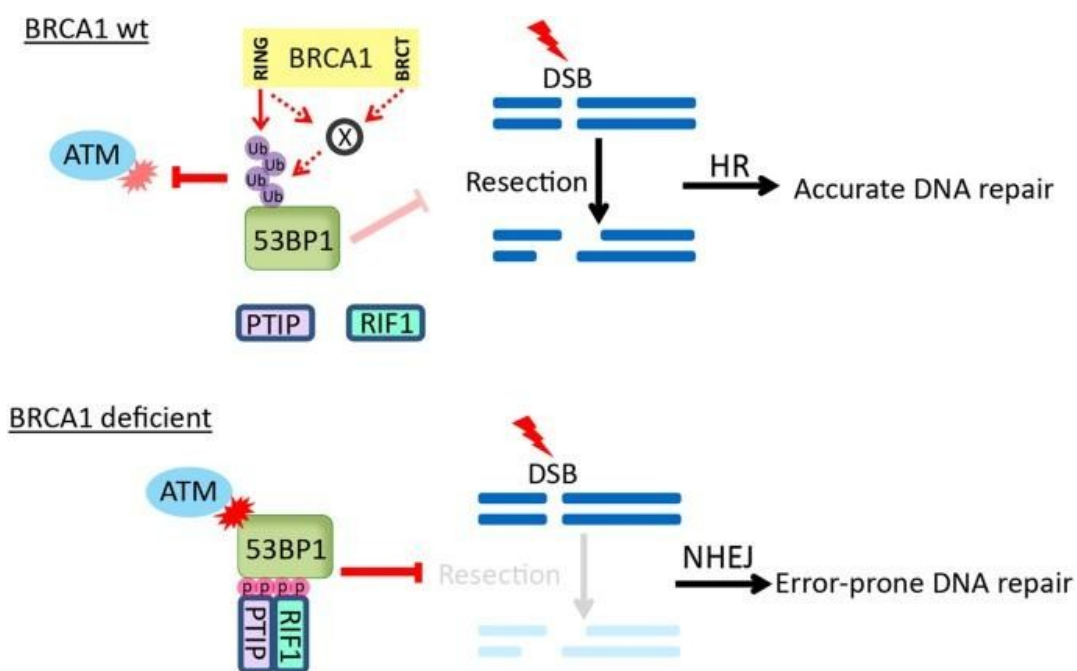


Figura 8: Papel inibitório do BRCA1 na regulação da sinalização 53BP1.

Adaptado de Feng, L., Li, N., Li, Y. et al. Inibição dependente do ciclo celular da sinalização 53BP1 por BRCA1. Cell Discov 1, 15019 (2015). <https://doi.org/10.1038/celldisc.2015.19>

Outro gene que pode estar envolvido na recuperação homóloga independente é *CTC1* que faz parte do complexo CST (*CTC1*-*STN1*-*TEN1*), atuante na manutenção dos telômeros e na replicação do DNA. Este complexo ajuda a prevenir o encurtamento excessivo dos telômeros e estabiliza as extremidades dos cromossomos que protegem o DNA de deterioração e fusão (ACKERSON et al. 2020). Deficiências em *CTC1* podem levar a problemas na replicação dos telômeros e instabilidade genômica, contribuindo para o envelhecimento celular e predisposição ao câncer. Além disso, o *CTC1* também está envolvido na resposta ao estresse replicativo, ajudando a garantir a replicação precisa e a integridade do DNA. Isso é importante porque células com defeitos na resposta ao estresse replicativo podem ser mais vulneráveis a danos adicionais, o que pode influenciar a resposta a tratamentos que induzem estresse replicativo, como os inibidores de PARP (BARAZAS et al. 2018) (Figura 9).

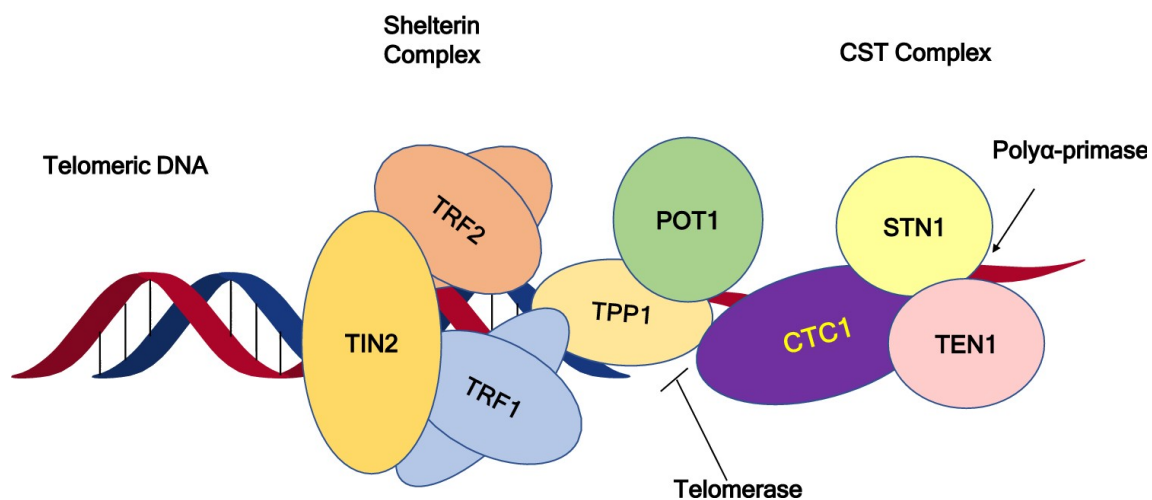


Figura 9: Diagrama esquemático dos complexos Shelterin e CST (*CTC1*-*STN1*-*TEN1*) ligados ao DNA telomérico. O complexo Shelterin, composto por seis subunidades (*TRF1*, *TRF2*, *TIN2*, *TPP1*, *POT1* e *RAP1*), se liga ao DNA telomérico de fita dupla e simples. O complexo CST (*CTC1*, *STN1* e *TEN1*) auxilia na manutenção e replicação dos telômeros."

Adaptador de Choudhury, A., Mohammad, T., Samarth, N. *et al.* Structural genomics approach to investigate deleterious impact of nsSNPs in conserved telomere maintenance component 1. *SciRep* 11, 10202 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89450-7>

Se as células possuem deficiências na função de *CTC1*, elas podem ter uma capacidade reduzida de lidar com o estresse replicativo, exacerbando os efeitos dos inibidores de PARP e potencialmente levando a uma maior acumulação de danos no DNA e morte celular. A presença de deficiências em *CTC1* pode potencialmente impactar a eficácia dos iPARPs, uma vez que a falta de manutenção adequada dos telômeros e a instabilidade genômica podem afetar a forma como as células respondem ao bloqueio do reparo do DNA promovido pelos inibidores de PARP (BARAZAS et al. 2018).

A perda ou ganho de expressão das proteínas *SLFN11*, *REV7*, *53BP1* e *CTC1* pode ter importantes implicações no contexto do tratamento com inibidores de PARP (iPARP) em células cancerígenas. Essas descobertas podem sugerir que essas proteínas possam ser um biomarcador útil para prever a resposta ao tratamento e para ajudar os médicos a personalizar a terapia contra o câncer para cada paciente.

1.7 Biópsia Tradicional

A biópsia tradicional é um procedimento central no diagnóstico e manejo do câncer, desempenhando um papel crucial na confirmação da presença de neoplasias malignas e na caracterização histológica dos tumores. Esse método permite a coleta direta de amostras teciduais, possibilitando a análise detalhada da morfologia celular, grau de diferenciação, e a presença de marcadores específicos, que são fundamentais para a definição do tipo de câncer e para o planejamento terapêutico, mas tem limitações (DE RUBIS et al. 2019).

Além dos riscos para a paciente envolvidos no procedimento da biópsia, uma das principais limitações é a possibilidade de erros de amostragem, onde a amostra coletada pode não ser representativa do tumor como um todo, especialmente em neoplasias heterogêneas. Outro ponto a ser considerado é a limitação da biópsia tradicional em fornecer informações dinâmicas sobre o tumor ao longo do tempo. Enquanto a biópsia permite uma análise momentânea do tecido, ela não capta a evolução clonal do tumor ou a resposta ao tratamento, necessitando de coletas e análises repetidas, o que aumenta o risco para o paciente (MARTINS et al 2021).

Com o avanço da medicina, técnicas menos invasivas e mais abrangentes, como a biópsia líquida, estão ganhando destaque como complementos ou alternativas à biópsia tradicional. Estas novas abordagens oferecem a possibilidade de monitoramento contínuo e menos invasivo do câncer, capturando a heterogeneidade tumoral e a evolução do quadro clínico ao longo do tempo, mas ainda enfrentam desafios em termos de sensibilidade e especificidade comparáveis às da biópsia tecidual.

1.8 Biópsia Líquida

A biópsia líquida é um conceito emergente e inovador que tem ganhado destaque na oncologia por sua capacidade de detectar e monitorar neoplasias malignas de forma menos invasiva em comparação com a biópsia tradicional. Ao invés de coletar tecido sólido, a biópsia líquida analisa componentes tumorais presentes em fluidos corporais, como sangue, urina ou saliva, incluindo DNA tumoral circulante (ctDNA), células tumorais circulantes (CTCs), e outras moléculas associadas ao câncer (HEIDRICH et al. 2020).

O conceito de biópsia líquida, introduzido pioneiramente por Pantel e Alix-Panabières, revolucionou o diagnóstico do câncer ao possibilitar a análise não invasiva de células tumorais circulantes e DNA livre de células. Com os avanços tecnológicos, a sensibilidade e a especificidade desses ensaios foram significativamente aprimoradas, tornando-se ferramentas indispensáveis para detectar doença residual mínima, monitorar a progressão da doença e guiar decisões terapêuticas. As biópsias líquidas oferecem vantagens substanciais em relação às biópsias de tecido tradicionais, permitindo uma compreensão mais abrangente da biologia do tumor e da doença metastática (ALIX-PANABIÈRES et al., 2019).

A biópsia líquida oferece várias vantagens sobre a biópsia tradicional, principalmente devido à sua natureza minimamente invasiva. Esta técnica permite a detecção precoce de recidivas tumorais, o monitoramento da resposta ao tratamento em tempo real, e a identificação de mutações emergentes que podem indicar resistência ao tratamento. Além disso, a biópsia líquida tem o potencial de capturar a heterogeneidade tumoral, fornecendo uma visão mais completa do câncer do que uma amostra única de tecido (ALIX-PANABIÈRES et al. 2016).

Como destacado por Diaz e Bardelli (2014), “a biópsia líquida tem o potencial de revolucionar o manejo do câncer ao permitir a personalização do tratamento com base

nas mudanças moleculares que ocorrem durante o curso da doença”. Essa capacidade de monitorar continuamente a evolução do câncer é um avanço significativo em direção à medicina personalizada.

Existem vários tipos de biópsia líquida, cada um focado em diferentes biomarcadores presentes nos fluidos corporais: DNA Tumoral Circulante (ctDNA): Fragmentos de DNA derivados de células tumorais que circulam no sangue. A análise do ctDNA permite a detecção de mutações específicas, carga tumoral, e a resposta ao tratamento. Células Tumorais Circulantes (CTCs): Células inteiras que se desprendem do tumor primário ou metastático e entram na circulação sanguínea. A análise das CTCs pode fornecer informações sobre a agressividade do tumor e a probabilidade de metástase. Exossomos e Microvesículas: Vesículas extracelulares que transportam DNA, RNA e proteínas tumorais. A análise dessas partículas pode revelar informações sobre o microambiente tumoral e mecanismos de resistência. RNA Circulante: Inclui RNAs não codificantes e microRNAs que podem estar envolvidos na regulação gênica e na progressão do tumor.

Apesar de suas vantagens, a biópsia líquida ainda enfrenta desafios e limitações. Uma das principais limitações é a sensibilidade e a especificidade dos métodos de detecção, especialmente em estágios iniciais da doença, quando a quantidade de biomarcadores tumorais no sangue pode ser muito baixa.

A biópsia líquida representa um avanço significativo no campo da oncologia, oferecendo uma alternativa menos invasiva e potencialmente mais informativa à biópsia tradicional. No entanto, seu pleno potencial ainda depende da superação de desafios técnicos e da validação em estudos clínicos de larga escala. À medida que a tecnologia continua a evoluir, espera-se que a biópsia líquida se torne uma ferramenta indispensável na personalização do tratamento do câncer (ALIX-PANABIÈRES et al. 2021).

1.9 Células tumorais circulantes

As células tumorais circulantes (CTCs) são células cancerosas que se desprendem de um tumor primário e entram na corrente sanguínea. Elas são importantes porque podem se espalhar para outras partes do corpo, levando à formação de metástases, que são responsáveis pela maioria das mortes relacionadas ao câncer. As CTCs têm sido objeto de estudo e pesquisa há décadas, desempenhando um papel crucial na compreensão da disseminação do câncer e no

desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e tratamento. A história do estudo das CTCs começou no século XIX, mas ganhou relevância nas últimas décadas com o avanço das técnicas de detecção e análise (PANTEL et al. 2016).

As CTCs foram descritas pela primeira vez em 1869 (Século XIX) por Thomas Ashworth, um patologista australiano que, enquanto examinava o sangue de um paciente com câncer, observou células que eram morfológicamente semelhantes às células do tumor primário do paciente. Ashworth publicou suas observações em um artigo intitulado "*A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood After Death*" no "*Australian Medical Journal*" (**Figura 10**). Ele descreveu a presença dessas células no sangue do paciente e fez uma conexão importante: sugeriu que essas células poderiam ser responsáveis pela disseminação do câncer para outras partes do corpo, o que é hoje conhecido como metástase (ASHWORTH, 1869).

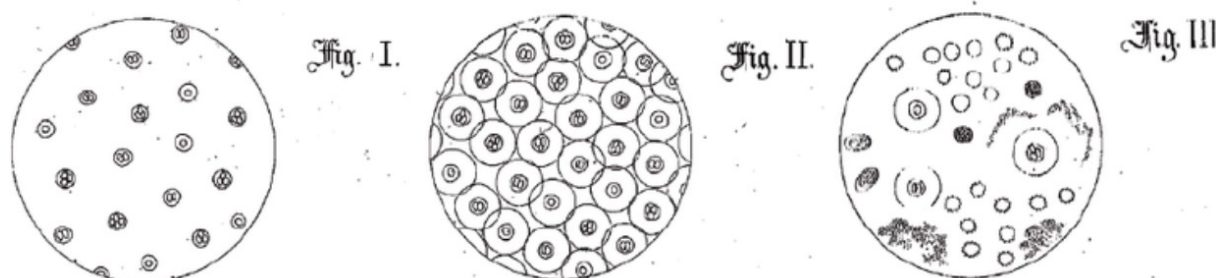


Figura 10: Ilustrações históricas de células tumorais circulantes observadas por Thomas Ashworth em 1869. Fig. I: no sangue de um indivíduo saudável. Fig. II: nas células tumorais do paciente Fig. III: e no sangue do paciente. Na última figura, Ashworth destacou a presença de células normais ao lado de células que se assemelham às do tumor, sugerindo a coexistência dessas populações no sangue. Adaptado de Ashworth TR (1869) A case of Cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. Australas Med J 14:146–149

A introdução de tecnologias de microfluídica e imunomagnetismo permitiu a detecção e captura de CTCs com maior precisão. Essas técnicas foram inovadoras, pois permitiram o isolamento e a caracterização de CTCs de uma maneira que não era possível anteriormente. As CTCs têm se tornado ferramentas essenciais na pesquisa clínica, sendo utilizadas para monitorar a resposta ao tratamento e prever o prognóstico em diversos tipos de câncer, como mama, próstata e pulmão (YAN et al.

2017; MIYAMOTO et al. 2014; WANKHEDE et al. 2022). Estudos avançados de sequenciamento de CTCs estão proporcionando uma compreensão mais profunda da heterogeneidade tumoral e da evolução do câncer ao longo do tempo (KIM et al. 2019).

Reconhecidas como biomarcadores valiosos, as CTCs desempenham um papel crucial na detecção precoce de metástases, no acompanhamento da progressão da doença e na personalização do tratamento. Pesquisas contínuas estão focadas em explorar o potencial das CTCs para prever a resistência aos tratamentos e identificar novas terapias-alvo, abrindo caminhos para abordagens mais precisas e eficazes na luta contra o câncer.

1.10 Mecanismos de disseminação das CTCs

Os mecanismos de disseminação das CTCs são complexos e envolvem múltiplos processos biológicos que permitem às células tumorais deixarem o tumor primário, entrarem na corrente sanguínea e, eventualmente, formar metástases em órgãos distantes (**Figura 11**).

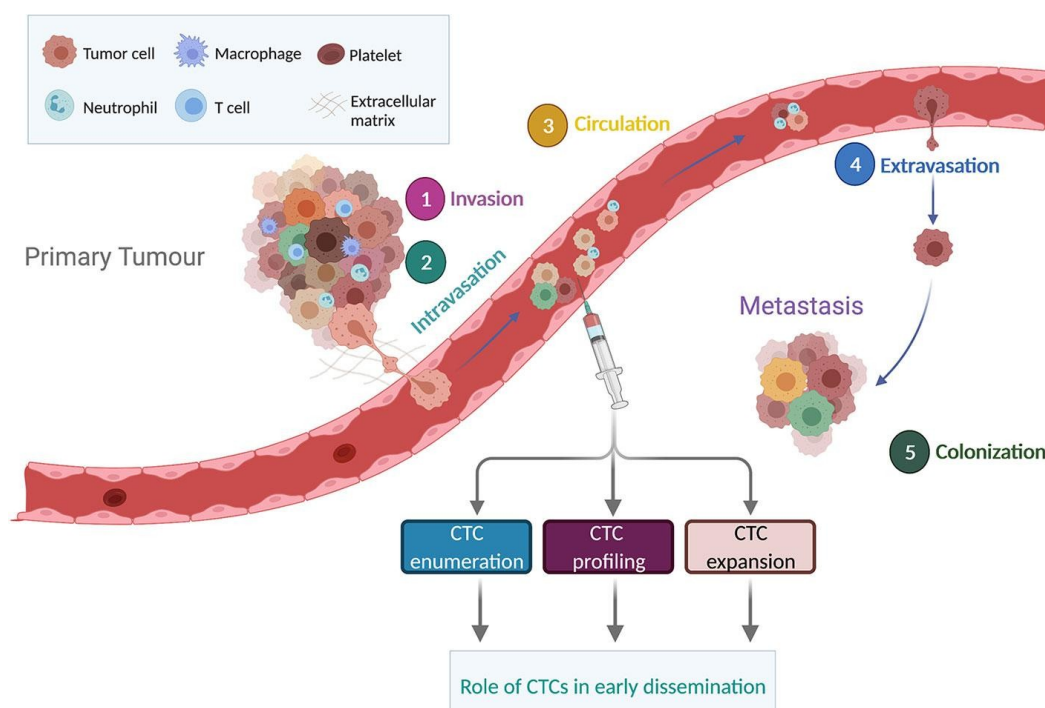


Figura 11: Visão geral da cascata metastática. O processo metastático inclui invasão, intravasação, circulação, extravasação e colonização. As CTCs, ao se desprenderem do tumor primário, podem viajar isoladamente ou em grupos. A enumeração, o perfil molecular e a expansão das CTCs em tumores não metastáticos

podem proporcionar uma melhor compreensão sobre a importância da disseminação precoce das CTCs.

Adaptado de MINI REVIEW publicado em *Frontiers in Oncology*, 06 de maio de 2021, na seção *Molecular and Cellular Oncology*, Volume 11, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.672195>.

Para tumores epiteliais, propõe-se que um passo inicial da cascata metastática ocorra por meio de um programa de desdiferenciação conhecido como transição epitélio-mesênquima (EMT) (YEUNG et al. 2016). Durante a EMT, as células tumorais reduzem a expressão de marcadores epiteliais, como E-caderina, se desprendem das células vizinhas e adquirem um fenótipo mesenquimal mais invasivo (LOH et al. 2019; HOU et al. 2011; GENNA et al. 2020). O processo EMT pode ser estimulado por diversos fatores, incluindo um estroma tumoral ativado ou condições de hipóxia. Além disso, as células tumorais invasivas aumentam a atividade de metaloproteinases, levando à degradação da matriz extracelular e permitindo a migração das células tumorais até alcançar a vasculatura (HAPKE et al. 2020). O estudo de Chebouti et al. examinou a prevalência de CTCs com características de EMT em pacientes com câncer de ovário e sua resposta à quimioterapia à base de platina. Eles descobriram que CTCs do tipo EMT são mais frequentes e aumentam após a quimioterapia, especialmente uma subpopulação PI3K α ⁺/Twist⁺, que está associada à diminuição da sobrevida geral e à resistência ao tratamento. O estudo sugeriu que essas CTCs podem servir como biomarcadores para identificar pacientes de alto risco e orientar estratégias terapêuticas (CHEBOUTI et al. 2017). Células tumorais agressivas também podem transitar para um fenótipo vascular, expressando marcadores endoteliais e formando vasos sanguíneos, em um fenômeno conhecido como mimetismo vasculogênico (MV) (KIRSCHMANN et al. 2012). O MV foi descrito em cânceres de ovário, pulmão, cabeça e pescoço e está associado à disseminação, metástase, e pior prognóstico (WILLIAMSON et al. 2016; HUJANEN et al. 2019; DOMÍNGUEZ et al. 2019). O estudo de Williamson et al. analisou a presença de CTCs e a mimetização vascular (VM) em pacientes com câncer de pulmão de pequenas células (CPNPC). A análise genética foi realizada em amostras de sangue e tumores, destacando a expressão de VE-caderina em CTCs, os resultados indicaram que a MV está associada a um pior prognóstico e resistência ao tratamento, 37 de 38 pacientes apresentaram subpopulações raras de CTCs co-expressando VE-caderina e citoqueratinas, indicando MV (WILLIAMSON et al. 2016).

