

**DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS
CIRCULANTES EM PACIENTES COM CÂNCER
DE PÂNCREAS E SUA CORRELAÇÃO
COM EVOLUÇÃO CLÍNICA**

JOSÉ LUIZ GASPARINI JUNIOR

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra Ludmilla Thomé Domingos
Chinen**

**São Paulo
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Gasparini Junior, José Luiz

Detecção de células tumorais circulantes em pacientes com câncer de pâncreas e sua correlação com evolução clínica / José Luiz Gasparini Junior - São Paulo, 2015.

92p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores: 1. NEOPLASIAS PANCREÁTICAS/diagnóstico.
2. CÉLULAS NEOPLÁSICAS CIRCULANTES. 3. DETECÇÃO 4. IMUNO-HISTOQUÍMICA.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo exemplo de vida e dedicação!

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta e indireta de muitas pessoas.

À minha orientadora Dra Ludmilla T. Domingues Chinen, cuja a confiança, ensinamento e compreensão foram fundamentais em todas as etapas deste trabalho.

À toda equipe de pesquisa que faço parte, Emne Abdalla, Marcilei e Vanessa da Silva Alves.

À Oncologia clínica, Núcleo de quimioterapia e Educação Continuada da instituição.

À minha antiga e atual chefia no A.C.Camargo Cancer Center (Sarah C. Gonçalves e Maria das Graças Matsubara) por todo o apoio e incentivo neste período.

À minha família, por toda a base e estímulo.

Em especial, à todos os pacientes que participaram desta pesquisa.

RESUMO

Gasparini Júnior JL. **Detecção de células tumorais circulantes em pacientes com câncer de pâncreas e sua correlação com evolução clínica.** São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O câncer de pâncreas é uma doença de alta agressividade, com uma das mais baixas taxas de sobrevivência global. Células tumorais circulantes (CTCs) são células raras circundadas por bilhões de células hematopoiéticas, que podem ser isoladas e avaliadas quanto ao potencial de disseminação tumoral. **Objetivo:** Correlacionar o número de CTCs no sangue periférico de pacientes com tumor de pâncreas localmente avançado ou metastático com características clínicas da população estudada, resposta ao tratamento exames radiológico, genes de transportadores e resistência a droga citotóxica e sobrevida livre de progressão (SLP) e global (SG). **Pacientes e método:** Estudo prospectivo realizado por meio de coleta de sangue de pacientes com tumores de pâncreas metastático ou localmente avançado. O sangue dos pacientes foi coletado em três tempos: no diagnóstico ou progressão tumoral, 40 dias e 80 dias após a primeira coleta. As CTCs foram quantificadas pelo método de detecção ISET e analisadas por imunocitoquímica. Os transportadores e genes de resistência/sensibilidade foram escolhidos conforme o quimioterápico proposto ao pacientes (Oxaliplatina: MRP5 e ERCC1; Irinotecano: MRP1, MRP2 e MRP4; 5FU: TYMS e MRP5; Gencitabina: dCK). Proteínas envolvidas na transição epitélio-mesênquima (TEM) foram analisadas em todas as CTCs (Vimentina, TGF β -R e MMP2). **Resultados:** Foram incluídos 21 pacientes, com idade mediana de 67 anos (41-84). O estágio IV da doença foi observado em 14 pacientes (66,7%) e o grau histológico mais predominante foi o “moderadamente diferenciado”, encontrado em 8 pacientes (38,1%). A mediana de CTC detectada no *baseline* foi de 22

CTCs/8ml de sangue (0 – 194), no primeiro *follow-up* foi 20 CTCs/8ml de sangue (0 – 175) e no segundo *follow-up* foi 8 CTCs/8ml de sangue (0 – 84). Na correlação entre número de CTC e as características clínicas levantadas, imagem radiológica, resposta ao tratamento, SLP e SG não houve correlação estatisticamente significativa. Nos marcadores de resistência a droga e de TEM não houve diferença de SLP e SG na comparação dos grupos que apresentam marcação contra os que não apresentam. **Conclusão:** Identificamos que nesta amostra o estudo da CTC não mostrou-se relevante na SLP, SG e resistência a droga citotóxica, mas pode ser que para a análise de marcador seja útil, como observados pelas curvas separadas de MMP2 e TGF β -R.