Além desses mecanismos, as CTCs podem se deslocar por meio do sistema vascular tanto como células isoladas quanto em agregados celulares, conhecidos como *clusters* de CTCs ou microêmbolos tumorais circulantes (MTCs) (AMINTAS et al. 2020). Embora sejam detectados com menor frequência e tenham uma meia-vida significativamente mais curta no sangue do que as CTCs isoladas, os *clusters* de CTCs têm maior probabilidade de formar metástases. Os MTCs demonstraram uma capacidade metastática significativamente maior do que CTCs, sendo 23 a 50 vezes mais eficientes em formar metástases. Em um estudo com pacientes com câncer de mama, a presença de MTCs correlacionou com uma sobrevida média de 115,8 dias, comparada a 930,1 dias em pacientes com CTCs. A expressão de placoglobina foi associada à sobrevivência livre de metástases. MTCs foram responsáveis por aproximadamente 50% das lesões metastáticas em um modelo de câncer de mama (ACETO et al. 2014).

Há diversos mecanismos pelos quais as CTCs e os MTCs se movem pelo sistema vascular e contribuem para a metástase. Desde a TEM até a cooperação entre diferentes tipos celulares e a formação de clusters homotípicos e heterotípicos, demonstram a complexidade e a diversidade das estratégias utilizadas pelas CTCs para invadir novos tecidos. Esses mecanismos evidenciam a importância das CTCs e MTCs na disseminação do câncer, mostrando que tanto células isoladas quanto agregados celulares desempenham papéis cruciais na progressão metastática (Figura 12).

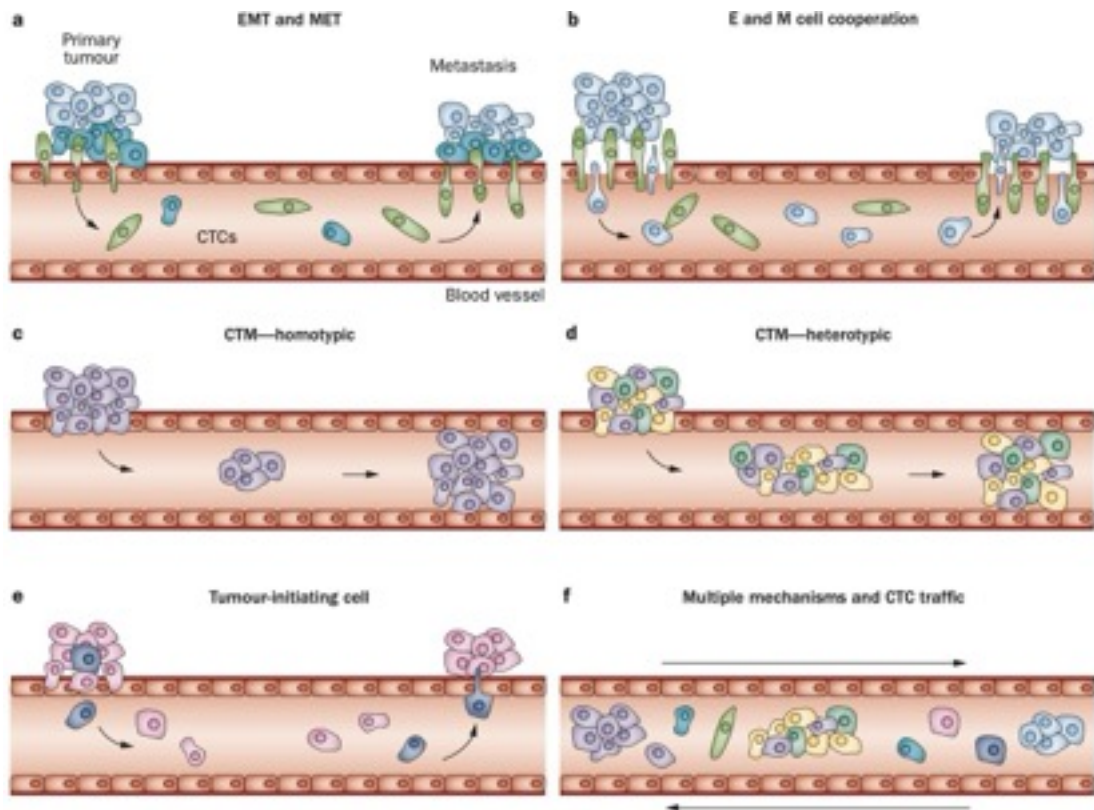


Figura 12: Mecanismos de Disseminação das Células Tumorais: Células tumorais epiteliais (azuis) podem sofrer TEM parcial ou completa (verde) e formar lesões metastáticas após TEM em locais distantes. Células mesenquimatosas (verdes) invadem a vasculatura e permitem que células epiteliais (azuis) passem como passageiros. Microêmbolos de células tumorais (roxas) são mais resistentes a *anoikis* e ataque imunológico do que células isoladas e têm maior potencial metastático quando acompanhados por células acessórias, como fibroblastos e células endoteliais. Todos esses mecanismos podem contribuir para a metástase.

Adaptado de Krebs, Matthew G., Robert L. Metcalf, Louise Carter, Ged Brady, Fiona H. Blackhall, e Caroline Dive. "Molecular Analysis of Circulating Tumour Cells—Biology and Biomarkers." *Nature Reviews Clinical Oncology* 11, no. 2 (2014): 129–144. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.270>.

1.11 Interações entre células imunes e CTCs

As interações entre células imunes e células tumorais circulantes (CTCs) desempenham um papel crucial na progressão e disseminação do câncer. No sangue periférico, as CTCs encontram uma variedade de subpopulações de células imunológicas, como linfócitos T, células naturais killer (NK) e monócitos, que têm o potencial de reconhecer e eliminar essas células tumorais. No entanto, CTCs podem reduzir a atividade das células NK por meio da desregulação de MHC e secreção de HLA-G, que bloqueia os receptores ativadores das células NK (DIANAT-MOGHADAM et al. 2020).

Além disso, as CTCs podem associar-se a plaquetas, formando um revestimento protetor que impede seu reconhecimento pelo sistema imunológico. Essas interações entre plaquetas e CTCs podem aumentar a sobrevivência e a capacidade de metástase das CTCs em pacientes com câncer. Um estudo conduzido por Huang et al. demonstrou que a presença de plaquetas pode influenciar a expressão de marcadores como ATOH8 (*Atonal BHLH Transcription Factor 8*), que está associado à resistência à morte celular e à promoção da sobrevivência das CTCs. A presença de plaquetas pode aumentar a formação de microêmbolos, observados em até 30% dos casos de câncer metastático. Além disso, a superexpressão de ATOH8 em CTCs resulta em uma redução de 10-20% na taxa de morte celular (HUANG et al. 2020).

Os neutrófilos são um dos primeiros tipos de células imunes que as CTCs disseminadas encontram após entrarem na circulação sanguínea. Essas células fazem parte de um subconjunto de células mieloides polimorfonucleares maduras, que atuam como os primeiros respondentes em locais de inflamação e constituem uma das principais linhas de defesa do corpo contra patógenos e células "estranhas" (CARNEVALE et al. 2023).

O grupo Szczerba et al. conduziram um estudo isolando e caracterizando neutrófilos associados a CTCs e as células cancerosas correspondentes dentro de cada agrupamento CTC– neutrófilos, tanto de pacientes com câncer de mama quanto de modelos murinos. Usando sequenciamento de RNA de célula única, mostraram que, na maioria dos casos, as CTCs estavam associadas a neutrófilos. Ao comparar os perfis transcriptômicos das CTCs associadas a neutrófilos com as CTCs isoladas, detectaram vários genes diferencialmente expressos relacionados ao progresso do ciclo celular, levando a uma formação mais eficiente de metástases. Essa

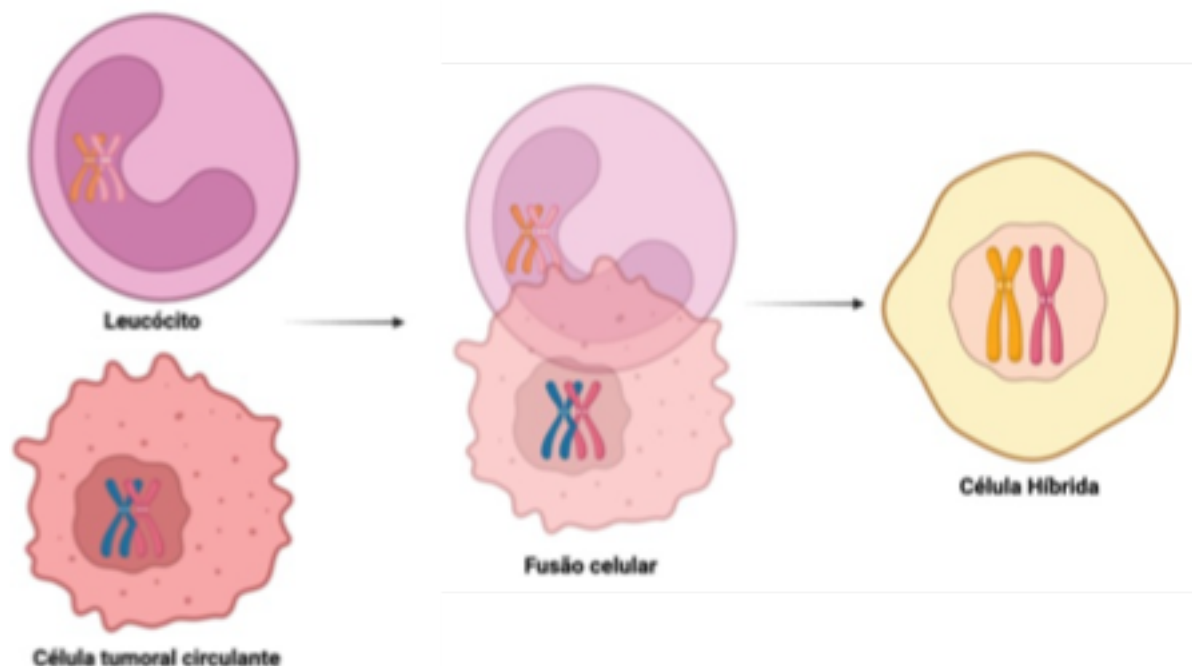
comunicação inflamatória entre CTCs e neutrófilos promove a proliferação das CTCs na circulação. Dessa forma, a associação entre CTCs e neutrófilos facilita a disseminação, sobrevivência e colonização das CTCs, aumentando sua capacidade metastática no sangue de pacientes (SZCZERBA et al. 2019).

No câncer de mama metastático, observou-se que a quantidade de CTCs está associada à relação neutrófilo-linfócito (NLR). Entre 516 mulheres com câncer de mama metastático, CTCs correlacionaram-se com monócitos ($p = 0,008$) e neutrófilos ($p = 0,038$). Em tumores triplo-negativos, a correlação com monócitos foi significativa ($p = 0,009$), e em HER2+, com neutrófilos ($p = 0,009$) e uma tendência com monócitos ($p = 0,061$). Na análise multivariada, monócitos foram associados a CTCs ≥ 5 (OR = 2,72, IC 95% 1,09–6,80, $p = 0,033$). CTCs e MLR foram preditores significativos de sobrevida geral, sugerindo que esses fatores inflamatórios podem ajudar a prever a progressão e a gravidade da doença (GIORGI et al. 2019).

Outro estudo conduzido por Torres, J. et al. revelou que CTCs e MTCs em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas podem expressar o marcador CD47 (*Cluster of Differentiation 47*), conhecido por inibir a fagocitose, atuando como um sinal de "não me coma" para os macrófagos. A expressão de CD47 em MTCs foi associada a uma pior sobrevida livre de progressão (SLP), indicando que a presença de CD47 pode contribuir para a evasão do sistema imunológico e a progressão da doença. Este é o primeiro estudo a investigar a expressão de CD47 especificamente em CTCs/MTCs de pacientes com NSCLC (TORRES et al. 2023).

Adicionalmente, há indícios de que a fusão celular desempenhe um papel crucial na interação entre as CTCs e o sistema imunológico. Fusão celular é o processo pelo qual duas ou mais células se unem para formar uma única célula, resultando na combinação dos conteúdos celulares, incluindo o citoplasma e os núcleos (Figura 13). Este processo é fundamental em vários contextos biológicos, como o desenvolvimento embrionário, a formação de fibras musculares, e a resposta imune, além de ser uma ferramenta valiosa em biotecnologia e pesquisa médica (HERNÁNDEZ et al 2017). Essa fusão é uma das hipóteses para explicar como células tumorais conseguem se disseminar para outras partes do corpo (metástase). Esse fenômeno de fusão celular pode levar à formação de células híbridas, que exibem propriedades imunomoduladoras, permitindo-lhes suprimir a resposta imune e, assim, favorecer a sobrevivência das CTCs na circulação. Essa capacidade de modulação imunológica e de evasão, tanto através de interações com o endotélio quanto por meio da fusão celular, sublinha a complexidade do comportamento das

CTCs no contexto da progressão tumoral e da metastatização (PAWELEK, et al 2008; BASTIDA-RUIZ et al 2016).



Fonte: Autora, 2024. Biorender.

Figura 13: Desenho Ilustrativo do processo da fusão celular. O desenho ilustra o processo de fusão celular, mostrando as etapas principais da fusão entre duas células (setas indicam o processo de fusão). A imagem destaca a interação entre as membranas celulares e a formação de uma única célula resultante da fusão (célula híbrida).

Nesse contexto, o MC1R (receptor de melanocortina 1), é um tipo de receptor acoplado à proteína G que desempenha um papel na regulação da pigmentação da pele além de desempenhar um papel na progressão do melanoma por meio da ativação do MET, um proto-oncogene e regulador-chave da metástase em muitos tipos de câncer (MOSCOWITZ et al. 2019). A relação direta entre MC1-R e fusão celular ainda é um campo emergente de estudo. No entanto, um estudo analisou CTCs em pacientes com melanoma, encontrando níveis elevados de MIF e MLANA (marcadores de melanócitos) em um terço dos pacientes. Embora não tenha sido encontrada uma relação clara entre níveis de CTCs e estágio da doença, foi observado um aumento significativo de leucócitos nas frações enriquecidas com

CTCs. As CTCs capturadas apresentaram duas subpopulações, uma com marcadores de queratina e CD45 (marcador leucocitário comum), e outra apenas com queratina. Esses resultados sugerem que células melanocíticas imaturas podem circular em controles saudáveis, e CTCs elevadas estão associadas a melanomas mais avançados (CLAWSON et al. 2012). A ativação ou modulação do MC1-R pode alterar a expressão de proteínas e vias que regulam a adesão celular e a motilidade, fatores que também podem influenciar a capacidade das células de se fundirem.

Outra molécula que está relacionada com resposta imune antitumoral é o EPCAM (Antígeno Epitelial da Célula Adenocarcinoma- CD326) ou célula de adesão epitelial, uma proteína de adesão celular que está frequentemente superexpressa em células tumorais de vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama, cólon e ovário (Laura Keller et al. 2019). Ela é frequentemente usada como marcador para identificar e isolar CTCs em amostras de sangue, auxiliando no diagnóstico e monitoramento do câncer (WIT et al. 2015).

Já o antígeno CD45, refere-se ao *cluster* de diferenciação 45, uma proteína encontrada em células do sistema imunológico, como leucócitos (glóbulos brancos). Essa proteína desempenha um papel importante na regulação da ativação e diferenciação das células do sistema imunológico, além disso, é uma proteína encontrada em células do sistema imunológico (RHEINLÄNDER et al 2018). Essa proteína desempenha um papel importante na regulação da ativação e diferenciação das células imunes e é frequentemente usada como marcador para identificar células do sistema imunológico em amostras biológicas. Ainda no contexto do sistema imune e fusão celular, o SPARC, do inglês, *Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine* (Proteína Secretada, Ácida e Rica em Cisteína, em tradução livre) uma proteína extracelular que desempenha papéis importantes na regulação da matriz extracelular e no microambiente tumoral. Esta proteína é conhecida por sua influência na adesão celular, migração, proliferação e angiogênese, sendo expressa em uma variedade de tecidos durante o desenvolvimento embrionário e em condições patológicas, como o câncer (BREKKEN et al. 2001). No contexto do câncer, o SPARC tem sido estudado por seu papel na progressão tumoral e na resposta ao tratamento. Por um lado, evidências sugerem que o SPARC pode ter efeitos imunossupressores, influenciando negativamente a resposta imune antitumoral (CHANG et al. 2017).

Outra molécula que pode desempenhar um papel na resposta imune antitumoral é a *GNT-V*, ou Glucoamilase-N-transferase-V, é uma enzima envolvida na glicosilação de proteínas, um processo importante para a modificação pós-traducional

de proteínas. Embora seu papel específico na oncologia não seja tão bem compreendido, as enzimas envolvidas na glicosilação de proteínas têm sido implicadas em vários processos relacionados ao câncer, incluindo metástase e radioresistência (HANDERSON et al. 2007; HUANG et al. 2015). Pesquisas recentes têm explorado a possível interação entre a GNT-V e o sistema imunológico no câncer. Alguns estudos indicam que a *GNT-V* pode influenciar a expressão de proteínas de superfície celular envolvidas na sinalização imunológica (fusão celular), afetando assim a capacidade das células do sistema imunológico de reconhecer e destruir células tumorais. Além disso, evidências sugerem que a atividade da *GNT-V* pode ser alterada em certos tipos de câncer, o que pode ter implicações na resposta imunológica contra as células tumorais (CHAKRABORTY et al. 2006).

A poliploidia, por sua vez, refere-se à presença de mais de dois conjuntos de cromossomos em uma célula (poliploidia), e frequentemente resulta da fusão celular. Embora a poliploidia tenha funções normais, como na organogênese e na diferenciação de tecidos, ela também pode contribuir para a formação de aberrações genéticas e permitir que células tumorais híbridas adquiram vantagens seletivas. Essas células poliplóides podem mascarar marcadores tumorais e evitar a detecção pelo sistema imunológico, facilitando sua sobrevivência e infiltração em tecidos (MOEIN et al. 2020; ARCHETTI et al. 2022).

No câncer, a poliploidia pode ocorrer como uma forma de instabilidade genômica. Isso pode levar a uma duplicação do número de cromossomos, incluindo o cromossomo 8. Este cromossomo contém vários genes relevantes para a oncogênese, como o oncogene *MYC*, localizado na região 8q24. A amplificação do *MYC* ou de outros genes em *CEN8* pode promover a proliferação celular e a progressão do tumor (BAYKARA et al. 2015; WAN et al. 2018). Além disso, a fusão celular pode gerar células tumorais multinucleadas, que frequentemente apresentam alterações cromossômicas, como amplificações ou reorganizações. A presença de múltiplos núcleos e alterações cromossômicas pode tornar essas células mais agressivas e resistentes a terapias. Assim, a fusão celular e as subsequentes alterações genômicas, incluindo as observadas no *CEN8*, podem influenciar a progressão do tumor. Células com amplificações no *CEN8* podem ter uma vantagem seletiva, levando a um crescimento mais rápido e à metastização do câncer.

Investigar a relação entre fusão celular e alterações cromossômicas é fundamental para entender os mecanismos de instabilidade genômica e a biologia do câncer. Esse conhecimento pode levar a melhores estratégias de diagnóstico e tratamento,

especialmente para cânceres com alta instabilidade genômica.

1.12 Detecção de CTCs

As CTCs transitam junto com as células sanguíneas normais e, devido à sua raridade, exigem um método com elevada especificidade e sensibilidade para serem identificadas de modo a refletir com precisão a quantidade real de células na circulação do paciente. Portanto, a capacidade de detectar CTCs no sangue periférico do paciente depende do método de detecção utilizado, já que diferentes abordagens possivelmente identificam distintas subpopulações dessas células (**Figura 14**).

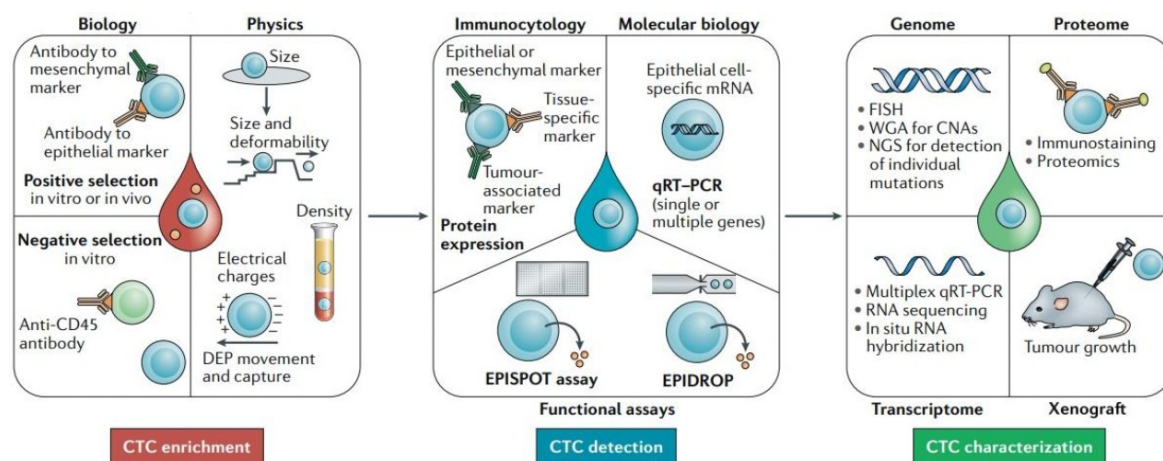


Figura 14: Tecnologias para enriquecimento, detecção e caracterização de CTCs e ctDNA. Células tumorais circulantes (CTCs) e DNA tumoral livre circulante (ctDNA) podem ser isolados simultaneamente da mesma amostra de sangue. A detecção quantitativa de ctDNA é baseada na identificação de várias alterações genéticas específicas do tumor ou marcas epigenéticas em amostras de DNA livre no plasma, principalmente por meio de sequenciamento de DNA. As CTCs no sangue podem ser enriquecidas usando técnicas dependentes de marcadores: as CTCs podem ser selecionadas positivamente in vitro ou in vivo usando anticorpos para proteínas epiteliais e/ou mesenquimatosas (como a molécula de adesão celular epitelial (EPCAM) e/ou citoqueratinas e vimentina mesenquimal ou N-caderina) ou selecionadas negativamente através da depleção de leucócitos usando anticorpos anti-CD45. O enriquecimento positivo de CTCs também pode ser realizado in vitro usando ensaios baseados em características das CTCs, incluindo tamanho, deformabilidade, densidade e carga elétrica. Após o enriquecimento, as CTCs isoladas podem ser identificadas usando ensaios imunocitoquímicos, moleculares ou funcionais. Com plataformas imunocitoquímicas, as CTCs são identificadas por coloração da membrana e/ou intracelular com anticorpos para marcadores epiteliais, mesenquimatosos, específicos de tecido ou associados ao tumor. Tecnologias moleculares permitem a identificação das CTCs usando ensaios baseados em RNA, como PCR quantitativo de transcrição reversa (qRT-PCR), sequenciamento de RNA ou hibridização in situ de RNA. Ensaios funcionais podem ser usados para detectar

CTCs viáveis com base em suas atividades biológicas, por exemplo, o ensaio Epithelial ImmunoSPOT (EPISPOT) para certas proteínas secretadas ou liberadas pelas CTCs e a tecnologia relacionada EPISPOT em uma gota (EPIDROP) que permite a detecção de CTCs únicas em microgotas. As características moleculares das CTCs podem ser exploradas ainda mais no nível de DNA, RNA e proteína, e as propriedades funcionais das CTCs podem ser investigadas *in vivo* ao injetar as células em camundongos imunodeficientes para formar modelos de xenotransplante derivados de pacientes. CNAs, alterações no número de cópias; DEP, dieletróforese; FISH, hibridização *in situ* por fluorescência; NGS, sequenciamento de próxima geração; WGA, análise do genoma inteiro.