SUMMARY

Gasparini Júnior JL. **[Detection of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer and its correlation with clinical evolution]**. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Pancreatic cancer is a highly aggressive disease, it presents one of the lowest overall survival rates. The spread of cancer needs the presence of circulating tumor cells (CTCs), which are rare cells surrounded by billion of hematopoietic cells, but that can be isolated by technologies such as ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells). **Objectives:** Detect CTCs in peripheral blood from patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer, and to correlate its levels with imaging, drug resistance markers/genes, overall survival (OS), and progression-free survival (PFS). **Methods:** Prospective study was made by blood collection from patients with advanced or metastatic pancreatic solid tumors. The blood collections were made at three moments: at diagnosis or disease progression and each 40 days. CTCs were quantified by ISET® system and analyzed by immunocytochemistry. **Results:** There were included 21 patients, with a median age of 67 years (41-84). Stage IV of the disease was observed in 15 patients (66.7%) and the predominant histological grade was moderately differentiated, found in eight patients (38.1%). CTC median at baseline was 22 CTCs/8ml of blood (0 – 194), at first follow-up was 20 CTCs/8ml of blood (0 – 175), and at second follow-up was 8 CTCs/8ml of blood (0 – 84). It was not found correlation statistically significant when CTC numbers were compared with clinical characteristics assessed. When PFS and OS were analyzed according with CTC number and positive staining to markers related to cytotoxic drug resistance, it was not found statistical significance. Mostly of CTCs presented, a mesenchymal phenotype, seen by MMP2 and TGFβ-R expression, that determine increased the profile of invasion and drug resistance, but the patients with CTCs positive to these mesenchymal

markers did not present difference statistically relevant in OS and PFS.

Conclusion: We identified that this sample CTC study showed no relevance to the SLP, SG and resistance to cytotoxic drugs, but may be that for marker analysis to be useful as observed by the separate curves of MMP2 and TGF β -R.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curva de Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Progressão na mediana de CTC no baseline, 1º follow-up e 2º follow-up.....	53
Figura 2	Curva de Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Progressão (SLP) da marcação de resistência/sensibilidade a droga citotóxica nas CTCs.....	57
Figura 3	Curva de sobrevida livre de progressão e sobrevida global para marcadores de TEM.....	66
Figura 4	Progressão diagnóstica (PD) após 2º follow-up e entre o 1º follow-up e 2º follow-up.....	67

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Anticorpos utilizados, indicação, concentração adotada, fabricante e especificações.....	42
Quadro 2	Número de pacientes analisados em cada coleta.....	46
Quadro 3	Anticorpos utilizados, concentração adotada, fabricante e especificações.....	27
Tabela 1	Características clínicas dos pacientes recrutados.....	46
Tabela 2	Achados clínicos, proposta de tratamento, número de CTC, Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Progressão dos pacientes pesquisados.....	47
Tabela 3	Número de CTCs em 8ml de sangue periférico.....	48
Tabela 4	Correlação dos achados clínicos com o número de CTC.....	49
Tabela 5	Correlação da sobrevida global e livre de progressão com a mediana de cada coleta de CTC.....	53
Tabela 6	Análise da expressão de resistência/sensibilidade a droga citotóxica da CTC na SLP e SG.....	54
Tabela 7	Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C2).....	57
Tabela 8	Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C3).....	58

Tabela 9	Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C4).....	59
Tabela 10	Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C6).....	59
Tabela 11	Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C7).....	60
Tabela 12	Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C8).....	61
Tabela 13	Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C10).....	62
Tabela 14	Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C21).....	62
Tabela 15	SLP dos pacientes que apresentaram marcação positiva para marcadores de TEM.....	64
Tabela 16	SLP e SG nos pacientes favoráveis ou não favoráveis após tratamento quimioterápico.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracil
ACB	do inglês, <i>ATP – binding cassette</i>
ALDH	do inglês, <i>aldehyde dehydrogenase</i>
BRCA1	do inglês, <i>breast cancer 1</i>
CA 19.9	do inglês, <i>Carbohydrate Antigen 19.9</i>
CPNPC	Câncer de pulmão não pequenas células
CTC	Célula tumoral circulante
CTT	Célula-tronco tumoral
dCK	do inglês, <i>deoxycytidine kinase</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTC	do inglês, <i>disseminated bone marrow tumour cells</i>
EGFR	do inglês, <i>epidermal growth factor family</i>
EpCAM	do inglês, <i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ERCC1	do ingles, <i>Excision Repair Cross-Complementation Group 1</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	do inglês, <i>Foods and Drugs Administration</i>
FOLFIRI	Protocolo quimioterápico composto por irinotecano e 5FU
FOLFIRINOX	Protocolo quimioterápico composto por irinotecano, oxaliplatina e 5FU
FOLFOX	Protocolo quimioterápico composto por oxaliplatina e 5FU
GST	Glutathione-S-transferase
Hb	Hemoglobina
hENT1	do inglês, <i>human equilibrative nucleoside transporter-1</i>
HER2	do inglês, <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HR	do inglês, <i>hazard ratio</i>
IC	Intervalo de confiança
ISSET	do inglês, <i>Isolation by Size of Epithelial Tumors</i>
M	Presença de metástase
ME	Microembolo