Adaptado de: Pantel, K., & Alix-Panabières, C. (2019). Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(7), 407-418. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0187-3>

Geralmente, existem três abordagens principais para tecnologias de CTCs, que incluem (1) captura e enriquecimento, (2) detecção e identificação e (3) caracterização. A primeira abordagem de captura e enriquecimento envolve uma interação específica entre as CTCs e os materiais, por meio de interações físicas ou anticorpo-antígeno. A segunda abordagem de detecção, que se refere à identificação das CTCs, inclui diversos métodos, como microscopia de fluorescência, espectrofotometria fluorescente, citometria de fluxo, espalhamento Raman de superfície aprimorado ou medição de impedância elétrica. Na última abordagem, as CTCs liberadas são predominantemente utilizadas para análises subsequentes, como genômica, transcriptômica, proteômica e cultura de CTCs (SHEN et al. 2017).

O método de separação física para o enriquecimento de CTCs baseia-se nas diferenças entre as CTCs e as células sanguíneas em termos de tamanho, densidade, deformabilidade e propriedades elétricas. O sistema de Isolamento por Tamanho de Células Tumerais Epiteliais (ISET - *Isolation by SizE of Tumor Cells – Rarecells/France*) pode filtrar amostras de sangue através de uma membrana de policarbonato tipo *TRACK-ETCH* com diâmetro de 8 µm, e demonstra ser um eficaz e com alta sensibilidade (CHINEN et al. 2013). As CTCs também podem ser

classificadas usando o sistema Oncoquick (ROSENBERG et al. 2002) uma técnica dependente da densidade que permite a filtragem das células vermelhas do sangue e leucócitos, ou pelo *Apostream* (GUPTA et al. 2012) que utiliza técnicas de eletroforese dielétrica na câmara microfluídica para capturar as CTCs. Esses sistemas exigem grandes volumes de sangue que são suas principais limitações.

A tecnologia baseada em propriedades biológicas é outro método importante para a detecção de CTCs. Baseado na interação anticorpo-antígeno, as CTCs são geralmente enriquecidas positivamente utilizando marcadores epiteliais (EpCAM) e mesenquimais (vimentina), bem como enriquecidas negativamente por meio do uso de CD45 para eliminar leucócitos indesejados. As técnicas dependentes de EpCAM são as mais frequentemente utilizadas por pesquisadores. O sistema *CellSearch*, o único dispositivo aprovado pela FDA para uso clínico, utiliza esferas ferromagnéticas revestidas com anticorpos EpCAM para enriquecer CTCs CK+/CD45-/DAPI+ e remover leucócitos CK-/CD45+/DAPI+ (ALLARD et al. 2004). No entanto, devido à alta heterogeneidade dos antígenos de superfície das CTCs, as CTCs com baixa expressão de EpCAM podem não ser enriquecidas, resultando em dados imprecisos, enquanto métodos baseados em propriedades físicas não apresentam essa limitação (DENG et al. 2022). Considerando a expressão altamente variável de EpCAM durante diferentes estágios da TEM e a existência de células EpCAM-negativas, o sistema *Cellsearch* não seria adequado para investigar a heterogeneidade de CTC.

Vários métodos analíticos para isolamento de CTC foram desenvolvidos e validados para câncer de ovário que são baseados em várias propriedades biológicas (ou seja, marcadores epiteliais positivos, marcadores hematopoiéticos negativos) ou físicas (ou seja, tamanho, densidade, deformabilidade, cargas elétricas e capacidade invasiva) (**Tabela 4**).

Tabela 4. A tabela resume as técnicas validadas para a identificação e isolamento de CTCs.

Ano	Metodologia	Tipo Tumoral	Refs.
2024	Chipsets baseados em filtro de membrana de fenda cônica (Plataforma TSF)	Tumores anexiais, câncer ovariano	KIM et al. 2024
2023	CellCelector (ALS)	Câncer de ovário seroso de alto grau	ASANT E et al. 2023

2023	Uso de nanopartículas para captura imunomagnética de células de câncer de ovário; análise das propriedades físicas das nanopartículas e eficiência na captura e cultura.	Câncer de ovário	FEELY et al. 2023
2022	ISSET	Câncer ovariano seroso de alto grau	RUANO et al. 2022
2022	Uso de nanopartículas fluorescentes-magnéticas modificadas com ácido fólico para isolar e identificar CTCs.	Câncer de ovário	PAN et al. 2022
2020	<i>CellSearch</i>	Câncer de Ovário Seroso de Alto Grau Avançado	ABREU et al. 2020
2018	Isolamento de CTCs usando um sistema de captura baseado em folato e nanopartículas magnéticas	Câncer de Ovário	NIE et al. 2018
2017	Captura de CTCs usando um chip microfluídico e análise de células EpCAM+ e DAPI+	Câncer de Ovário Epitelial	LEE et al. 2017
2016	Enriquecimento DAPI e CK/EpCAM	Câncer de Ovário	BLASSL et al. 2016
2014	Enriquecimento e identificação de iCTCs usando uma matriz de adesão celular	Câncer de Ovário Epitelial	PEARL et al. 2014

Dada a raridade de CTCs na circulação periférica, apesar de seu potencial prognóstico, estudos adicionais são necessários para otimizar a detecção e o isolamento de CTCs no câncer de ovário.

2. Objetivos

2.1 Objetivos primários

Avaliar de maneira abrangente o papel das CTCs no prognóstico e progressão clínica de pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau.

2.2 Objetivos secundários

- Avaliar a presença de híbridos nas membranas de ISET em conjunto com as CTCs, e correlacionar sua detecção com o tempo de progressão da doença. Proteínas que foram examinadas: receptor de melanocortina 1 (MC1-R), β 1,6 N-acetilglucosaminiltransferase V (GnT-V), proteína rica em cisteína secretada e ácida (SPARC) e EPCAM.
- Investigar a ocorrência de poliploidia nas CTCs, um possível indicador de fusão celular;
- Avaliar a expressão de genes associados à resistência aos inibidores de PARP nas CTCs, como: SFLN11, REV7, 53BP1 e CTC1;
- Investigar se a relação neutrófilo/linfócito e a relação plaquetas/linfócitos podem ser consideradas como indicadores prognósticos para os pacientes em tratamento, constituindo mais um parâmetro facilmente acessível.

3. Materiais e métodos

Um estudo prospectivo longitudinal foi conduzido por meio da coleta de sangue total de pacientes com tumores de ovário metastático. Este projeto foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição (2623/18C). Para estabelecer um controle negativo, foi utilizado sangue de indivíduos saudáveis, enquanto o controle positivo consistiu no mesmo sangue adicionado de células tumorais de ovário mantidas em cultura. Foram coletadas amostras de 25 pacientes com câncer de ovário platino-sensível, que estavam sob tratamento com inibidor de PARP de manutenção. Todo o processo de identificação foi realizado por códigos, garantindo a confidencialidade dos pacientes.

O sangue foi coletado em três momentos distintos: antes do início do tratamento com inibidor de PARP (olaparibe) de manutenção no D0 ou baseline; após 30 dias do uso do inibidor de PARP (1º *follow-up*); e após 6 meses do início do tratamento com olaparibe (2º *follow-up*), totalizando assim, 75 amostras. Cada paciente contribuiu com aproximadamente 10 mL de sangue em cada visita, e participaram do estudo apenas os indivíduos que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.1 Critérios Gerais de Inclusão e Exclusão

3.1.1 Critérios Gerais de Inclusão para pacientes com câncer de ovário:

- Idade igual ou superior a 18 anos
- Diagnóstico de câncer peritoneal epitelial primário de ovário de alto grau, com recidiva sensível ao platino, com ou sem mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*;
- Tratamento prévio com quimioterapia baseada em platina e elegibilidade para uso de inibidor de PARP de manutenção (olaparibe).

3.1.2 Critérios Gerais de Exclusão para pacientes com câncer de ovário:

- Diagnóstico de câncer peritoneal epitelial de ovário, trompa de Falópio ou câncer peritoneal primário com histologias como seroso papilífero de baixo grau, carcinosarcoma ou mucinoso;
- Contraindicação ao uso de inibidores de PARP (olaparibe);
- História prévia de outras neoplasias, exceto tumores de pele;

- Recusa em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2 Detecção de células tumorais circulantes

Para a detecção de células tumorais circulantes, utilizamos o sistema ISET (*Isolation by size of tumor cells*), que é um sistema baseado na filtração do sangue para enriquecer as células raras em uma membrana de policarbonato com poros de 8 micrômetros. Foram coletados 10 mL de sangue periférico em EDTA tamponado, mantidos à temperatura ambiente e processados. Em seguida, o sangue foi diluído em uma proporção de 1:10 com tampão Rarecells e agitado durante 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, o sangue foi filtrado utilizando os blocos e o dispositivo de filtração ISET (**Figura 15**). Dos 10 mL de sangue analisados, 6 mL foram destinados à análise citopatológica e 4 mL à análise molecular, incluindo a submersão da membrana em RNA later e a subsequente extração de DNA e RNA.

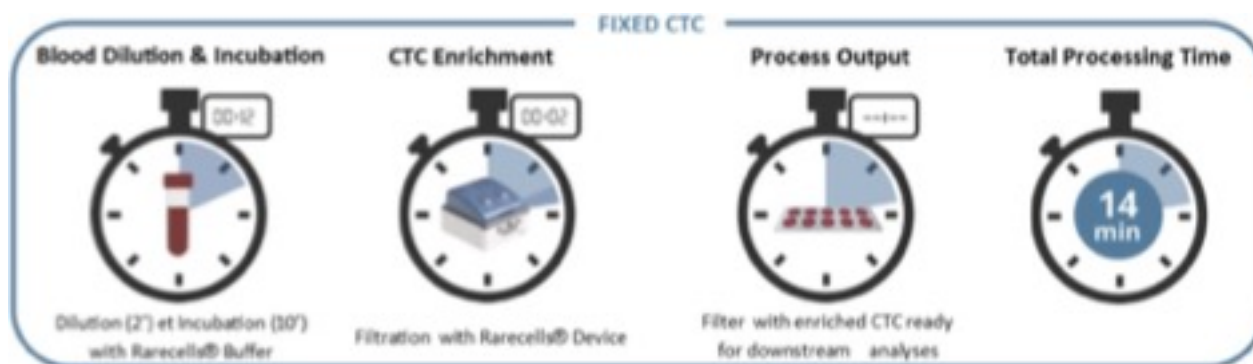


Figura 15. Procedimento para Detecção de Células Tumorais Circulantes com o Sistema ISET. Retirado de: "Technical Applications." Rarecells. Acesso em 10 de julho de 2024. <https://rarecells.com/technical-applications>.

Após a filtração e fixação das CTCs nas membranas, foram lavadas com PBS, secas à temperatura ambiente, protegidas da luz e estocadas a -20°C até o momento da análise.

3.3 Imunocitoquímica

Para a realização da imunocitoquímica e análise de expressão proteica, os *spots* das membranas foram seccionados e colocados em placas de 24 poços. Cada *spot* foi reidratado com *Tris Buffered Saline* (TBS) por um período de 20 minutos. As células foram permeabilizadas com TBS contendo 0.2% de Triton X-100 por 5 minutos à temperatura ambiente. Após uma nova lavagem com TBS, as membranas foram

incubadas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% no escuro e à temperatura ambiente por 15 minutos, seguida de nova lavagem com TBS. Posteriormente, o primeiro anticorpo primário foi aplicado nos pontos e incubado por uma hora. Para os controles negativos, foram utilizadas linhagens celulares que não expressam os anticorpos em questão, enquanto para os controles positivos, foram selecionadas linhagens de células tumorais que expressam os anticorpos desejados. A escolha das linhagens baseou-se no *The Human Protein Atlas*. (<https://www.proteinatlas.org/>) (**Tabela 5**). A revelação foi realizada com o sistema *Dual long system* HRP e o cromógeno Diaminobenzidina 3,3' (DAB). Após o uso do DAB, foi realizada uma incubação de uma hora com o segundo anticorpo primário, seguida por outra incubação de 20 minutos com o *Rabbit/Mouse* (LINK) (*Kit Envision™ G/2 System/AP*). Posteriormente, os pontos foram incubados por 30 minutos com *AP Enzyme (Enhancer)*. O segundo anticorpo foi revelado por *Permanent Red*. Finalmente, os *spots* foram corados com hematoxilina e lidos em um microscópio óptico *Research System Microscope BX61* - Olympus, equipado com uma câmera digital SC100 - Olympus, Tóquio, Japão. As CTCs e os MTCs foram caracterizados com base em critérios como tamanho nuclear igual ou superior a 16 µm, irregularidade do contorno nuclear, presença de citoplasma visível e alta proporção núcleo-citoplasma (> 0,8), conforme descrito por KREBS et al. Na ausência de qualquer um dos critérios, as células foram classificadas como atípicas. Os resultados foram expressos em número de CTCs por mL de sangue. As lâminas foram armazenadas em temperatura entre -2°C e -8°C após serem aderidas a uma lâmina com meio de montagem aquoso.

As CTCs e os MTCs - considerados quando três ou mais CTCs estão agrupadas - foram analisados conforme os seguintes critérios: diâmetro nuclear igual ou superior a 16µm, irregularidades no contorno nuclear, presença de citoplasma visível e alta relação núcleo-citoplasma (> 0,8), conforme definido por Krebs et al (2012). Caso algum desses critérios não estivesse presente, as células foram categorizadas como atípicas. Os resultados foram expressos como o número de CTCs por mililitro de sangue. As lâminas foram examinadas utilizando um microscópio óptico *Research System Microscope BX61* - Olympus, equipado com uma câmera digital SC100 - Olympus, localizada em Tóquio, Japão.

3.4 Padronização de Anticorpos na Imunocitoquímica (ICC)

A tabela descreve os anticorpos utilizados no estudo, juntamente com as

diluições padronizadas empregadas para a imunocitoquímica. Cada anticorpo é identificado com informações sobre sua especificidade e função, juntamente com a diluição utilizada para sua aplicação nos procedimentos de análise.

Tabela 5: Descrição e Diluições Padronizadas dos Anticorpos Utilizados

Anticorpo	Marca	Diluição	Controle positivo (linhagem)	Controle negativo (linhagem)
MC1-R	Abcam - ab236734	1:700	A549	SK-BR-3
EpCAM	Sigma - HPA026761	1:300	MCF7	U-87-MG
SPARC	Sigma - HPA002989	1:100	U-87-MG	MCF7
GNT-V	Sigma - HPA010919	1:100	MCF7	SK-MEL-28
CD45	Abcam - ab1055	1:300	Leucócitos	

Esta tabela apresenta uma descrição detalhada do motivo pelo qual cada anticorpo foi escolhido para a análise de expressão proteica. Cada anticorpo é acompanhado por informações sobre sua especificidade, função e relevância para o estudo em questão (**Tabela 6**). Essa análise permite uma compreensão mais profunda das escolhas metodológicas e da estratégia experimental adotada no estudo.

Tabela 6: Seleção dos Anticorpos para Análise de Expressão Proteica

Marcador	Nome Completo	Função Principal	Relação com Câncer	Justificativa
MC1-R	Receptor de Melanocortina 1	Regulação da pigmentação da pele e resposta inflamatória	Influencia a migração e invasão celular, processos críticos na fusão celular e progressão tumoral	Regula a pigmentação da pele e pode influenciar a plasticidade e invasão de células tumorais, ajudando a entender a progressão do câncer e metástases.
EPICAM	Antígeno Epitelial da Célula Adenocarcinoma	Adesão celular	Superexpressa em vários tipos de câncer (mama, cólon, ovário); usada para identificar CTCs	Marcador de células epiteliais, usado para detectar CTCs e refletir mudanças fenotípicas associadas à invasão tumoral.
CD45	Cluster de Diferenciação 45	Regulação da ativação e diferenciação das células imunes	Não diretamente associado à progressão do câncer, mas usado como marcador de células imunes	Marca células hematopoiéticas e é usado para distinguir leucócitos de CTCs, além de fornecer insights sobre a interação imune com

				células tumorais.
SPARC	Proteína Secretada, Ácida e Rica em Cisteína	Regulação da matriz extracelular e microambiente tumoral	Influencia adesão celular, migração, proliferação, angiogênese e resposta ao tratamento	Regula a matriz extracelular e a adesão celular, influenciando a invasão e metastatização das células tumorais.
GNT-V	Glucoamylase-N-transferase-V	Glicosilação de proteínas	Potencialmente envolvida em metástase e resistência a medicamentos	Enzima envolvida na glicosilação de proteínas, afetando adesão, migração e disseminação de células cancerígenas.

3.5 Extração de DNA e RNA de Células Tumorais Circulantes

A extração de DNA e RNA foi conduzida de acordo com as orientações do fabricante utilizando o Kit Universal AllPrep, DNA/RNA/miRNA (Qiagen, Hilden, Alemanha). Em resumo, quatro spots da membrana de polycarbonato obtidos pela técnica ISET (após a quantificação de CTCs), armazenados em RNA later sem formalina foram cortados em pequenos fragmentos (aproximadamente 2mm²) e colocados em microtubos de 1,5 mL. Os spots foram lisados utilizando o tampão de lise e proteinase K fornecido pelo Kit (RLT Plus - Qiagen) e agitadas por 1 minuto. Em seguida, os procedimentos seguiram as instruções do fabricante.

Após a extração, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento da realização do ddPCR, enquanto as amostras de DNA foram armazenadas em freezer a -20°C para futuras pesquisas.

3.6 Quantificação fluorométrica qubit

A quantificação fluorométrica do RNA foi realizada utilizando o *kit Qubit RNA*. O procedimento envolve a adição de uma amostra do RNA extraído a um reagente fluorogênico específico, seguido pela medição da intensidade de fluorescência gerada. Essa intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração de RNA presente na amostra, permitindo assim uma quantificação precisa. A quantificação de RNA das amostras foi realizada conforme orientações do fabricante (*Thermo Fisher Scientific*).

1. Os 2 Tubos de Ensaio foram preparados para os padrões e 1 tubo foi preparado para cada amostra do usuário.

2. A Solução de Trabalho do Qubit® foi preparada diluindo o Reagente de RNA do Qubit® em uma proporção de 1:200 no Buffer de RNA do Qubit®. Foram preparados 200 µL de Solução de Trabalho para cada padrão e amostra.
3. Os Tubos de Ensaio foram preparados (utilizando tubos PCR de 0,5 mL) de acordo com a tabela a seguir

Volume	Padrões	Amostras
Solução de Trabalho (do passo 2)	190 µL	180–199 µL
Padrão (do kit)	10 µL	-
Amostra do Usuário	-	1–20 µL
Total em cada Tubo de Ensaio	200 µL	200 µL

4. Os padrões e as amostras foram agitados por 2–3 segundos e incubados à temperatura ambiente por 2 minutos.
5. Foi selecionado o Ensaio de RNA no Fluorômetro Qubit® 2.0 para calibrar com os padrões e ler as amostras.

3.7 ddPCR (*Droplet Digital Polymerase Chain Reaction*): uma abordagem de alta sensibilidade e precisão para quantificação e detecção de alvos nucleicos

Os experimentos de ddPCR foram conduzidos de acordo com as diretrizes fornecidas pelo fabricante (Bio-Rad). Inicialmente, procedemos com a padronização das mutações SLFN11 para amostras de pacientes com câncer de ovário.

Para realizar os experimentos, montamos a placa de ddPCR em um ambiente controlado, inserindo a amostra, o master mix e as sondas. Após a homogeneização, a mistura de reação da PCR e o óleo para geração de gotículas foram carregados em um cartucho gerador de gotículas de 8 canais (Bio-Rad Laboratories). As misturas da reação de PCR foram então divididas em uma emulsão contendo aproximadamente 20.000 gotículas, com um volume de cerca de 1 nanolitro por gota, que foram transferidas manualmente para uma placa de PCR de 96 poços. A placa foi devidamente selada e submetida a ciclos de amplificação em um termociclador específico para ddPCR (Bio-Rad), seguindo as condições de temperatura recomendadas pelo fabricante.

Posteriormente, a placa foi carregada em um leitor de gotículas QX100 (*Bio-Rad Laboratories*) e a análise dos dados de ddPCR foi conduzida utilizando o software *QuantaSoft* (Versão 1.7.4.0917), o qual analisa cada gotícula individualmente empregando um sistema de detecção de duas cores (configurado para detectar Corantes FAM ou HEX). A quantificação absoluta de RNA foi diretamente dependente do número de gotículas aceitas (positivas e negativas) e da quantidade de RNA analisada.

3.8 Hibridização *in situ* cromogênica

Para realizar a técnica de CISH, primeiramente foram recortados os *spots* da membrana de interesse e colocados em uma placa de 24 poços. As células foram hidratadas com TBS 1X por 5 minutos a temperatura ambiente (T.A), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio por 5 minutos (T.A) e lavagem com H₂O destilada 1X. Em seguida, as células foram incubadas com pepsina citológica por 3 minutos (T.A), seguido de lavagem com H₂O destilada 1X e uma série de lavagens com etanol 70%, 90% e 100% por 1 minuto, seguido de uma lavagem de 1 minuto com H₂O destilada 1X.

Após essa etapa, foram pipetados 10 µl da sonda *ZytoFast CISH* para RNA em cada *spot*, e as membranas foram incubadas em um hibridizador para desnaturação por 5 minutos a 75 °C. Em seguida, a temperatura do hibridizador foi diminuída para 37°C e incubada durante a noite para anelamento e intenção. No segundo dia, a lamínula foi removida com cuidado, ao mesmo tempo em que a lâmina foi lavada com *Wash Buffer* SSC (WB1) e as membranas foram incubadas durante 5 minutos com *Wash Buffer* SSC (WB1) em TA. Em seguida, as membranas (na placa) foram incubadas em banho-maria a 80°C com *Wash Buffer* SSC (WB1). Posteriormente, os *spots* foram lavados duas vezes por 1 minuto com H₂Odd e por 5 minutos em TBS 1X, para aplicação de 10 µl do *Mouse-Anti-DIG* (AB1), seguido de incubação por 15 minutos a 37 °C na câmara de umidade. Os *spots* foram lavados por 1 minuto em TBS 1X T.A, e em seguida foi aplicado 10 µl do polímero *anti-mouse*-HRP (AB2), incubado por mais 15 minutos a 37 °C na câmara de umidade, seguido de lavagem dos *spots* três vezes por 1 minuto em TBS 1X T.A. Em seguida, foram aplicados 10 µl DAB em cada spot para corar as células e incubados por 10 minutos a T.A, seguido de lavagem por 2 minutos em H₂O destilada (1X). Para finalizar, os *spots* foram corados com hematoxilina por 2 minutos e lavados em H₂O destilada (2X), e as lâminas foram montadas em meio aquoso. A leitura das membranas forma examinadas utilizando um microscópio óptico *Research System Microscope BX61* - Olympus, equipado com uma câmera digital SC100 - Olympus, localizada em Tóquio, Japão.

4. Resultados e Discussão

4.1 Fusão celular

Amostras de sangue de 14 pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau foram coletadas com o objetivo de analisar as CTCs/células híbridas e sua correlação com o desfecho clínico. O sangue coletado com EDTA (6 mL) dos pacientes foi utilizado para isolar/identificar CTCs/células híbridas por meio do sistema ISET. Utilizamos marcadores com possível correlação com o fenômeno de fusão celular, como MC1-R, EpCAM e CD45, bem como a expressão de CEN8 por meio da análise CISH. As amostras foram coletadas em três momentos: baseline, após um mês (primeiro seguimento) e após três meses (segundo seguimento) de tratamento com olaparibe (amostra total = 38). Quatorze pacientes foram incluídos e, no baseline e no primeiro seguimento, todos os pacientes apresentaram pelo menos uma CTC.

Encontramos a expressão de MC1-R, EpCAM e CD45 em células (híbridas) em pelo menos um dos momentos de coleta. A presença de microembolos tumorais circulantes (CTM) no primeiro seguimento foi associada a uma sobrevida livre de recorrência (SLR) menor (5,2 vs. 12,2 meses; $p = 0,005$). A expressão de MC1-R em CTM no primeiro e segundo seguimentos foi associada a uma SLR mais curta ($p = 0,005$). A expressão de CEN8 em CTCs também foi relacionada a uma SLR mais curta ($p = 0,035$). Nosso estudo identificou uma alta prevalência de CTCs em pacientes com câncer de ovário, bem como células híbridas. Ambos os subtipos de células demonstram utilidade no prognóstico e na avaliação da resposta ao tratamento.

Os dados obtidos por meio desse estudo foram publicados sob o título “*Fusion Cell Markers in Circulating Tumor Cells from Patients with High-Grade Ovarian Serous Carcinoma*”, na revista *International Journal of Molecular Sciences*, IF: 5.6.

- Ruano, A.P.C.; Gadelha Guimarães, A.P.; Braun, A.C.; Flores, B.C.T.C.P.; Tariki, M.S.; Abdallah, E.A.; Torres, J.A.; Nunes, D.N.; Tirapelli, B.; de Lima, V.C.C.; et al. Fusion Cell Markers in Circulating Tumor Cells from Patients with High-Grade Ovarian Serous Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14687. <https://doi.org/10.3390/ijms232314687>. (Anexo 1).

4.2 Genes

O objetivo inicial do nosso estudo era realizar a análise da expressão dos genes SLFN11, REV7, 53BP1 e CTC1 no RNA das células tumorais circulantes (CTCs) de pacientes com carcinoma seroso de alto grau de ovário. As pacientes estavam em tratamento com o inibidor de PARP (iPARP) olaparibe, o que torna a investigação dessas vias moleculares particularmente relevante, dado o papel crucial desses genes na resposta ao tratamento com iPARPs e no reparo do DNA.

Escolhemos pacientes com carcinoma seroso de alto grau de ovário, pois esse subtipo é frequentemente associado a defeitos na via de reparo do DNA por recombinação homóloga (HRD), tornando-os bons candidatos para o tratamento com iPARPs como o olaparibe. A análise do RNA das CTCs nas pacientes permitiria uma avaliação não invasiva da resposta ao tratamento, identificando possíveis biomarcadores de resistência ou sensibilidade ao olaparibe, como a expressão de SLFN11, que está associada à sensibilidade a iPARPs, ou de REV7, 53BP1 e CTC1, que estão relacionados à reparo do DNA e à resistência ao tratamento.

No entanto, não foi possível realizar a análise da expressão gênica nas CTCs devido a problemas técnicos que comprometeram tanto o funcionamento do equipamento quanto a qualidade das amostras de RNA. Esses problemas afetaram a integridade do RNA, inviabilizando a obtenção de resultados confiáveis. A qualidade insuficiente das amostras e as falhas na máquina durante o processamento impediram a detecção adequada dos níveis de expressão dos genes-alvo, inviabilizando a análise planejada. Consequentemente, os dados necessários para a avaliação dos possíveis biomarcadores de resposta ao olaparibe em CTCs não puderam ser obtidos neste estudo.

4.3 Relação neutrófilo/linfócito (RNL) e a relação plaquetas/linfócitos (RPL)

A trombose associada ao câncer é uma das causas de morbidade e mortalidade em pacientes oncológicos, destacando a necessidade de ferramentas eficazes e acessíveis para prever o risco de tromboembolismo venoso (TEV). A relação neutrófilo/linfócito (RNL) e a relação plaquetas/linfócitos (RPL) têm sido investigadas como potenciais indicadores prognósticos devido à sua associação com inflamação sistêmica e à facilidade de obtenção (Pignataro *et al.* 2022).

Neste estudo, buscamos avaliar essas relações como possíveis marcadores em

pacientes em tratamento oncológico. Contudo, não foi possível obter dados válidos para uma análise conclusiva. A principal limitação foi o tamanho reduzido da amostra, composta por apenas 14 pacientes, o que comprometeu a robustez estatística e a identificação de padrões significativos. Além disso, fatores individuais, como variabilidade nos parâmetros hematológicos causada por comorbidades ou intervenções terapêuticas, podem ter influenciado os resultados. Assim, estudos futuros com amostras maiores e controle rigoroso de variáveis interferentes são necessários para elucidar o papel da RNL e da RPL como marcadores prognósticos na trombose associada ao câncer.

5. Conclusão

O presente estudo prospectivo revelou alguns aspectos sobre o comportamento das células tumorais circulantes (CTCs) e suas características híbridas em pacientes com câncer de ovário. As principais conclusões são:

- **Prevalência e Dinâmica das CTCs:** A análise das amostras de sangue demonstrou um alto índice de CTCs em pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau, tanto no *baseline* quanto nos seguimentos pós-tratamento.
- **Fusão Celular:** A identificação de células híbridas, destacadas pelos marcadores MC1-R, EpCAM e CD45, sugere que a fusão celular pode ser um fenômeno relevante na dinâmica tumoral e na resistência ao tratamento. A alta expressão de MC1-R e sua associação com uma sobrevida livre de recorrência (SLR) mais curta sublinha a importância deste marcador como um potencial indicador prognóstico.
- **Associação com Sobrevida Livre de Recorrência:** A presença de microembolos tumorais circulantes (MTC) e a expressão de MC1-R e CEN8 mostraram correlações significativas com uma SLR reduzida. Esses achados indicam que as características das CTCs e suas variações ao longo do tratamento podem fornecer preditores importantes para a eficácia do tratamento e o prognóstico da doença.

Embora tenhamos obtido resultados promissores, é importante notar que a pesquisa está em andamento e ainda não foram alcançados todos os objetivos planejados. Continuaremos a investigação para obter um panorama mais completo e validar as descobertas preliminares. A nossa meta é concluir a pesquisa com uma compreensão abrangente que possa transformar a abordagem diagnóstica e terapêutica para pacientes com câncer de ovário.

Em conclusão, o estudo apresenta evidências promissoras sobre a relevância das CTCs e das células híbridas na compreensão da resistência ao tratamento e na avaliação do prognóstico em câncer de ovário. A presença e a caracterização dessas células podem evoluir como ferramentas essenciais para a gestão da doença, oferecendo novas perspectivas para a prática clínica e a pesquisa futura. Estudos

adicionais, envolvendo uma coorte maior, são necessários para validar e expandir essas descobertas e potencialmente transformar a abordagem diagnóstica e terapêutica para pacientes com câncer de ovário.

6. Referências

1. Abreu, M., et al. Circulating Tumor Cells Characterization Revealed TIMP1 as a Potential Therapeutic Target in Ovarian Cancer. **Cells** 2020, 9, 1218.
<https://doi.org/10.3390/cells9051218>
2. Aceto N, et al. Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. **Cell**. 2014; 158:1110-1122.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>.
3. Ackerson SM, et al. Human CTC1 primarily functions in telomere maintenance/protection and promotes CHK1 phosphorylation in response to global replication stress. **bioRxiv**. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.01.15.906891>.
4. Alix-Panabières, C., & Pantel, K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. **Cancer Discovery**, 6(5), 479-491 (2016). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1483>
5. Alix-Panabières, C., & Pantel, K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. **Cancer Discovery**, 11(4), 858-873 (2021). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1311>
6. Allard W, et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. **Clinical Cancer Research**. 2004;10:6897-6904. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0378>.
7. Amintas S, et al. Circulating Tumor Cell Clusters: United We Stand Divided We Fall. **International Journal of Molecular Sciences**. 2020;21:2653.
<https://doi.org/10.3390/ijms21072653>.

8. Archetti M, et al. Polyploidy as an Adaptation against Loss of Heterozygosity in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022;23:158528.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158528>.
9. Armstrong, D., et al. Ovarian Cancer, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN**, 19(2), 191-226 (2021). <https://doi.org/10.6004/jnccn.2021.0007>
10. Asante, D, B., et al. "Genetic Analysis of Heterogeneous Subsets of Circulating Tumour Cells from High Grade Serous Ovarian Carcinoma Patients." **Scientific Reports** 13, no. 1 (February 13, 2023): 2552. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29416-z>.
11. Ashworth TR (1869) A case of Cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. **Australas Med J** 14:146–149
12. Ayala-Domínguez, L. et al. "Mechanisms of Vasculogenic Mimicry in Ovarian Cancer." **Frontiers in Oncology**, 9 (2019). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00998>.
13. Babaier, A., & Ghatage, P. Mucinous Cancer of the Ovary: Overview and Current Status. **Diagnostics**, 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10010052>
14. Babaier, A., et al. "Low-Grade Serous Carcinoma of the Ovary: The Current Status." **Diagnostics**, 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020458>.
15. Bankhead, C., Kehoe, S., & Austoker, J. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, 112 (2005). <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00572.x>
16. Barazas M, et al. The CST Complex Mediates End Protection at Double-Strand Breaks and Promotes PARP Inhibitor Sensitivity in BRCA1-Deficient Cells. **Cell Reports**. 2018;23:2107-2118. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.046>.

17. Baykara O, et al. Amplification of Chromosome 8 Genes in Lung Cancer. **Journal of Cancer**. 2015;6:270-275. <https://doi.org/10.7150/jca.10638>.
18. Bednarikova, M., et al. Can Schlafen 11 Help to Stratify Ovarian Cancer Patients Treated with DNA-Damaging Agents? **Cancers**, 14(10), 2353 (2022). <https://doi.org/10.3390/cancers14102353>
19. Blassl, C., et al. Gene Expression Profiling of Single Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer - Establishment of a Multi-Marker Gene Panel. **Molecular Oncology**, 10(7), 1030-1042 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.04.002>
20. Brekken R, et al. SPARC, a Matricellular Protein: At the Crossroads of Cell-Matrix Communication. **Matrix Biology**. 2001;19(8):816-827. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00133-5).
21. Carey, J. P. W., et al. Synthetic Lethality of PARP Inhibitors in Combination with MYC Blockade Is Independent of BRCA Status in Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Research**, 78(3), 742-757 (2018). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1494>
22. Carnevale S, et al. Neutrophil Diversity in Inflammation and Cancer. **Frontiers in Immunology**. 2023; 14:1180810. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1180810>.
23. Chakraborty, A., et al. "GnT-V expression and metastatic phenotypes in macrophage-melanoma fusion hybrids is down-regulated by 5-Aza-dC: evidence for methylation sensitive, extragenic regulation of GnT-V transcription." **Gene**, vol. 374, 2006, pp. 166-173. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2006.01.031>
24. Chan, J. et al. "Symptoms of Women with High-Risk Early-Stage Ovarian Cancer." **Obstetrics & Gynecology**, 139 (2022): 157-162. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000004642>.

25. Chang, C.-H., et al. Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Enhances Cell Proliferation, Migration, and Epithelial Mesenchymal Transition, and SPARC Expression is Associated with Tumor Grade in Head and Neck Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, 18 (2017).
<https://doi.org/10.3390/ijms18071556>
26. Chebouti, I. et al. "EMT-like circulating tumor cells in ovarian cancer patients are enriched by platinum-based chemotherapy." **Oncotarget**, 8 (2017): 48820-48831.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16179>.
27. Chinen, L. T. et al. "Cytokeratin-based CTC counting unrelated to clinical follow up." **Journal of Thoracic Disease**, 5, no. 5 (2013): 593-599.
<https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.09.18>.
28. Choi, M., Kipps, T., & Kurzrock, R. ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. **Molecular Cancer Therapeutics**, 15(8), 1781-1791 (2016).
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0945>
29. Choudhury, A., et al. Structural genomics approach to investigate deleterious impact of nsSNPs in conserved telomere maintenance component 1. **Scientific Reports**, 11, 10202 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89450-7>
30. Clairmont, C. S., & D'Andrea, A. D. REV7 Directs DNA Repair Pathway Choice. **Trends in Cell Biology**, (2021). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.05.009>
31. Clawson, G. et al. "Circulating Tumor Cells in Melanoma Patients." **PLoS ONE**, 7 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041052>.
32. Cortez, A., et al. "Advances in ovarian cancer therapy." **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, vol. 81, 2017, pp. 17-38.
<https://doi.org/10.1007/s00280-017-3501-8>.

33. Crane, E., & Brown, J. Early-stage mucinous ovarian cancer: A review. **Gynecologic Oncology**, 149(3), 598-604 (2018).
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.01.035>
34. Davidson, B. C., et al. "The Role of the Tumor Stroma in Ovarian Cancer." **Frontiers in Oncology**, 4 (2014). <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00104>.
35. De Giorgi U, et al. Association between circulating tumor cells and peripheral blood monocytes in metastatic breast cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**. 2019; 11:1758835919866065.
<https://doi.org/10.1177/1758835919866065>.
36. De Rubis, G., Rajeev Krishnan, S., & Bebawy, M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. **Trends in Pharmacological Sciences**, 40(3), 172-186 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.01.006>
37. Debuquoy, C., Romeo, C., Vanacker, H., & Ray-Coquard, I. Rare ovarian tumors: an update on diagnosis and treatment. **International Journal of Gynecological Cancer**, 30, 879-887 (2020). <https://doi.org/10.1136/ijgc-2020-001235>
38. Del Carmen MD, et al. Clear cell carcinoma of the ovary: a review of the literature. **Gynecologic Oncology**. 2012;126(3):481-490.
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.04.021>.
39. Deng, Z., Wu, S., Wang, Y., & Shi, D. Circulating Tumor Cell Isolation for Cancer Diagnosis and Prognosis. **EBioMedicine**, 83, 104237 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104237>
40. Dianat-Moghadam, H. et al. "NK cells-directed therapies target circulating tumor cells and metastasis." **Cancer Letters** (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.09.021>.

41. Diaz, L. & Bardelli, A. "Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA." **Journal of Clinical Oncology**, 32, no. 6 (2014): 579-586.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011>.
42. DiSilvestro P, et al. Overall Survival With Maintenance Olaparib at a 7-Year Follow-Up in Patients With Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer and a BRCA Mutation: The SOLO1/GOG 3004 Trial. **Journal of Clinical Oncology**. 2022; 41:609-617. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.01549>.
43. Ebell M, et al. A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer. **American Journal of Preventive Medicine**. 2016;50(3):384-394.
<https://doi.org/10.1016/j.amepre.2015.09.023>.
44. Farmer, H. et al. "Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy." **Nature**, 434 (2005): 917-921.
<https://doi.org/10.1038/nature03445>.
45. Feely, N. et al. "Targeting Mucin Protein Enables Rapid and Efficient Ovarian Cancer Cell Capture: Role of Nanoparticle Properties in Efficient Capture and Culture." **Small**, 19, no. 18 (May 2023): e2207154. <https://doi.org/10.1002/sml.202207154>.
46. Fischerová, D., & Burgetová, A. Imaging techniques for the evaluation of ovarian cancer. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, 28(5), 697-720 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.04.006>
47. Fong, P. C. et al. "Poly (ADP)-Ribose Polymerase Inhibition: Frequent Durable Responses in BRCA Carrier Ovarian Cancer Correlating With Platinum-Free Interval." **Journal of Clinical Oncology**, 28, no. 15 (2010): 2512-2519.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.9589>.

48. Genna, A., et al. "EMT-Associated Heterogeneity in Circulating Tumor Cells: Sticky Friends on the Road to Metastasis." **Cancers**, 12 (2020).
<https://doi.org/10.3390/cancers12061632>.
49. Golan T, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. **The New England Journal of Medicine**. 2019.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1903387>.
50. Gudmundsdottir, K. & Ashworth, A. "The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability." **Oncogene**, 25 (2006): 5864-5874. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209874>.
51. Gupta V, et al. ApoStream(™), a new dielectrophoretic device for antibody-independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. **Biomicrofluidics**. 2012;6(2):24133. <https://doi.org/10.1063/1.4731647>.
52. Handerson T, et al. Melanophages reside in hypermelanotic, aberrantly glycosylated tumor areas and predict improved outcome in primary cutaneous malignant melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**. 2007; 34:593-599.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2006.00681.x>.
53. Hapke R, et al. Hypoxia-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Cancer. **Cancer Letters**. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.05.012>.
54. Heidrich, I. et al. "Liquid biopsies: Potential and challenges." **International Journal of Cancer**, 148 (2020): 528-545. <https://doi.org/10.1002/ijc.33217>.
55. Hernández, J. M. & Podbilewicz, B. "The hallmarks of cell-cell fusion." **Development**, 144 (2017): 4481-4495. <https://doi.org/10.1242/dev.155523>.
56. Hou, J. M. et al. "Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer." **The American Journal of Pathology**, 178, no. 3 (2011): 989-96.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.003>.

57. Huang Q, et al. Shear Stress Activates ATOH8 via Autocrine VEGF Promoting Glycolysis Dependent-Survival of Colorectal Cancer Cells in the Circulation. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. 2020;39. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-1533-0>.
58. Huang, C., et al. N-acetylglucosaminyltransferase V modulates radiosensitivity and migration of small cell lung cancer through epithelial–mesenchymal transition. **The FEBS Journal**, 282 (2015). <https://doi.org/10.1111/febs.13419>
59. Hujanen R, et al. Vasculogenic Mimicry: A Promising Prognosticator in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Esophageal Cancer? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Cells**. 2019; 9:507. <https://doi.org/10.3390/cells9020507>.
60. Instituto Nacional de Câncer (INCA). "Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil." Rio de Janeiro: INCA, 2023. <https://www.inca.gov.br/estimativa>.
61. International Agency for Research on Cancer (IARC). "Global Cancer Observatory: Cancer Today." IARC, 2020. <https://www.iarc.who.int/>
62. Jasin, M. & Rothstein, R. "Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination." **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 5, no. 11 (2013): a012740. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012740>.
63. Jo U, et al. SLFN11 promotes CDT1 degradation by CUL4 in response to replicative DNA damage, while its absence leads to synthetic lethality with ATR/CHK1 inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2021;118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2015654118>.
64. Kaufman, B., et al. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, 33(3), 244-250 (2015). <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2728>

65. Kehoe, S. et al. "Primary Chemotherapy versus Primary Surgery for Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer (CHORUS): An Open-Label, Randomised, Controlled, Non-Inferiority Trial." **Lancet**, 386, no. 9990 (2015): 249-257.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62223-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62223-6).
66. Keller, L. et al. "Biology and clinical relevance of EpCAM." **Cell Stress**, 3 (2019): 165 180. <https://doi.org/10.15698/cst2019.06.188>.
67. Keung MY, et al. PARP Inhibitors as a Therapeutic Agent for Homologous Recombination Deficiency in Breast Cancers. **Journal of Clinical Medicine**. 2019;8(4):435. <https://doi.org/10.3390/jcm8040435>.
68. Kim O, et al. Whole Genome Sequencing of Single Circulating Tumor Cells Isolated by Applying a Pulsed Laser to Cell-Capturing Microstructures. **Small**. 2019;<https://doi.org/10.1002/smll.201902607>.
69. Kim, N. et al. "High-Throughput Viable Circulating Tumor Cell Isolation Using Tapered-Slit Membrane Filter-Based Chipsets in the Differential Diagnosis of Ovarian Tumors." **PLoS ONE**, 19, no. 6 (2024): e0304704.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0304704>.
70. Kirschmann, D., et al. Molecular Pathways: Vasculogenic Mimicry in Tumor Cells: Diagnostic and Therapeutic Implications. **Clinical Cancer Research**, 18, 2726-2732 (2012). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3237>
71. Kobayashi, E. et al. "Biomarkers for Screening, Diagnosis, and Monitoring of Ovarian Cancer." **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 21 (2012): 1902-1912. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0646>.
72. Krebs M, et al. Analysis of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Using Epithelial Marker-Dependent and -Independent Approaches.

Journal of Thoracic Oncology. 2012; 7:306-315.

<https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31823c5c16>.

73. Krebs, M. G. et al. "Molecular Analysis of Circulating Tumour Cells—Biology and Biomarkers." **Nature Reviews Clinical Oncology**, 11, no. 2 (2014): 129-144.

<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.270>.

74. Kubelac, P. et al. "Changes in DNA Damage Response Markers with Treatment in Advanced Ovarian Cancer." **Gynecologic Oncology**, 149, no. SUPPLEMENT 1 (2018): 164-165. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.04.377>.

75. Kuroki, L. & Guntupalli, S. "Treatment of epithelial ovarian cancer." **BMJ**, 371 (2020). <https://doi.org/10.1136/bmj.m3773>.

76. Ledermann, J. et al. "Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial." **The Lancet. Oncology**, 15, 8 (2014): 852-861. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70228-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70228-1).

77. Lee M, et al. Predictive Value of Circulating Tumor Cells (CTCs) Captured by Microfluidic Device in Patients with Epithelial Ovarian Cancer. **Gynecologic Oncology**. 2017;145(2):361-365. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.02.042>.

78. Lee S, et al. Molecular Analysis of Clinically Defined Subsets of High-Grade Serous Ovarian Cancer. **Cell Reports**. 2020; 31:107502-107502. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.066>.

79. Lisio MA, et al. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. **International Journal of Molecular Sciences**. 2019;20:40952. <https://doi.org/10.3390/ijms20040952>.

80. Liu, J. et al. "Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for diagnosis of ovarian carcinoma." **European Journal of Radiology**, 62, no. 3 (2007): 328-34. <https://doi.org/10.1016/J.EJRAD.2007.02.040>.
81. Loboda, A.P., et al "BRCA Mutations—The Achilles Heel of Breast, Ovarian and Other Epithelial Cancers." **International Journal of Molecular Sciences**, 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms24054982>.
82. Loh, C., et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. **Cells**, 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/cells8101118>
83. Lord CJ, et al. The DNA Damage Response and Cancer Therapy. **Nature**. 2012;481(7381):287–294. <https://doi.org/10.1038/nature10760>.
84. Mahmood RD, et al. First-Line Management of Advanced High-Grade Serous Ovarian Cancer. **Current Oncology Reports**. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11912-020-00933-8>.
85. Martins I, et al. Liquid Biopsies: Applications for Cancer Diagnosis and Monitoring. **Genes**. 2021;12(3):349. <https://doi.org/10.3390/genes12030349>.
86. Matulonis U, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed serous ovarian cancer and a BRCA mutation: Overall survival adjusted for postprogression poly (adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibitor therapy. **Cancer**. 2016; 122:2995-3005. <https://doi.org/10.1002/cncr.29995>.
87. McAlpine, J. N. et al. "BRCA1 and BRCA2 mutations correlate with TP53 abnormalities and presence of immune cell infiltrates in ovarian high-grade serous carcinoma." **Modern Pathology**, 25 (2012): 740-750. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.211>.

88. Mirza-Aghazadeh-Attari M, et al. 53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer. **DNA Repair**. 2019; 73:110-119.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.11.008>.
89. Miyamoto, D., Sequist, L. V., & Lee, R. J. Circulating tumour cells—monitoring treatment response in prostate cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 11, 401-412 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.82>
90. Moein S, et al. Cancer regeneration: Polyploid cells are the key drivers of tumor progression. **Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Cancer**. 2020;188408.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188408>.
91. Moscovitz, A., et al. "The Importance of Melanocortin Receptors and Their Agonists in Pulmonary Disease." **Frontiers in Medicine**, vol. 6, 2019.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00145>
92. Muinao T, et al. Multi-biomarker panel signature as the key to diagnosis of ovarian cancer. **Heliyon**. 2019;5. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02826>.
93. Mutch, D., & Prat, J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. **Gynecologic Oncology**, 133(3), 401-404 (2014).
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.04.013>
94. Nie L, et al. Folic Acid Targeting for Efficient Isolation and Detection of Ovarian Cancer CTCs from Human Whole Blood Based on Two-Step Binding Strategy. **ACS Applied Materials & Interfaces**. 2018;10(16):14055-14062.
<https://doi.org/10.1021/acsami.8b02583>.

95. Nonneville A, et al. Clinicopathological characterization of a real-world multicenter cohort of endometrioid ovarian carcinoma: Analysis of the French national ESME-Unicancer database. **Gynecologic Oncology**. 2021;<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2021.07.019>.
96. Pan Y, et al. Folic Acid-Modified Fluorescent-Magnetic Nanoparticles for Efficient Isolation and Identification of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer. **Biosensors**. 2022;12(3):184. <https://doi.org/10.3390/bios12030184>.
97. Pantel, K. & Speicher, M. "The biology of circulating tumor cells." **Oncogene**, 35 (2016): 1216-1224. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.192>.
98. Pantel, K. et al. "Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure." **Nature Reviews Clinical Oncology**, 16 (2019): 409-424. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0187-3>.
99. Pawelek, J. & Chakraborty, A. "Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis." **Nature Reviews Cancer**, 8 (2008): 377-386. <https://doi.org/10.1038/nrc2371>.
100. Pearl M, et al. Prognostic analysis of invasive circulating tumor cells (iCTCs) in epithelial ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**. 2014;134(3):581-590. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.06.013>.
101. Prat, J. "FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication." **Journal of Gynecologic Oncology**, 26 (2015): 87-89. <https://doi.org/10.3802/jgo.2015.26.2.87>.

102. Punzón-Jiménez P, et al. Molecular Management of High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022;23:13777. <https://doi.org/10.3390/ijms232213777>.
103. Qing X, et al. A Clinical Diagnostic Value Analysis of Serum CA125, CA199, and HE4 in Women with Early Ovarian Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**. 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9339325>.
104. Querleu D, et al. European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) Guidelines for Ovarian Cancer Surgery. **International Journal of Gynecological Cancer**. 2017;27(7):1534-1542. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000001041>.
105. Ramus SJ, et al. The Contribution of BRCA1 and BRCA2 to Ovarian Cancer. **Molecular Oncology**. 2009;3(2):138-150. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.02.001>.
106. Ray-Coquard, I. et al. "Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer." **The New England Journal of Medicine**, 381, 25 (2019): 2416-2428. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911361>.
107. Rheinländer, A., et al. "CD45 in human physiology and clinical medicine." **Immunology letters**, 196 (2018): 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009>.
108. Rosenberg R, et al. Comparison of Two Density Gradient Centrifugation Systems for the Enrichment of Disseminated Tumor Cells in Blood. **Cytometry**. 2002;49(4):150-158. <https://doi.org/10.1002/CYTO.10161>.
109. Roy R, et al. BRCA1 and BRCA2: Different Roles in a Common Pathway of Genome Protection. **Nature Reviews Cancer**. 2011;12:68-78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>

110. Ruano APC., et al. Fusion Cell Markers in Circulating Tumor Cells from Patients with High-Grade Ovarian Serous Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022; 23:14687. <https://doi.org/10.3390/ijms232314687>.
111. Shaaban, A., et al. "Ovarian malignant germ cell tumors: cellular classification and clinical and imaging features." **Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, Inc**,34,3(2014):777-801 . <https://doi.org/10.1148/rq.343130067>.
112. Shen Z., et al. Current detection technologies for circulating tumor cells. **Chemical Society Reviews**. 2017;46(8):2038-2056. <https://doi.org/10.1039/c6cs00803h>.
113. Stewart., C., Ralyea, C., & Lockwood, S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. **Seminars in Oncology Nursing**, 35(2), 151-156 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001>
114. Sung, H. et al. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 71 (2021): 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
115. Szczerba, B., et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. **Nature**, 566, 553-557 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0915-y>
116. Tew W, et al. PARP Inhibitors in the Management of Ovarian Cancer: ASCO Guideline. **Obstetrical & Gynecological Survey**. 2020;75(4):215-225. <https://doi.org/10.1097/OGX.0000000000000869>.

117. Torres, J. A. et al. "CD47 Expression in Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli from Non-Small Cell Lung Cancer Patients Is a Poor Prognosis Factor." **International Journal of Molecular Sciences**, 24 (2023).
<https://doi.org/10.3390/ijms241511958>.
118. Turashvili, G. et al. "Tumor BRCA Testing in High Grade Serous Carcinoma: Mutation Rates and Optimal Tissue Requirements." **Cancers**, 12 (2020).
<https://doi.org/10.3390/cancers12113468>.
119. Vang R, et al. Ovarian Low-Grade and High-Grade Serous Carcinoma: Pathogenesis, Clinicopathologic and Molecular Biologic Features, and Diagnostic Problems. **Advances in Anatomic Pathology**. 2009;16:267-282.
<https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181b4fffa>.
120. Vergote I, et al. Neoadjuvant Chemotherapy or Primary Surgery in Stage IIIC or IV Ovarian Cancer. **New England Journal of Medicine**. 2010;363(10):943-953.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908806>.
121. Virtanen V, et al. PARP Inhibitors in Prostate Cancer—the Preclinical Rationale and Current Clinical Development. **Genes**. 2019;10(8):565.
<https://doi.org/10.3390/genes10080565>.
122. Wan, J. et al. "Aneuploidy of chromosome 8 and mutation of circulating tumor cells predict pathologic complete response in the treatment of locally advanced rectal cancer." **Oncology Letters**, 16, no. 2 (2018): 1863-1868.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8831>.
123. Wankhede, D., Grover, S., & Hofman, P. Circulating Tumor Cells as a Predictive Biomarker in Resectable Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Cancers**, 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/cancers14246112>

124. Williamson S, et al. Vasculogenic Mimicry in Small Cell Lung Cancer. **Nature Communications**. 2016; 7:13322. <https://doi.org/10.1038/ncomms13322>.
125. Wit S, et al. The Detection of EpCAM+ and EpCAM– Circulating Tumor Cells. **Scientific Reports**. 2015; 5:12270. <https://doi.org/10.1038/srep12270>.
126. Yan W, et al. Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis. **Scientific Reports**. 2017; 7:43464. <https://doi.org/10.1038/srep43464>.
127. Yang, C., et al. Immunotherapy for Ovarian Cancer: Adjuvant, Combination, and Neoadjuvant. **Frontiers in Immunology**, 11 (2020). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.577869>
128. Yeung, K. & Yang, J. "Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis." **Molecular Oncology**, 11 (2016): 28-39. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12017>.
129. Young R. Ovarian Sex Cord-Stromal Tumours and Their Mimics. **Pathology**. 2018;50(1):5-15. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.09.007>.
130. Zhu X, et al. The significance and therapeutic potential of PD-1 and its ligands in ovarian cancer: A systematic review. **Gynecologic Oncology**. 2016;142(1):184-189. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.04.002>.
131. Zhu, J. et al. "Efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors in ovarian cancer: a single-arm meta-analysis." **Journal of Ovarian Research**, 14 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00862-5>.
132. Murakumo, Y. Et al. "REV7 in Cancer Biology and Management". **Cancers**, 15, no. 6: 1721 (2023). <https://doi.org/10.3390/cancers15061721>

7. Artigos Publicados

1. NOWOSH, V. ; BRAUN, A. C. ; **RUANO, A. P. C.** ; CHINEN, L. T. D. ; MASSOCO, C. de O. Pilot study to evaluate isolation by size of circulating tumour cells in canine oral melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2024.
2. TARIKI, M. S.; BARBERAN, C. C. G.; TORRES, J. A.; **RUANO, A. P. C.**; COSTA, D. J. F.; BRAUN, A. C.; CHINEN, L. T. D. Circulating tumor cells as a predictor and prognostic tool for metastatic clear cell renal carcinoma: An immunocytochemistry and genomic analysis. *Pathology-Research and Practice*, v. 253, p. 154918, 2024.
3. TORRES, J. A.; BRITO, A. B. C.; SILVA, V. S.; MESSIAS, I. M.; BRAUN, A. C.; **RUANO, A. P. C.**; CHINEN, L. T. D. CD47 expression in circulating tumor cells and circulating tumor microemboli from non-small cell lung cancer patients is a poor prognosis factor. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 15, p. 11958, 2023.
4. **RUANO, A. P. C.**; COSTA, D. J. F.; BRAUN, A. C.; TORRES, J. A.; BARBOSA, P. H. P.; ABDALLAH, E. A.; CHINEN, L. T. D HPV virus and biomarkers of resistance to chemoradiation in circulating tumor cells from patients with squamous cell carcinoma of the anus. *Pathology-Research and Practice*, v. 243, p. 154327, 2023.
5. **RUANO, A. P. C.**; GUIMARÃES, A. P. G.; BRAUN, A. C.; FLORES, B. C.; TARIKI, M. S.; CHINEN, L. T. D. Fusion cell markers in circulating tumor cells from patients with high-grade ovarian serous carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 23, p. 14687, 2022.
6. TARAZONA, J. G. R.; ABDALLAH, E. A.; FLORES, B. C. T.; BRAUN, A. C.; CAMILLO, C. M. C.; MARCHI, F. A.; **RUANO, A. P. C.**; CHINEN, L. T. D. Mir-203A-3P and MMP-2 proteins are highly expressed in CIRCULATING tumor cells from patients with pancreatic carcinoma. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, v. 34, p. e1628, 2022.
7. PIGNATARO, B. S.; ABDALLAH, E. A.; MELLO, C. A. L.; CALSAVARA, V. F.; NISHINARI, K.¹; **RUANO, A. P. C.**; CHINEN, L. T. D. Is platelet-lymphocyte ratio (PLR) a predictor of thrombosis and together with circulating tumor cells capable to determine recurrence-free survival in patients with gastric... *Brazilian*

Journal of Oncology, v. 18, p. 1-8, 2022.

8. BRAUN, A. C.; CAMPOS, F. A. B.; ABDALLAH, E. A.; **RUANO, A. P. C.**; MEDINA, T. S.; TARIKI, M. S.; CHINEN, L. T. D. Circulating tumor cells in desmoid tumors: new perspectives. *Frontiers in Oncology*, v. 11, p. 622626, 2021.
9. SILVA, V. S.; ABDALLAH, E. A.; FLORES, B. C. T.; BRAUN, A. C.; COSTA, D. J. F.; **RUANO, A. P. C.**; CHINEN, L. T. D. Molecular and dynamic evaluation of proteins related to resistance to neoadjuvant treatment with chemoradiotherapy in circulating tumor cells of patients with locally advanced... *Cells*, v. 10, n. 6, p. 1539, 2021.
10. **RUANO, A. P. C.**; LUPINACCI, F. C. S. In Vitro and In Vivo Models of Circulating Tumor Cells. In: CHINEN, L. T. D. (Org.). *Atlas of Liquid Biopsy: Circulating Tumor Cells and Other Rare Cells in Cancer Patients' Blood*. Springer Nature, 2021.



Article

Fusion Cell Markers in Circulating Tumor Cells from Patients with High-Grade Ovarian Serous Carcinoma

Anna Paula Carreta Ruano ¹, Andrea Paiva Gadelha Guimarães ², Alexcia C. Braun ¹, Bianca C. T. C. P. Flores ¹, Milena Shizue Tariki ², Emne A. Abdallah ¹, Jacqueline Aparecida Torres ¹, Diana Noronha Nunes ¹, Bruna Tirapelli ², Vladimir C. Cordeiro de Lima ², Marcello Ferretti Fanelli ³, Pierre-Emmanuel Colombo ⁴, Alexandre André Balieiro Anastácio da Costa ², Catherine Alix-Panabières ^{5,6} and Ludmilla Thomé Domingos Chinen ^{3,*}

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

² Medical Oncology Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo 01525-010, Brazil

³ Núcleo de Pesquisa e Ensino da Rede São Camilo, São Paulo 04014-002, Brazil

⁴ Department of Surgical Oncology, Institut du Cancer de Montpellier, ICM-Val d'Aurelle, 34090 Montpellier, France

⁵ Laboratory of Rare Human Circulating Cells (LCCRH), Department University Medical Centre of Montpellier, 34295 Montpellier, France

⁶ CREEC/CANECEV, MIVEGEC (CREES), University of Montpellier, CNRS, IRD, 34000 Montpellier, France

* Correspondence: ltdchinen@gmail.com



Citation: Ruano, A.P.C.; Gadelha Guimarães, A.P.; Braun, A.C.; Flores, B.C.T.C.P.; Tariki, M.S.; Abdallah, E.A.; Torres, J.A.; Nunes, D.N.; Tirapelli, B.; de Lima, V.C.C.; et al. Fusion Cell Markers in Circulating Tumor Cells from Patients with High-Grade Ovarian Serous Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14687. <https://doi.org/10.3390/ijms232314687>

Academic Editor: Hyonchol Jang

Received: 5 October 2022

Accepted: 3 November 2022

Published: 24 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cancer is primarily a disease in which late diagnosis is linked to poor prognosis, and unfortunately, detection and management are still challenging. Circulating tumor cells (CTCs) are a potential resource to address this disease. Cell fusion, an event discovered recently in CTCs expressing carcinoma and leukocyte markers, occurs when ≥ 2 cells become a single entity (hybrid cell) after the merging of their plasma membranes. Cell fusion is still poorly understood despite continuous evaluations in in vitro/in vivo studies. Blood samples from 14 patients with high-grade serous ovarian cancer (A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil) were collected with the aim to analyze the CTCs/hybrid cells and their correlation to clinical outcome. The EDTA collected blood (6 mL) from patients was used to isolate/identify CTCs/hybrid cells by ISET. We used markers with possible correlation with the phenomenon of cell fusion, such as MC1-R, EpCAM and CD45, as well as CEN8 expression by CISH analysis. Samples were collected at three timepoints: baseline, after one month (first follow-up) and after three months (second follow-up) of treatment with olaparib (total sample = 38). Fourteen patients were included and in baseline and first follow-up all patients showed at least one CTC. We found expression of MC1-R, EpCAM and CD45 in cells (hybrid) in at least one of the collection moments. Membrane staining with CD45 was found in CTCs from the other cohort, from the other center, evaluated by the CellSearch® system. The presence of circulating tumor microemboli (CTM) in the first follow-up was associated with a poor recurrence-free survival (RFS) (5.2 vs. 12.2 months; $p = 0.005$). The MC1-R expression in CTM in the first and second follow-ups was associated with a shorter RFS ($p = 0.005$). CEN8 expression in CTCs was also related to shorter RFS ($p = 0.035$). Our study identified a high prevalence of CTCs in ovarian cancer patients, as well as hybrid cells. Both cell subtypes demonstrate utility in prognosis and in the assessment of response to treatment. In addition, the expression of MC1-R and EpCAM in hybrid cells brings new perspectives as a possible marker for this phenomenon in ovarian cancer.

Keywords: circulating tumor cells; cell fusion; hybrid cells; CD45; ovarian cancer; in situ hybridization

1. Introduction

Globally, cancer is the leading cause of death [1]. In 112 of 183 countries, it is the number-one cause of death before age 70, and in at least 23 countries, it ranks third or fourth, according to World Health Organization (WHO) estimates [2]. Ovarian cancer is one of the deadliest gynecological cancers: in 2020, WHO estimated that it was responsible

for 313,959 new cases and 207,252 deaths [2]. In Brazil in 2020, ovarian cancer accounted for 6650 new cases and 3921 deaths [3].

Precision medicine based on the evaluation of primary tumor characteristics is complicated, as it must account for intra-tumor heterogeneity and tumor changes over time [4]. Circulating tumor cells (CTCs), one of the circulating biomarkers of the “liquid biopsy” [5], have been studied since 2004. The U.S. Food and Drug Administration (FDA) has approved the CellSearch[®] system for analysis of CTCs in metastatic breast, colorectal and prostate cancers. This system involves isolation by enrichment with epithelial cell-specific antibodies (EpCAM), and CD45 for leukocyte depletion [6–8]. However, the studies conducted since then have proven CTCs to be highly heterogeneous and difficult to isolate solely by EpCAM and CD45. Many studies have shown that CTCs that undergo epithelial–mesenchymal transition can express epithelial, mesenchymal and stem cell markers [9,10]. Therefore, methods based on physical and morphological properties of CTCs may be more reliable. In addition, by using an epithelial marker-independent enrichment technique, it may be possible to identify CTC clusters or circulating tumor microemboli (CTM) composed of only CTCs or CTCs escorted by immune cells. CTM is more likely to survive in the bloodstream, to overcome cytotoxic treatment and to form metastases than CTCs [11]. Thus, epithelial marker-independent enrichment methods for CTCs and CTM can offer new opportunities to study their heterogeneity. Techniques based on their physical characteristics, such as size, density, deformability and electrical properties, will offer additional insight [12,13].

Cell fusion in CTCs is defined as the expression of both carcinoma and leukocyte markers [14]. It is a feature that can be evaluated by marker-independent enrichment methods. In 1911, Professor Otto Aichel was the first to propose that cancer cells can fuse themselves with white blood cells, spread through the peripheral circulation and initiate the metastatic process [15]. Conceptually, cell fusion occurs when two or more cells become a single entity after the merging of their plasma membranes [16,17]. The process is responsible for the formation of new organisms via fertilization or mating, as well as for the formation of fused cells such as hybridomas (myeloma cells fused with lymphocytes) [17]. It is also employed in the production of monoclonal antibodies.

Despite the continuous evaluation of cell fusions by many *in vitro* and *in vivo* studies [18,19], this multistep process involving cell–cell recognition, cell adhesion and membrane fusion [20] is still poorly understood. Cell fusion is an important and highly controlled process, key to embryonic development and maintaining homeostasis. It has also gained attention for its proposed role in cancer progression, as a cooperative mechanism underlying metastasis and drug resistance [21]. The process allows cancer cells to fuse with diverse non-tumor cells, including stromal and epithelial cells and macrophages [22,23].

Melanocortin receptor 1 (MC1-R) is a five-transmembrane G-protein-coupled receptor that allows for the influx of extracellular calcium and subsequent activation of inositol triphosphate. MC1-R has myriad ligand affinities and downstream effects and can be found in many cell types, including melanoma, epithelial and endothelial and immune cells [24,25]. Some authors have reported fusion events between macrophages and melanoma cells [26,27].

Polyploidy is another signal of cell fusion. Polyploid cells contain two or more sets of homologous chromosomes. Polyploidy is a spontaneous event that contributes to normal organogenesis, tissue repair and tissue differentiation [28,29]. It can contribute to the formation of centrosomal aberrations, which leads to aneuploid genomes [30]. As a result, fusion hybrids can provide a survival advantage, making it easier for tumor cells to be cloaked with innate epitopes and evade the immune system, facilitating survival in the bloodstream and parenchymal infiltration [23].

In the present study, we observed fused cells using two different CTC identification systems. The first was ISET[®], which isolates CTCs by size through filtration and cytopathological analysis. The second was the CellSearch system[®], which identifies CTCs of epithelial origin using magnetic beads.

Here we report a series of 14 patients with high-grade serous ovarian cancer. The primary outcome was to determine the presence of cell fusion (hybrid cells) in CTCs. This was performed using immunocytochemical analysis to detect the expression of CD45 alone or with MC1-R [24,25,31] or EpCAM, a marker commonly used to isolate CTCs from epithelial tumors [32]. The secondary outcomes were to test the association of fusion markers in CTCs with recurrence-free survival (RFS) and overall survival (OS). We also evaluated the presence of centromere polyploidy of chromosome 8 at baseline to confirm the presence of hybrid cells and tested its association with RFS and OS. Finally, we reported three cases of ovarian cancer from another medical center that were evaluated by the CellSearch system® to confirm our findings of hybrid cells using another method.

2. Results

2.1. Clinical-Pathological Data

Fourteen patients were included, all of whom had high-grade serous ovarian cancer and were undergoing platinum-based chemotherapy with maintenance PARP inhibitor treatment (olaparib). The median age was 45 years (range 29–55). All patients were treated with carboplatin and paclitaxel, 64.3% of patients with six cycles and 14.3% with eight cycles. All patients included in the study had already relapsed once before being included in the study and the most frequent locations for relapse were pelvic (28.6%), pelvic and mediastinum (14.3%), mediastinum (7.1%), pelvic/retroperitoneum (7.1%) and retroperitoneum (7.1%). Before baseline CTC collection, eight patients (57.1%) had optimal cytoreduction and three (21.4%) had suboptimal cytoreduction. There were no cytoreduction data for the remaining patients. Eight patients (57.1%) had a BRCA1 or BRCA2 mutation, three (21.4%) were BRCA1 and BRCA2 wild type, and three had not been tested. The CA125 tumor marker commonly used to indicate the presence of ovarian tumor had a median of 268 and a mean of 1141.57 (78–6056; SD = 2184; laboratory reference value = 35U/mL). Six of fourteen patients had disease relapse before the first follow-up. Four patients had disease relapse in between the first and second follow-up. After the second follow-up, only one patient relapsed (Table 1).

Table 1. Clinic-pathological variables in patients with high grade ovarian cancer.

Variables	No.	(%)
Median age at baseline, years	45 years (29–55)	
FIGO stage		
IIIc	8	57.1
IV	3	21.4
No information	3	21.4
Treatment for platinum-sensitive recurrence		
Carboplatin and Paclitaxel	14	100
Treatment cycles		
6 cycles	9	64.3
8 cycles	2	14.3
No information	3	21.4
Recurrence site before the 1st collection		
Pelvic	4	28.6
Pelvic and mediastinum	2	14.3
Mediastinum	1	7.1
Pelvic/retroperitoneum	1	7.1
Retroperitoneum	1	7.1
No information	5	35.7
Surgery		
Optimal surgery	8	57.1
Suboptimal surgery	3	21.4
No information	3	21.4
Mutation		
BRCA1/BRCA2	8	57.1

Table 1. Cont.

Variables	No.	(%)
No mutation	3	21.4
No information	3	21.4
CA125 pre olaparib treatment median	268 (7–2183.72)	
Relapse post-olaparib treatment	6	42.9
CEN 8	9/11	81.8
CTC/mL median (baseline)	0.58 CTCs/mL (0.33–9.91)	
CTC/mL median (1° follow-up)	0.60 CTCs/mL (0.20–7.20)	
CTC/mL median (2° follow-up)	1 CTCs/mL (1.00–8.58)	

2.2. Analysis of Protein Expression

The median number of CTCs detected by ISET at baseline was 0.58 CTCs/mL (range 0.33–9.91). At the first follow-up, the median was 0.60 CTCs/mL (range 0.20–7.20), and at the second follow-up, the median was 1 CTCs/mL (range 1.00–8.58). Only 10 patients had blood collected at the second follow-up: 1 dropped out of the study due to disease recurrence in the first collection period and the other 3 were lost to follow-up.

As stated in materials and methods, a cell was considered hybrid if stained positive for CD45 with or without EpCAM or MC1-R. At baseline, 4/14 patients were positive for CD45, 3 were also positive for MC1-R and 1 for EpCAM. At the first follow-up, CD45 was found in 6/14 patients, none expressed EpCAM, and all CD45 positive cells were also positive for MC1-R. In the second follow-up, CD45 was positive in 2/10 cells and both cells were positive for MC1-R. One of these cells was positive (in another spot analyzed) for EpCAM (Figure 1).

Interestingly, MC1-R was found in cells that did not stain for CD45. At baseline, in 14 patients evaluated, 10 expressed MC1-R, although only 3 were positive for CD45. At first follow-up, 10/14 cells were positive and in the second, 5/10 were MC1-R positive. Patients who presented CTCs/mL above the median more frequently expressed MC1-R ($p = 0.07$ at baseline; $p = 0.085$ at first follow-up; $p = 0.008$ at second follow-up). Interestingly, CTCs counts in the three moments were not associated with CA125 above the median. For more information concerning clinical data and protein expression in CTCs, please see Supplementary Material, Table S1.

2.3. CEN8

The expression of chromosome 8 (CEN 8) to assess the presence of polyploidy cell fusion (hybrid cell) was tested in all patients only at baseline. Of the 14 patients, 9 had CTCs that were positive for CEN8 expression (64.3%) and 2 patients had CTCs negative for CEN8 (14.28%). We evaluated only one spot on the ISET membrane of each patient for the CEN8 analysis. Samples from 3 patients had no cells in the evaluated spot. It may be that if we had evaluated more spots, we would have found positivity in the 3 patients whose spots had no cells. The positivity rate for this probe was 81.8% (9/11).

2.4. CTCs and Recurrence-Free Survival (RFS)

As described in the methodology, we considered that a CTC showed cell fusion when it expressed CD45 alone or co-expressed with MC1-R, which is a marker used in the literature to describe cell fusion [24,25], or CD45 co-expressed with EpCAM, which is an epithelial cell marker [33]. However, we evaluated each protein (CD45, MC1R and EpCAM) independently to test its impact in RFS and OS.

Median RFS time was 8.13 months (0.625 vs. 32.86 months). CTC count was not associated with RFS. Patients with CTC/mL counts above the median (0.58 CTCs/mL; range: 0.33–9.91 CTCs/mL) at baseline had a higher number of relapse sites ($p = 0.025$). There was no correlation of any other variable with the number of sites of relapse.

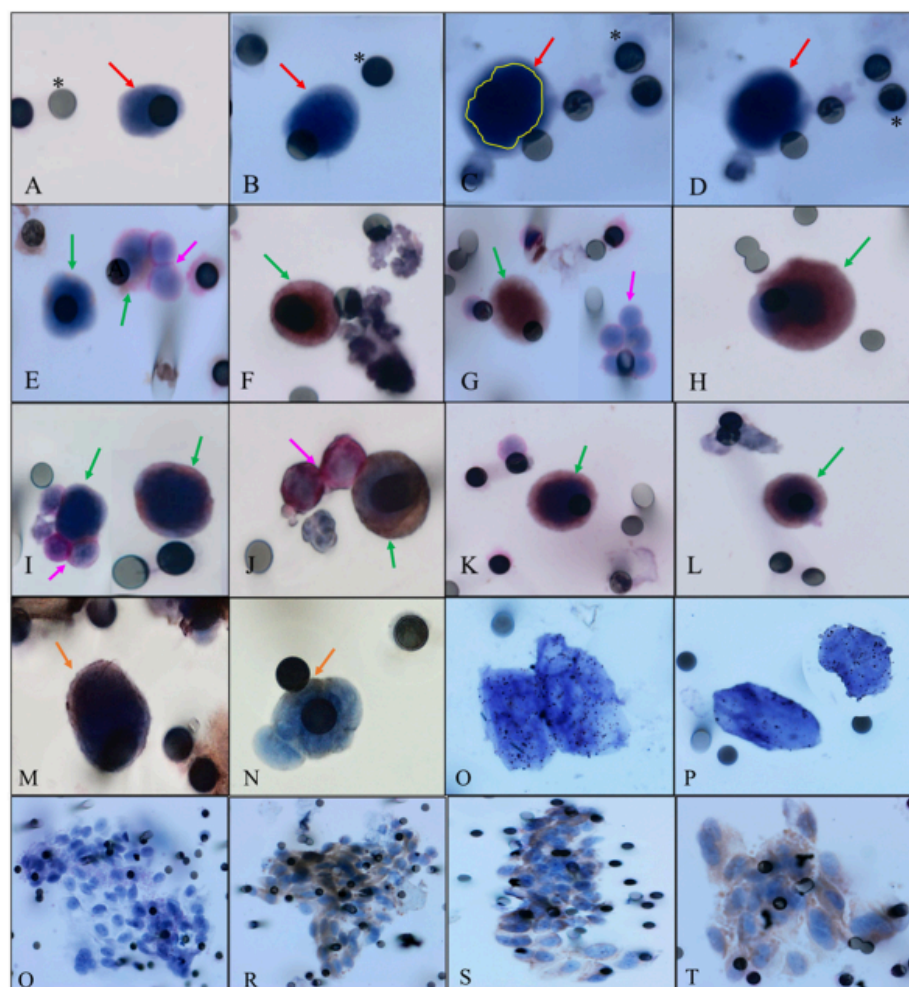


Figure 1. Representative images. Green arrows indicate hybrid cells, pink arrows represent leukocytes, red arrows represent CTCs, orange arrows indicate hybrids cells stained with CD45, yellow circle indicate cell nucleus and asterisks represent membrane pore. (A,B) CTCs without any staining, visualized with hematoxylin. (C,D) The same CTC without any staining, in (C), nuclei defined by yellow line. (E) Hybrid cells. One positive for MC1-R (brown membrane) and one in a microemboli, stained with CD45 with two leukocytes (stained with CD45, visualized by permanent red). (F) Hybrid cell positive for MC1-R (brown membrane). (G) Hybrid cell positive for EpCAM (brown membrane) and a cluster of leukocytes (stained with CD45, visualized by permanent red). (H) Hybrid cell double positive for EpCAM (brown membrane) and MC1-R (visualized by permanent red). (I) Two hybrid cells. One visualized alone double stained with EpCAM and CD45 (brown and red) and the other surrounded by three leukocytes stained with CD45 (visualized by permanent red). (J) Hybrid cell stained with MC1-R, visualized by DAB and two leukocytes (stained with CD45, visualized by permanent red). (K,L) Hybrid cells positive for MC1-R/CD45 (brown and red membrane). (M,N) Hybrids cells stained with CD45 in just one side of the cytoplasmic membrane, visualized by DAB. (O,P) CTCs positive for CEN8, indicating the presence of polyploidy. (Q) Microemboli visualized with hematoxylin. (R–T) Microemboli from patient positive for MC1-R (brown membrane). Images were taken at $\times 400$ and $\times 600$ magnification using a light microscope (Research System Microscope BX61—Olympus, Tokyo, Ja-pan) coupled to a digital camera (SC100—Olympus, Tokyo, Japan).

Patients whose CTCs presented polyploidy as evaluated by CEN8 analysis (hybrid cell) had a worse RFS (7.0 months vs. 21.21 months, $p = 0.035$) in relation to those who did not (Figure 2).

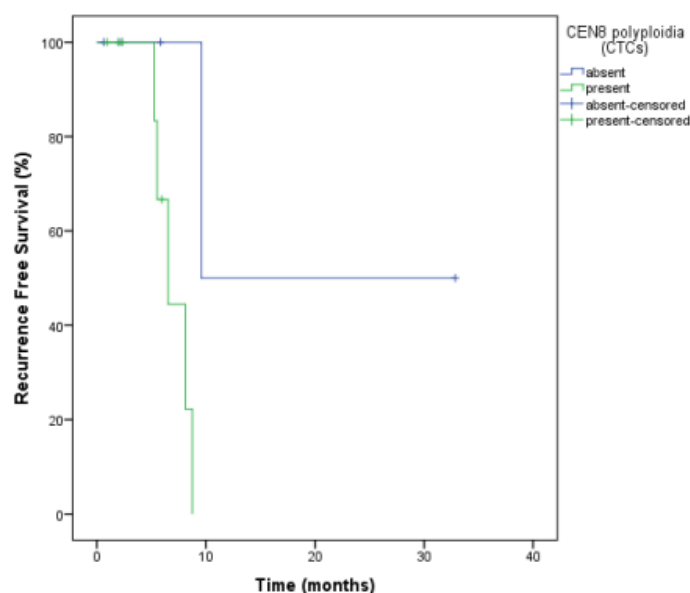


Figure 2. Recurrence-free survival analysis of ovarian cancer patients for CEN8 expression in CTCs (hybrid cells) at the baseline. The presence of polyploidy in the CEN8 showed a worse RFS (7.0 months vs. 21.21 months, $p = 0.035$) in relation to those who did not.

Notably, although CD45 was used as our fusion marker, as all proteins were evaluated together with it, CD45 expression alone was not associated with survival. On the other hand, MC1-R was associated with RFS, suggesting MC1-R as a poor prognosis protein in ovarian cancer.

At baseline, patients who expressed MC1-R had a median RFS of 14.07 vs. 6.8 compared to those who did not ($p = 0.30$). For EpCAM, the only patient who expressed this protein at baseline and at second follow-up, always together with CD45, which makes the cell doubtless hybrid, had a RFS of 5.26 months vs. 12.21 for those who did not express it, at two timepoints (baseline and second follow-up) ($p = 0.005$) (Figure 3).

The presence of a microemboli in the first follow-up and second follow-ups were associated with a shorter RFS (5.26 vs. 13.1 months; $p = 0.008$). Curiously, the only protein found in microemboli was MC1-R. Expression of MC1-R in the microemboli in the first and second follow-ups was associated with RFS. At this both moments, patients that did not express MC1-R had a median RFS of 13.1 months, while those who expressed had median RFS of 5.26 months ($p = 0.008$) (Figure 4).

2.5. CTCs and Overall Survival

Median OS was 20.4 months (0.95–35.26 months). Patients who had CTCs expressing MCR-1 had an OS of 30.31 months compared to 13.37 months for those who did not have it ($p = 0.059$). CD45 expression was not associated with OS, 20.42 months vs. 24.11 months ($p = 0.91$).

Biomarkers evaluated in samples from the first follow-up were not associated with OS. In the second follow-up, patients with MCR-1 expression presented a median OS of 20.42 months vs. 27.41 months for those who did not express it ($p = 0.7$).

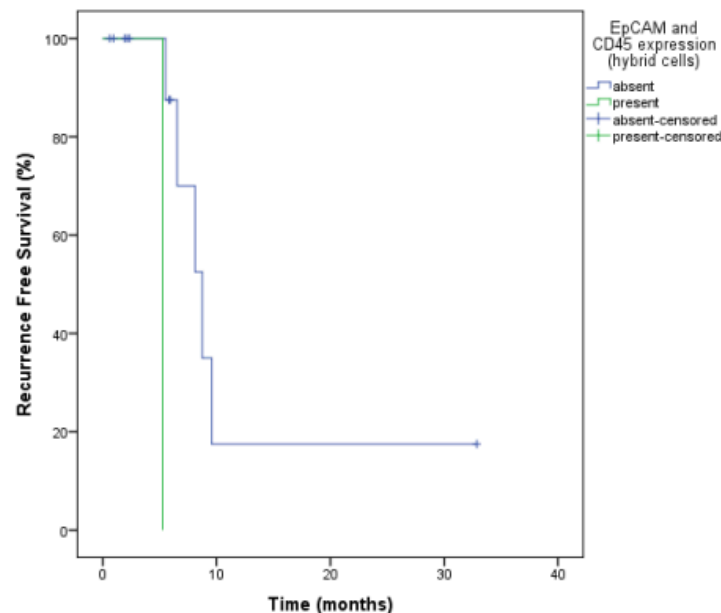


Figure 3. Recurrence-free survival analysis of ovarian cancer patients for EpCAM and CD45 expression in hybrid cells at the baseline and at second follow-up. The expression of this markers showed a worse RFS of 5.26 months vs. 12.2 ($p = 0.005$) in relation to those who did not.

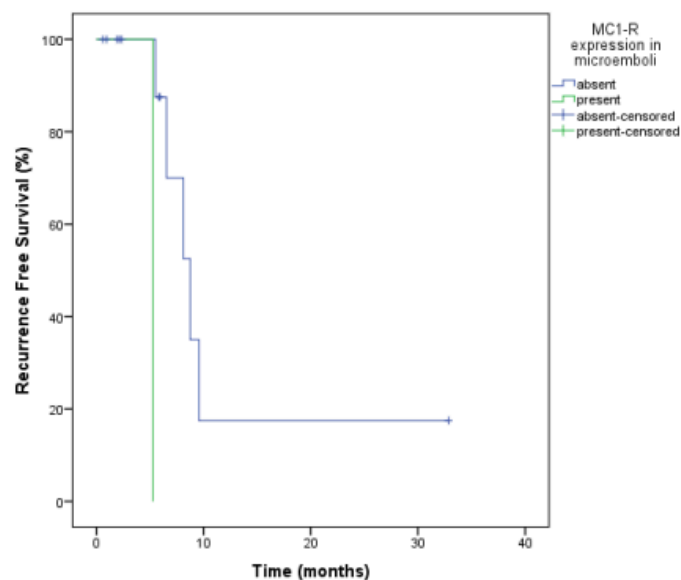


Figure 4. Recurrence-Free Survival analysis of ovarian cancer patients for MC1-R expression in CTM. The presence of a microemboli with MC1-R expression at the second follow-up was also determinant for worse RFS (5.26 vs. 13.1 months; $p = 0.008$).

2.6. CTCs Detected Using the CellSearch®

Samples from three patients with ovarian cancer attended at the Department of Surgical Oncology, Institut du cancer de Montpellier, ICM-Val d'Aurelle, Paris, France, were analyzed in parallel with the A.C Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, cohort to confirm what we found with the size-based technology "ISET". We asked researchers to look at the cells that normally are discarded by the gold standard CellSearch® system, due

to CD45 expression. Surprisingly, some cells had both: CD45 and epithelial markers, as well as morphological features of CTCs, confirming that fusion phenomenon is observed independently of the method used to detect CTCs (Figure 5).

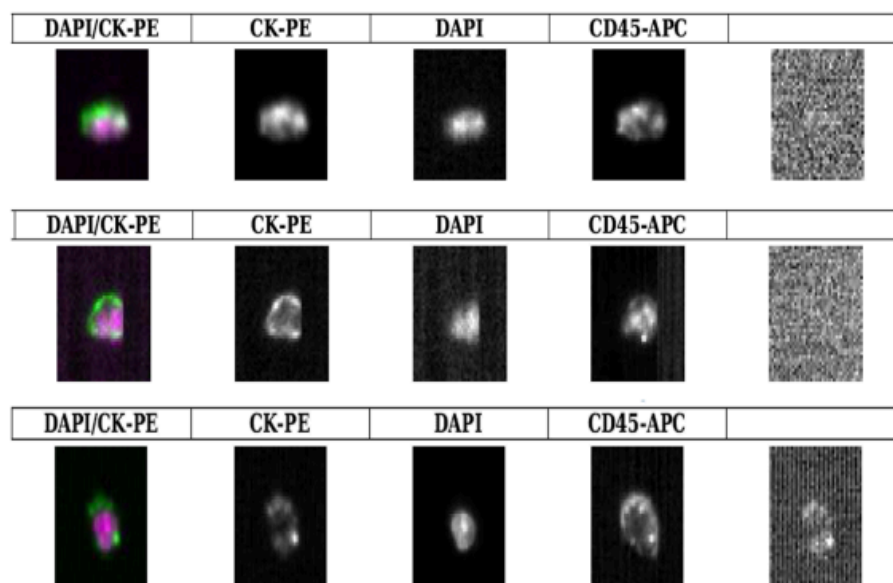


Figure 5. CTCs isolated from 3 different patients with locally advanced ovarian cancer with peritoneal carcinomatosis but no distant metastases (M_0). These photos are representative of dual stained CTCs detected using the CellSearch[®] system: dual CK⁽⁺⁾ CD45⁽⁺⁾ nucleated cells after EpCAM-based enrichment step.

3. Discussion

In the present study we could observe fused cells using two different CTC identification systems. The first is ISET[®], which isolates the CTCs by size through filtration and cytopathological analysis. Circulating tumor cells were defined as cells presenting all the following criteria: (i) irregularity of the nuclear contour; (ii) presence of a visible cytoplasm; (iii) nuclear size equal or larger than two pores (equal or larger than 16 μ m); and (iv) high nuclear-to-cytoplasmic ratio (>0.8) [9]. Leukocytes were defined following the criteria: (i) cytoplasm with azurophilic and specific granules; (ii) measure from 9 μ m to 15 μ m; positive staining for CD45 [34].

The second is the CellSearch system[®], which identifies and enumerates CTCs of epithelial origin by magnetic beads labeled with EpCAM.

The high detection rate of CTCs in the present patient population and the correlation of baseline CTC counts with the number of relapse sites suggest that ISET can be used to identify, quantify and characterize CTCs and hybrid cells in patients with high grade serous ovarian cancer. Polyploidy was also observed in the isolated cells and correlated with poor RFS. MC1-R, a protein used to identify fusion events in melanoma, was found in CTCs and CTM and shows promise as a prognostic marker in ovarian cancer.

Our study shows that the ISET method can be used to identify not only CTCs but also hybrid cells, and that, according to other authors [35,36], it can be better than label-dependent methods to observe CTCs. Some studies have already demonstrated the effectiveness and specificity of cytopathological analysis of CTCs made after ISET isolation. One study with renal tumors showed that 104 of 125 CTCs identified by cytopathological analysis expressed the identical VHL mutation as detected in the primary tumor [35]. Another study, also from the same group, showed that the detection of CTCs from a prostate tumor, analyzed by cytopathology without any other molecular characterization, was capable

of identifying patients at higher risk of recurrence after prostatectomy. According to this study, the cytopathology specificity was 100%, while the sensitivity was 72% [36].

Searles et al. hypothesized that cell fusion might cause chromosomal instability. They used a Cre-loxP system to observe the molecular exchange of information between cancerous and non-cancerous cells and postulated that cells that express Cre may induce loxP recombination in normal reporter cells. Surprisingly, all marked cells exhibited hyperploidy and resulted from a cell fusion event [37]. Thus, we decided to analyze the presence of chromosomal instability in CTCs, since ovarian cancer is characterized by copy number and structural variations [38]. Recent studies have shown that chromosome 8 triploid and tetraploid CTCs are resistant to intrinsic drugs in gastric cancer, nasopharyngeal carcinoma, and rectal cancer [39]. Chromosome 8 aneuploidy is common in several neoplastic diseases. According to a study by Zhang et al., CTC triploids could be detected in most patients with newly diagnosed nasopharyngeal carcinoma, but the number of polyploid cells was significantly higher in patients with recurrence and metastasis. They also postulated that the copy number of chromosome 8 was closely related to the effectiveness of chemotherapy and resistance to treatment [40]. Chromosome aneuploidy is known to occur in several tumor types, and many studies have shown that patients with aneuploid tumor cells had poorer outcomes [41]. Li et al. demonstrated that triploid CTCs were associated with intrinsic resistance to drugs, while tetraploid and multiploid CTCs were related to acquired resistance to paclitaxel or cisplatin in gastric cancer. Clinical studies conducted in patients with gastric cancer indicated that rare cells with trisomy 8 showed intrinsic resistance to cisplatin, while multiploid cells demonstrated acquired resistance [42]. Here, we showed that CEN8 was related to poor RFS in ovarian cancer ($p = 0.035$). Maybe, in this type of tumor, CEN8 can be a marker of fusion event, as it is believed that hybrid cells are related to poor outcomes, but further studies are necessary to prove this.

MC1-R is thought to play a role in melanoma progression through the activation of MET, a proto-oncogene and key regulator of metastasis in many cancers. Clawson et al., working with cultured, enriched CTCs from melanoma patients, observed large CTCs (generally 20–30 μm) in early-stage patients. The isolated CTCs showed aberrant expression of melanocytic differentiation markers, as well as pan-cytokeratin. Two subpopulations were observed based on immunofluorescence staining: one subpopulation of cells stained for pan-cytokeratin and CD45 (50%) (hybrid cells) and the other stained only for pan-cytokeratin (50%) [43]. Likewise, Itakura et al. described two subgroups of melanoma-related cells in sentinel lymph nodes, analogous to the two subpopulations described by Clawson: one composed of cells consistent with immature melanocytes and the other composed of cells consistent with immature melanocytes that also expressed leukocyte/macrophage markers (fusion event) [44].

Here, we describe for the first time the expression of MC1-R in CTCs from ovarian cancer patients and its correlation to poor RFS when expressed in CTM at the first and second follow-ups. Because MC1-R was observed in CTCs with CD45 expression, it may be useful as a marker of hybrid cells in ovarian cancer as it is in melanoma [45]. As was demonstrated in other tumor types [46–48], CTC clusters were also related to poor outcome in ovarian cancer.

The fusion phenomenon is not a novel discovery, but its finding in CTCs of patients with ovarian cancer is unique. To the best of our knowledge, this is the first study describing the cell fusion phenomenon observed under light microscopy, allowing the visualization of intact cells and their cytopathological characteristics. As stated in materials and methods, we consider a cell as hybrid when it has all CTC features together with CD45 expression. In addition, we also observed, in many cases, CD45 co-expressed with other epithelial (EpCAM) or fusion marker (MC1-R). Recently, Gast et al. used murine models to investigate cell fusion and demonstrated that leukocyte–cancer cell fusion produces hybrid cells that express the genetic and phenotypic characteristics of both maternal cells [49,50]. Other studies describe similar findings for macrophage markers, such as CD68, commonly expressed by tumor cells in histopathological sections [51–54]. Pawelek et al. proposed that

the epithelial–mesenchymal transition in cancer could be the result of fusion between tumor and myeloid cells. Because macrophages are of mesenchymal origin, tumor–myeloid fusion could contribute to the aneuploidy and heterogeneity frequently observed in tumors. An inflammatory tumor microenvironment may also stimulate fusion between bone-marrow-derived cells and tumor cells. Fusion cells can also result from tumor cell phagocytosis by macrophages [21]. In the present study, it was noted that in some cells, CD45 expression occurred only on one side of the cell membrane, suggesting a fusion between two cells from different origins. Another hypothesis is that leukocytes send exosomes to primary tumors and to CTCs, which could explain why pieces of CD45-expressing membrane were observed in CTCs. Due to the important role of the immune system in the elimination of aberrant cells, escape from immune control is crucial for cancer growth and metastasis. Curiously, CD45 expression in CTCs was also found in cells that were automatically deleted by the CellSearch® system, because cells expressing this marker are considered leukocytes regardless of their cytopathological features. Perhaps the sorting methods for CTCs need to be updated in order to include complex cells in disease analysis.

Although the present study used only a small sample size, it presents two major findings: the presence of hybrid cells in high grade ovarian cancer, as assessed by two different methods, and MC1-R as a prognostic marker for ovarian cancer. Additional studies, maybe multicenter, are needed to more thoroughly evaluate the function of MC1-R in ovarian cancer, as well as its role as fusion marker. Many important questions remain to be answered about the role of cell fusion in cancer with regard to its frequency, timing, causation and interaction with the immune system [18]. Therefore, cell fusion between tumor and immune cells offers a novel mechanism by which neoplastic cells gain phenotypic diversity, increasing opportunities for highly tuned subclones to overcome selection pressure and lead to tumor progression.

4. Materials and Methods

4.1. Patient Population and Study Design

This was a single-center, prospective, longitudinal study performed at the A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, of patients with high-grade serous ovarian cancer monitored from November 2018 to May 2022. We included patients presenting platinum-sensitive recurrence, irrespective of *BRCA1* or *BRCA2* mutation. Patients were treated with standard of care treatment: a combination of platinum-based chemotherapy followed by PARP inhibitor maintenance (olaparib).

Three serial blood samples were collected. The first was collected at the time of patient enrollment (baseline), before starting treatment with PARPi (collection 1, CTC1). The second sample was taken 30 days after starting treatment with PARPi (first follow-up, CTC2), and the third sample was taken three months after starting treatment with PARPi (second follow-up, CTC3). Venous blood was collected from the antecubital vein in EDTA tubes, and the samples were stored at room temperature, with constant homogenization (in electric homogenizer) to prevent blood clotting, for a maximum of 6 h before being processed by the ISET system (Rarecells Diagnostics, Paris, France).

In addition, we included samples from locally advanced ovarian cancer with peritoneal carcinomatosis but no distant metastases, analyzed using the CellSearch system at the Department of Surgical Oncology, Institut du Cancer de Montpellier, ICM-Val d'Aurelle, France, and analyzed using CellSearch System (Menarini Silicon Biosystems, Huntingdon Valley, PA, USA), in parallel with the AC Camargo cohort.

4.2. Ethics

This project was approved by the ethics and research committee of A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil (approval number 2623/18). Written informed consent was obtained from all participants before their entrance into the study. In addition, patients that were recruited at the Institut du Cancer de Montpellier were recruited under the bioethics approval 'CPP Sud Méditerranée III' (reference number 2016.09.06).

4.3. Detection of CTCs and the Cell Fusion Phenotype

4.3.1. ISET Assay

The ISET[®] system (Isolation by Size of Tumor cells, Rarecells, Paris, France) was used to isolate and analyze CTCs. Blood was drawn into EDTA tubes (BD Vacutainer[®], BD, Belo Horizonte, MG, Brazil) with immediate gentle agitation. The sample was processed on the ISET platform according to manufacturer instructions. Briefly, 6 mL of whole blood were diluted up to 60 mL with a buffer containing 0.02% formaldehyde, incubated for 10 min at room temperature, and filtered through a membrane with 8 µm pore size. The filtration pressure was optimized to −10 kPa to preserve cell integrity. The membrane was then washed once with phosphate-buffered saline. After processing, filters were dried, wrapped in an aluminum sheet and stored at −20 °C until use.

4.3.2. Immunocytochemistry

The module filtration had a membrane of 10 spots, making it possible to process blood samples of 10 mL. We analyzed 6 spots for each patient; all spots were analyzed for CD45 staining with another marker by dual color staining. After filtration, membranes were washed with PBS, disassembled from the filtration module, allowed to air-dry overnight and stored at −20 °C until staining. The spots membranes were submitted to dual color immunocytochemistry (ICC) (DAB+/Permanent Red; Dako[™], Santa Clara, CA, USA) on a 24-well plate. Antigen retrieval was then performed using Antigen Retrieval Solution (Dako[™]). Cells were hydrated with tris-buffered saline (TBS) 1X for 20 min and permeabilized with TBS + Triton X-100 for 5 min, and endogenous peroxides were blocked with 3% hydrogen peroxide in the dark for 15 min. The spots were incubated with antibodies diluted in TBS 10% fetal calf serum. To amplify the antibody signal, the spots were incubated with Envision G/2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (Dako[™]) followed by 10 min of incubation with DAB+/Permanent Red (Dako[™]). The spots were then washed with PBS between the steps. Cells were stained with hematoxylin for visualization of nuclei and cytoplasm and analyzed by light microscope (BX61-Olympus, Tokyo, Japan). To distinguish CTCs and cell fusion from white blood cells, we used anti-CD45 antibody. Circulating tumor cells (CTCs) were characterized based on the following cytopathological criteria: negative staining for CD45, nucleus size ≥ 12 µm, hyperchromatic and irregular nucleus, visible presence of cytoplasm and a high nucleus–cytoplasm ratio [9].

The classic definition of a CTC in cancer is a circulating cell that expresses a tumor antigen (usually EPCAM or cytokeratin) and does not express the CD45 pan-leukocyte antigen [55]. Leukocytes, including macrophages, normally express CD45. Therefore leukocyte/macrophage–CTC fusion cells must also express CD45 [56,57]. In our study, by using ISET, we identified the presence of CTCs based on the morphologic features observed through cytopathology rather than the expression of epithelial markers. It corroborates with studies developed by Patrizia Paterlini-Bréchet's group, concerning kidney and prostate tumors, where they analyzed CTCs by the same method, by cytopathology characteristics, with 100% efficiency and 70% sensitivity. In addition, as far as we know, we are the first to demonstrate, together with CTCs, the identification and characterization of hybrid cells using the ISET method [35,36]. Thus, differently from the literature, in our study, CTC was considered to be a hybrid cell if it had the morphologic features of an epithelial cell and expressed CD45 alone or with MC1-R [24,25,31], or EpCAM [33]. The following antibodies were used: CD45 1:300 (Abcam: ab10559—Lot. GR3389366-1); MC1-R 1:700 (Abcam, Waltham, MA, USA): ab236734, lot GR3241231-10) and EpCAM 1:300 (Sigma, São Paulo, Brazil): HPA026761, lot D119365). Negative and positive controls were included in each ICC staining. For positive controls, we used cell lines A549 and MCF7 spiked in healthy blood, which, according to The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/> (accessed on 10 September 2022)) express MC1-R and EpCAM, respectively. For negative controls we used cell lines SK-BR-3 and U-87-MG spiked in healthy blood, which, according to The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/> (accessed on 10 September 2022)) do not express MC1-R and EpCAM, respectively. The cell lines were acquired from ATCC[®]

HTB-43™. For CD45, MC1-R and EpCAM expression analysis, cells were classified according to staining. No staining was considered negative, and any staining was classified as positive (Supplementary Figure S1).

4.3.3. Chromogenic In Situ Hybridization

To confirm if the circulating CD45⁺/MC1-R⁺ or CD45⁺/EpCAM⁺ cells were hybrid cells, we performed qualitative detection of human chromosome 8 alpha satellites (CEN8) by chromogenic in situ hybridization. The presence of polyploidy was only assessed in the baseline collection from each patient. We used ZytoDot (REF: C-3016-400) stains on frozen ISET membranes. The membranes were hydrated with TBS 1X for 5 min at room temperature (RT) and then with 1% formaldehyde for 5 min at RT. Subsequent washes between steps were performed with distilled water. Membranes were incubated in hydrogen peroxide for 10 min at RT and in the dark. After washing with distilled water, membranes were incubated with cytology pepsin (ZytoVision, Bremerhaven, Germany) for 5 min at RT. Membranes were then washed in 70%, 90% and 100% ethanol for one minute each. After drying, the membranes were incubated with a CEN8 (10 µL) probe in the hybridizer at 75 °C (wet) for 5 min and then incubated overnight at 37 °C. After this step, washes were performed with wash buffer SSC for 5 min at RT. The membrane was incubated with wash buffer SSC at 80 °C for 5 min. After washing, the membranes were incubated with Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) for 15 min at 37 °C (wet) in the hybridizer. After washing, HRP/AP-POLYMER-MIX (AB13) was applied, followed by AP-Red Solution (1–2 drops) at RT. The membrane was counterstained with 50% hematoxylin for 2 min at RT after washing. The slides were adhered with aqueous mounting medium and coverslipped (DAKO). The reading was performed under a bright field microscope. For CEN8 expression analysis, cells were classified according to the presence of expression. No expression was considered negative and any expression was classified as positive (Supplementary Figure S1). Notably, the spots analyzed by CISH were different from the spots analyzed by immunocytochemistry since the polycarbonate membrane would not resist the high temperatures used in CISH staining.

4.3.4. The CellSearch® System (Menarini Biosystems)

Blood samples were collected in CellSave tubes (Veridex, LLC, Huntingdon Valley, PA, USA) and processed within 96 h after blood collection. A total of 7.5 mL of blood was subjected to CTC enumeration using the CellSearch Epithelial Cell Kit. This procedure enriches the sample for cells expressing EpCAM using magnetic beads coated with anti-EpCAM antibodies and labels the cells with the dye fluorescent nucleic acid 4,2-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride. Fluorescent monoclonal antibodies specific to leukocytes (CD45- alophycocyan) and epithelial cells (cytokeratin 8,18,19-phycoerythrin) are used to distinguish epithelial cells from leukocytes. The identification and enumeration of CTCs were performed using the CellSpotter Analyzer(Inc. DBA Sciotech, Newtown Square, PA, USA), a fluorescence microscopy system that allows for the digital reconstruction of cellular images. CTCs were defined as nucleated cells without CD45 and expressing cytokeratin. In our current study, we also selected EpCAM⁺CK⁺DAPI⁺CD45⁺ cells.

4.4. Statistical Analysis

A descriptive analysis (absolute data and frequency) was performed for all clinical-pathological variables. Continuous variables were categorized to evaluate the differences between the two groups: those who expressed in CTCs the markers MC1-R, CD45, EPCAM and CEN8 (hybrid cells) and those who did not. CTC count, cancer antigen 125 (CA125) levels, and age were dichotomized using the median value as a cut-off. χ^2 or Fisher's exact test was used to analyze categorical variables. Survival curves were plotted using the Kaplan–Meier method, and the difference between them was analyzed by the log rank test. RFS was defined as the time from baseline sample to disease recurrence or death by any cause. OS was defined as the time from baseline sample to death by any cause. All

statistical analyses were performed using SPSS for Windows, version 15. The *p*-values were considered significant when ≤ 0.05 .

5. Conclusions

In short, the present study indicated the association of polyploid/hybrid CTCs with RFS, especially for cells expressing MC1-R. More research is needed to elucidate the underlying mechanism, to better understand the biology of the metastatic cascade and how CTCs can escape the immune system. The main objective of future studies should be to determine the frequency of fusion cells in larger cohorts of human cancers in order to identify reliable markers and their role in malignant transformation and treatment resistance [58,59]. Although this study comprised only a small cohort, it opens new perspectives for the use of CTCs to monitor fusion events and treatment resistance in ovarian cancer. The study is preliminary and innovative, highlighting a new direction in the study of cancer and its interaction with cells of the immune system, in addition to the relationship between cell fusions and cancer progression.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232314687/s1>.

Author Contributions: A.P.C.R.: data analysis and interpretation, collection and/or assembly of data, manuscript writing. A.P.G.G.: conception/design, provision of study material or patients, collection and/or assembly of data. A.C.B.: data analysis and interpretation. B.C.T.C.P.F.: data analysis and interpretation. M.S.T.: provision of study material or patients. E.A.A.: data analysis and interpretation. J.A.T.: data analysis and interpretation. D.N.N.: data analysis and interpretation, manuscript writing. B.T.: provision of study material or patients. V.C.C.d.L.: data analysis and interpretation. M.F.F.: data analysis and interpretation. P.-E.C.: data analysis and interpretation. A.A.B.A.d.C.: provision of study material or patients, collection and/or assembly of data, manuscript writing. C.A.-P.: data analysis and interpretation, manuscript writing. L.T.D.C.: conception/design, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Donation from Faber-Castell (Brazil).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of A.C Camargo Cancer Center (protocol code 2623/18C; date of approval 21 January 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data supporting reported results can be found of https://dados.accamargo.org.br/redcap/?__messenger=open (last accessed on 20 September 2022).

Acknowledgments: We thank Faber-Castell for the financial support of this study. C.A-P is supported by the National Institute of Cancer (INCa, <http://www.e-cancer.fr>, accessed on 20 September 2022) and the SIRIC Montpellier Cancer Grant INCa Inserm DGOS 12533.

Conflicts of Interest: C.A.-P. received honoraria from Menarini. The remaining authors declare no conflict of interest relevant to the manuscript.

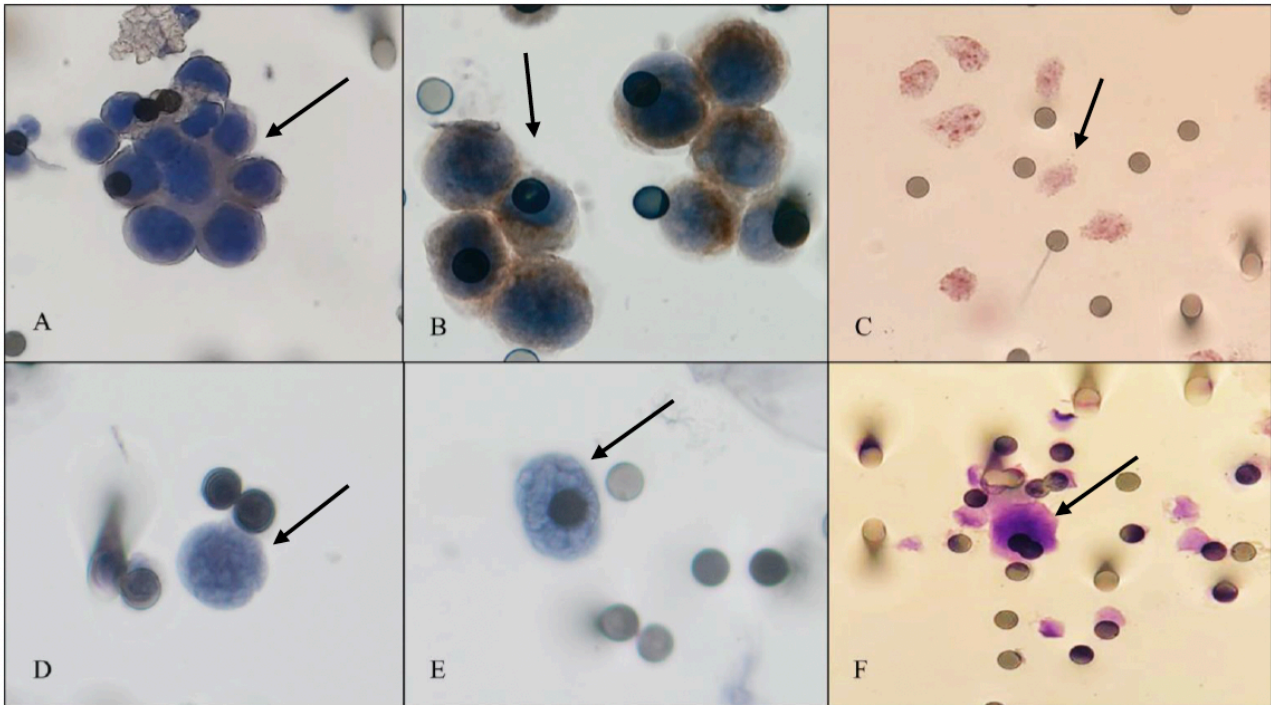
References

1. Bray, F.; Msc, M.L.; Weiderpass, E.; Soerjomataram, I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer* **2021**, *127*, 3029–3030. [CrossRef] [PubMed]
2. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [CrossRef] [PubMed]
3. Instituto Nacional de Câncer-INCA. INCA. Published 2022. Available online: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-ovario> (accessed on 20 September 2022).
4. Maltoni, R.; Gallerani, G.; Fici, P.; Rocca, A.; Fabbri, F. CTCs in early breast cancer: A path worth taking. *Cancer Lett.* **2016**, *376*, 205–210. [CrossRef] [PubMed]

5. Pantel, K.; Alix-Panabières, C. Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 398–406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Cristofanilli, M.; Budd, G.T.; Ellis, M.J.; Stopeck, A.; Matera, J.; Miller, M.C.; Reuben, J.M.; Doyle, G.V.; Allard, W.J.; Terstappen, L.W.M.M.; et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 781–791. [\[CrossRef\]](#)
7. Cohen, S.J.A.; Punt, C.J.; Iannotti, N.; Saidman, B.H.; Sabbath, K.D.; Gabrail, N.Y.; Picus, J.; Morse, M.; Mitchell, E.; Miller, M.C.; et al. Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3213–3221. [\[CrossRef\]](#)
8. De Bono, J.S.; Scher, H.I.; Montgomery, R.B.; Parker, C.; Miller, M.C.; Tissing, H.; Doyle, G.V.; Terstappen, L.W.W.M.; Pienta, K.J.; Raghavan, D. Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6302–6309. [\[CrossRef\]](#)
9. Krebs, M.G.; Hou, J.-M.; Sloane, R.; Lancashire, L.; Priest, L.; Nonaka, D.; Ward, T.H.; Backen, A.; Clack, G.; Hughes, A.; et al. Analysis of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Using Epithelial Marker-Dependent and -Independent Approaches. *J. Thorac. Oncol.* **2012**, *7*, 306–315. [\[CrossRef\]](#)
10. Williams, E.D.; Gao, D.; Redfern, A.; Thompson, E.W. Controversies around epithelial–mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nat. Cancer* **2019**, *19*, 716–732. [\[CrossRef\]](#)
11. Szczerba, B.M.; Castro-Giner, F.; Vetter, M.; Krol, I.; Gkoutela, S.; Landin, J.; Scheidmann, M.C.; Donato, C.; Scherrer, R.; Singer, J.; et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature* **2019**, *566*, 553–557. [\[CrossRef\]](#)
12. Yu, M. Metastasis Stemming from Circulating Tumor Cell Clusters. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 275–276. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Bobek, V.; Gurlich, R.; Eliasova, P.; Kolostova, K. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: Enrichment and cultivation. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 17163–17170. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Clawson, G. The Fate of Fusions. *Cells* **2018**, *8*, 13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Condeelis, J.; Pollard, J.W. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cell* **2006**, *124*, 263–266. [\[CrossRef\]](#)
16. Shemer, G.; Podbilewicz, B. The story of cell fusion: Big lessons from little worms. *BioEssays* **2003**, *25*, 672–682. [\[CrossRef\]](#)
17. Platt, J.L.; Cascalho, M. Cell Fusion in Malignancy: A Cause or Consequence? A Provocateur or Cure? *Cells* **2019**, *8*, 587. [\[CrossRef\]](#)
18. Halaban, R.; Nordlund, J.; Francke, U.; Moellmann, G.; Eisenstadt, J.M. Supermelanotic hybrids derived from mouse melanomas and normal mouse cells. *Somat. Cell Mol. Genet.* **1980**, *6*, 29–44. [\[CrossRef\]](#)
19. Lindström, A.; Midtbö, K.; Arnesson, L.-G.; Garvin, S.; Shabo, I. Fusion between M2-macrophages and cancer cells results in a subpopulation of radioresistant cells with enhanced DNA-repair capacity. *Oncotarget* **2017**, *8*, 51370–51386. [\[CrossRef\]](#)
20. Hernandez, L.D.; Hoffman, L.R.; Wolfsberg, T.G.; White, J.M. VIRUS-CELL AND CELL-CELL FUSION. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 627–661. [\[CrossRef\]](#)
21. Lu, X.; Kang, Y. Cell Fusion as a Hidden Force in Tumor Progression. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8536–8539. [\[CrossRef\]](#)
22. Jiang, E.; Yan, T.; Xu, Z.; Shang, Z. Tumor Microenvironment and Cell Fusion. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 1–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Bastida-Ruiz, D.; Van Hoesen, K.; Cohen, M. The Dark Side of Cell Fusion. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 638. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Brzoska, T.; Luger, T.A.; Maaser, C.; Abels, C.; Böhm, M. α -Melanocyte-Stimulating Hormone and Related Tripeptides: Biochemistry, Antiinflammatory and Protective Effects in Vitro and in Vivo, and Future Perspectives for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Endocr. Rev.* **2008**, *29*, 581–602. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Moscovitz, A.E.; Asif, H.; Lindenmaier, L.B.; Calzadilla, A.; Zhang, C.; Mirsaeidi, M. The Importance of Melanocortin Receptors and Their Agonists in Pulmonary Disease. *Front. Med.* **2019**, *6*, 145. [\[CrossRef\]](#)
26. Chakraborty, A.K.; Funasaka, Y.; Slominski, A.; Bolognia, J.; Sodi, S.; Ichihashi, M.; Pawelek, J.M. UV Light and MSH Receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *885*, 100–116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Laberge, G.S.; Duvall, E.; Grasmick, Z.; Haedicke, K.; Pawelek, J. A Melanoma Lymph Node Metastasis with a Donor-Patient Hybrid Genome following Bone Marrow Transplantation: A Second Case of Leucocyte-Tumor Cell Hybridization in Cancer Metastasis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0168581. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Losick, V.P.; Fox, D.T.; Spradling, A.C. Polyploidization and Cell Fusion Contribute to Wound Healing in the Adult *Drosophila* Epithelium. *Curr. Biol.* **2013**, *23*, 2224–2232. [\[CrossRef\]](#)
29. Tamori, Y.; Deng, W.-M. Tissue Repair through Cell Competition and Compensatory Cellular Hypertrophy in Postmitotic Epithelia. *Dev. Cell* **2013**, *25*, 350–363. [\[CrossRef\]](#)
30. Liu, J. The dualistic origin of human tumors. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, *53*, 1–16. [\[CrossRef\]](#)
31. Rheinländer, A.; Schraven, B.; Bommhardt, U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol. Lett.* **2018**, *196*, 22–32. [\[CrossRef\]](#)
32. Keller, L.; Werner, S.; Pantel, K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress* **2019**, *3*, 165–180. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Huang, L.; Yang, Y.; Yang, F.; Liu, S.; Zhu, Z.; Lei, Z.; Guo, J. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *42*, 1771–1785. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Carneiro, J. *Histologia Básica*, 12th ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Brazil, 2013.

35. Broncy, L.; Ben Njima, B.; Méjean, A.; Bérout, C.; Ben Romdhane, K.; Ilie, M.; Hofman, V.; Muret, J.; Hofman, P.; Bouhamed, H.C.; et al. Single-cell genetic analysis validates cytopathological identification of circulating cancer cells in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 20058–20074. [\[CrossRef\]](#)
36. Castillo, L.N.G.; Mejean, A.; Vielh, P.; Anract, J.; Decina, A.; Nalpas, B.; Benali-Furet, N.; Desitter, I.; Paterlini-Bréchot, P. Predictive Value of Circulating Tumor Cells Detected by ISET® in Patients with Non-Metastatic Prostate Cancer Undergoing Radical Prostatectomy. *Life* **2022**, *12*, 165. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Searles, S.C.; Santosa, E.K.; Bui, J.D. Cell-cell fusion as a mechanism of DNA exchange in cancer. *Oncotarget* **2018**, *9*, 6156–6173. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Lengauer, C.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **1998**, *396*, 643–649. [\[CrossRef\]](#)
39. Ye, Z.; Ding, Y.; Chen, Z.; Li, Z.; Ma, S.; Xu, Z.; Cheng, L.; Wang, X.; Zhang, X.; Ding, N.; et al. Detecting and phenotyping of aneuploid circulating tumor cells in patients with various malignancies. *Cancer Biol. Ther.* **2019**, *20*, 546–551. [\[CrossRef\]](#)
40. Zhang, J.; Shi, H.; Jiang, T.; Liu, Z.; Lin, P.P.; Chen, N. Circulating tumor cells with karyotyping as a novel biomarker for diagnosis and treatment of nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 1133. [\[CrossRef\]](#)
41. Yu, S.; Fiedler, S.; Stegner, A.; Graf, W. Genomic profile of copy number variants on the short arm of human chromosome 8. *Eur. J. Hum. Genet.* **2010**, *18*, 1114–1120. [\[CrossRef\]](#)
42. Li, Y.; Zhang, X.; Ge, S.; Gao, J.; Gong, J.; Lu, M.; Zhang, Q.; Cao, Y.; Wang, D.D.; Lin, P.P.; et al. Clinical significance of phenotyping and karyotyping of circulating tumor cells in patients with advanced gastric cancer. *Oncotarget* **2014**, *5*, 6594–6602. [\[CrossRef\]](#)
43. Clawson, G.A.; Kimchi, E.; Patrick, S.D.; Xin, P.; Harouaka, R.; Zheng, S.; Berg, A.; Schell, T.; Staveley-O'Carroll, K.F.; Neves, R.I.; et al. Circulating Tumor Cells in Melanoma Patients. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41052. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Itakura, E.; Huang, R.-R.; Wen, D.-R.; Cochran, A.J. “Stealth” Melanoma Cells in Histology-negative Sentinel Lymph Nodes. *Am. J. Surg. Pathol.* **2011**, *35*, 1657–1665. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Pawelek, J.M.; Chakraborty, A.K. Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: A unifying explanation for metastasis. *Nat. Cancer* **2008**, *8*, 377–386. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Zhang, D.; Zhao, L.; Zhou, P.; Ma, H.; Huang, F.; Jin, M.; Dai, X.; Zheng, X.; Huang, S.; Zhang, T. Circulating tumor microemboli (CTM) and vimentin+ circulating tumor cells (CTCs) detected by a size-based platform predict worse prognosis in advanced colorectal cancer patients during chemotherapy. *Cancer Cell Int.* **2017**, *17*, 6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Chu, H.-Y.; Yang, C.-Y.; Yeh, P.-H.; Hsu, C.-J.; Chang, L.-W.; Chan, W.-J.; Lin, C.-P.; Lyu, Y.-Y.; Wu, W.-C.; Lee, C.-W.; et al. Highly Correlated Recurrence Prognosis in Patients with Metastatic Colorectal Cancer by Synergistic Consideration of Circulating Tumor Cells/Microemboli and Tumor Markers CEA/CA19-9. *Cells* **2021**, *10*, 1149. [\[CrossRef\]](#)
48. de Oliveira, T.B.; Braun, A.C.; Nicolau, U.R.; Abdallah, E.A.; Alves, V.D.S.; de Jesus, V.H.F.; Calsavara, V.F.; Kowalski, L.P.; Chinen, L.T.D. Prognostic impact and potential predictive role of baseline circulating tumor cells in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **2021**, *121*, 105480. [\[CrossRef\]](#)
49. Gast, C.E.; Silk, A.D.; Zarour, L.; Riegler, L.; Burkhart, J.G.; Gustafson, K.T.; Parappilly, M.S.; Roh-Johnson, M.; Goodman, J.R.; Olson, B.; et al. Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, eaat7828. [\[CrossRef\]](#)
50. Chakraborty, A.K.; Sodi, S.; Rachkovsky, M.; Kolesnikova, N.; Platt, J.T.; Bolognia, J.L.; Pawelek, J.M. A spontaneous murine melanoma lung metastasis comprised of host x tumor hybrids. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2512–2519. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811133> (accessed on 22 August 2022).
51. Pawelek, J.M. Tumour cell hybridization and metastasis revisited. *Melanoma Res.* **2000**, *10*, 507–514. [\[CrossRef\]](#)
52. Kemény, L.V.; Kurgis, Z.; Buknicz, T.; Groma, G.; Jakab, Á.; Zänker, K.; Dittmar, T.; Németh, I.B. Melanoma Cells Can Adopt the Phenotype of Stromal Fibroblasts and Macrophages by Spontaneous Cell Fusion in Vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 826. [\[CrossRef\]](#)
53. Adams, D.L.; Martin, S.S.; Alpaugh, R.K.; Charpentier, M.; Tsai, S.; Bergan, R.C.; Ogden, I.M.; Catalona, W.; Chumsri, S.; Tang, C.-M.; et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 3514–3519. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Gironda, D.J.; Adams, D.L.; He, J.; Xu, T.; Gao, H.; Qiao, Y.; Komaki, R.; Reuben, J.M.; Liao, Z.; Blum-Murphy, M.; et al. Cancer associated macrophage-like cells and prognosis of esophageal cancer after chemoradiation therapy. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 413. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Racila, E.; Euhus, D.; Weiss, A.J.; Rao, C.; McConnell, J.; Terstappen, L.W.M.M.; Uhr, J.W. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4589–4594. [\[CrossRef\]](#)
56. Sutton, T.L.; Walker, B.S.; Wong, M.H. Circulating Hybrid Cells Join the Fray of Circulating Cellular Biomarkers. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *8*, 595–607. [\[CrossRef\]](#)
57. Pawelek, J.M.; Chakraborty, A.K. Chapter 10 The Cancer Cell–Leukocyte Fusion Theory of Metastasis. *Adv. Cancer Res.* **2008**, *101*, 397–444. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Shabo, I.; Svanvik, J.; Lindström, A.; Lechertier, T.; Trabulo, S.; Hulit, J.; Sparey, T.; Pawelek, J. Roles of cell fusion, hybridization and polyploid cell formation in cancer metastasis. *World J. Clin. Oncol.* **2020**, *11*, 121–135. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Kaigorodova, E.V.; Kozik, A.V.; Zavaruev, I.S.; Grishchenko, M.Y. Hybrid/Atypical Forms of Circulating Tumor Cells: Current State of the Art. *Biochemistry* **2022**, *87*, 380–390. [\[CrossRef\]](#)

Supplementary Materials



Supplementary Figure S1. Pictures from healthy blood spiked with cell lines for antibodies control. (A) Positive Control performed with healthy blood spiked with cell line A549 strain CCL-185 (ATCC®), positive for MC1-R (visualized with DAB). (B) Positive Control. Healthy blood spiked with cell line MCF7 strain HTB-22 (ATCC®), positive for EpCAM (visualized with DAB). (C) Positive Control. Healthy blood spiked with cell line A-549 strain CCL-185 (ATCC®), positive for CEN8. (D) Example of negative control counterstained with hematoxylin and isolated with healthy blood spiked with cell line SK-BR-3 HTB-30 strain, know to not express MC1-R protein. (E) Example of negative control. Healthy blood spiked with cell line U-87-MG HTB-14 strain, know to not express EpCAM protein. (F) Example of negative control. Healthy blood spiked with cell line SK-BR-3 HTB-30 strain, know to not express CEN8. The thick arrow represents the cells. Images were taken at $\times 200$ magnification using a light microscope (Research System Microscope BX61—Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera (SC100—Olympus, Tokyo, Japan)

Supplementary Table S1. Clinical data and protein expression in CTCs.

Patients	Baseline (CTC1)					1° Follow-up (CTC2)			2° follow-up (CTC3)				Recurrence	CTM
	CTC/mL	CISH CEN8	MC1R	CD45	EpCAM	CTC/mL	MC1R	CD45	CTC/mL	MC1-R	CD45	EpCAM		
1	4.66	-	+	-	-	0.75	+	-	0	-	-	-	No	CTC1
2	0	-	-	-	-	1.33	+	-	0	-	-	-	Yes	
3	0.2	+	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-	Yes	
4	1	+	+	-	-	0.66	+	-	0	-	-	-	Yes	
5	9.91	+	+	-	-	0.75	+	+	3.33	+	-	-	Yes	
6	1	-	+	+	-	0	-	-	0.33	+	-	-	Yes	
7	1.66	+	+	-	-	1.33	+	+	4.06	+	+	-	Yes	
8	0.2	+	-	-	-	3.66	+	+	8.58	+	+	+	Yes**	CTC1, CTC2, CTC3
9	0.33	+	+	+	-	0	-	+	0	-	-	-	No	
10	0.5	+	+	+	+	7	+	+	1	+	-	-	No	CTC3
11	0.66	+	+	-	-	0.33	+	+	*	*	*	*	*	*
12	1.08	-	+	-	-	0	-	-	*	*	*	*	*	*
13	0.66	+	+	-	-	0	-	-	*	*	*	*	*	*
14	0.2	+	-	-	-	0.33	+	-	*	*	*	*	*	*

Abbreviations: *: no blood collection; ** Last follow-up: 05.2022.

São Paulo, 24 de janeiro de 2020.

Á

Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Aluna: Anna Paula Carreta Ruano (mestrado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2623/18C

"Avaliação e caracterização molecular de células tumorais circulantes de pacientes com câncer de ovário."

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **21/01/20**, **tomaram conhecimento e aprovaram** o seguinte documento:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado: *"Avaliação global das CTCs e de outros componentes sanguíneos como forma de avaliar a biologia de tumores de ovário."* registrado neste CEP sob nº. 2623/18. O projeto afiliado em referência será Mestrado da aluna Anna Paula Carreta Ruano, sob orientação da Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen.



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

São Paulo, 07 de julho de 2020.

À

Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Aluna: Anna Paula Carreta Ruano

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2623/18C

“Avaliação e caracterização molecular de células tumorais circulantes de pacientes com câncer de ovário.”

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **30/06/2020**, **tomaram conhecimento** do seguinte documento:

- Mudança de nível da aluna de Mestrado para Doutorado, em carta datada de 04 de junho de 2020.

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO ESTUDO: Avaliação global das CTCs e de outros componentes sanguíneos como forma de avaliar a biologia de tumores de ovário (CEP 2623/18)

Investigador Responsável: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

Nome do (a) Voluntário(a): _____

RGH: _____

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

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

OBJETIVOS DO ESTUDO

Usar um equipamento laboratorial novo no mercado para isolar células tumorais circulantes - CTCs (são células que se desprendem do tumor) no sangue periférico de pacientes com câncer de ovário e:

- correlacionar os níveis das CTCs com resposta terapêutica ao câncer de ovário;
- verificar genes ligados à autofagia (processo de degradação celular) nas CTCs;
- verificar perfil de metilação (é um tipo de modificação química do DNA (seu material genético) que pode ser removida sem mudar a sequência original do mesmo) do DNA das CTCs;
- quantificar, simultaneamente às CTCs, neutrófilos e linfócitos e ver se há correlação entre as taxas destas células e sobrevidas livre de progressão e global;
- verificar presença de híbridos (CTCs com macrófagos, células do nosso sistema de defesa) nas membranas de ISET, junto às CTCs e correlacionar sua presença com sobrevida livre de progressão;



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

- verificar a expressão de proteínas determinantes de resistência ao tratamento de inibidores de PARP nas CTCs.

- Estabelecer linhagem celular de CTCs a partir de sangue periférico de pacientes com tumor de ovário. Nosso intuito é estabelecer culturas para que possamos avaliar a presença de algumas proteínas nas células e testar medicamentos “in vitro”.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se concordar em participar deste estudo, você será submetido a três coletas de sangue (aproximadamente 10 mL), antes do início do tratamento e após 30 dias e 6 meses.

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

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

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

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

RISCOS

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

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



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

Caso isso aconteça com você, não há nada a ser feito, a não ser esperar que desapareça (desaparece em até 7 dias).

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

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

BENEFÍCIOS

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

MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES

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

A COMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

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

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



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

CUSTOS

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

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

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

BASES DA PARTICIPAÇÃO

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

SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE

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

ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS

RELACIONADOS À PESQUISA

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

ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

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

INFORMAÇÕES SOBRE NOMES, TELEFONES E ENDEREÇOS PARA CONTATOS



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

Esclarecimentos para questões sobre os direitos dos participantes na pesquisa e/ou danos relacionados à pesquisa, contatar a pesquisadora Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189 5000 ramal 2936), endereço: Rua Taguá, 440- Liberdade- São Paulo, SP. Se o pesquisador principal não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer – A.C. Camargo/ SP, cujo horário de funcionamento é de segunda a quinta-feira, das 07h00 às 18h00 e de sexta-feira das 07h00 às 16h00 (Telefone 2189-5000 ramal 5020; endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211- Liberdade- São Paulo, SP).

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

O termo é elaborado em duas vias e rubricado em todas as páginas, sendo uma via retida com o pesquisador responsável e outra com a instituição.

Você receberá uma via deste documento. Somente assine este documento se consentir integralmente com seus termos.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

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

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

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



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa
exame adicional e não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma via assinada deste formulário de consentimento.

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

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

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

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

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