MMP	Metaloproteinase
MO	Medula óssea
MRPs	do inglês, <i>multidrug-resistance-related proteins</i>
N	Comprometimento linfonodal
PD	Progressão da doença
RT-PCR	do inglês, <i>real-time polymerase chain reaction</i>
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
TDP1A	Topoisomerase I
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TFT	Tempo para falha do tratamento
TGFβ-R	do inglês, <i>Transforming growth factor beta receptor</i>
TP	Tempo de progressão
TYMS	Timidilato sintase
uPA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
Zeb – 1	do inglês, <i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Câncer de Pâncreas	1
1.2	Conceito e Visão Geral de Células Tumorais Circulantes	6
1.3	Aplicação Clínica	10
1.4	CTC e Resposta ao Tratamento Antineoplásico.....	16
1.5	CTC e Imagem Radiológica.....	19
1.6	CTC e Transportadores Envolvidos na Resistência às Drogas I	22
1.7	Genes de Resistência às Drogas	25
1.8	CTC e a Transição Epitélio-Mesênquima	30
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo Primário	37
2.2	Objetivos Secundários.....	37
3	PACIENTES E MÉTODOS.....	38
3.1	Pacientes.....	38
3.2	Métodos.....	39
3.3	Avaliação da Expressão Proteica de Genes de Resistência /Sensibilidade às Drogas, Transição Epitélio-Mesenquimal e Célula Tronco Tumoral	41
3.4	Análise Estatística	44
4	RESULTADOS	46
4.1	Pacientes.....	45
4.2	Contagem de CTC.....	47
4.3	CTC e as Características Clínicas.....	49
4.4	CTC e Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Progressão.....	51
4.5	Genes de Resistência à Droga.....	53

4.5.1	Análise da Marcação Positiva para Genes de Resistência à Droga Citotóxica.....	53
4.5.2	Análise Individual dos Pacientes que apresentaram Marcação positiva para Genes de Resistência à Droga Citotóxica	56
4.6	Transição Epitélio-Mesênquima	63
4.7	Comparação do Número de CTC com os achados de Imagem	66
4.8	Numero de CTC e a Quimioterapia	67
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÕES	80
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ANEXOS

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

Anexo 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE PÂNCREAS

O pâncreas é uma glândula mista que tem a função tanto endócrina, como exócrina. No pâncreas endócrino, as ilhotas de Langerhans ocupam cerca de 2% de todo o pâncreas. Nesta função, apresentam-se diversas células que são responsáveis pela produção de hormônios, como as células α , responsáveis pela produção do glucagon; células β , que produzem a insulina; células Δ , que produzem a somatostatina; e um quarto tipo, as células F, que secretam o polipeptídeo pancreático (COSTANZO 2007; KOEPPEN e SANTON 2009).

Na sua porção exócrina, representando cerca de 90% de todo o volume pancreático, as células acinares são responsáveis pela produção de diversas enzimas que auxiliam na digestão de proteínas, gordura e amiláceos. Outra importante função exócrina desse órgão é a alcalinização do quimo, por meio da liberação de bicarbonato, para possibilitar a absorção dos nutrientes pelo intestino delgado (COSTANZO 2007; MCPHEE e GANONG 2007).

As neoplasias podem atingir tanto o pâncreas endócrino como o exócrino. No pâncreas endócrino, os tumores neuroendócrinos correspondem a apenas 5% dos tumores malignos do pâncreas e têm um

melhor prognóstico comparado com os tumores do pâncreas exócrino (RODRIGUES 2010).

O pâncreas exócrino pode apresentar neoplasias císticas e sólidas. As neoplasias císticas correspondem a menos de 5% dos tumores pancreáticos. Podem ser benignas, “*borderline*” ou malignas. Como exemplos de neoplasias císticas, temos o cistadenoma seroso, neoplasia cística mucinosa e neoplasia mucinosa papilífera intraductal. As neoplasias pancreáticas sólidas são o adenocarcinoma ductal e o carcinoma acinar (KUMAR et al. 2010).

O adenocarcinoma pancreático é uma doença de alta agressividade. É a oitava causa de morte por câncer em homens e a nona em mulheres no mundo (RYAN et al. 2014). Estava previsto para o ano de 2014 nos EUA que seriam realizados 46.420 novos diagnósticos de câncer de pâncreas e que 39.590 morreriam pela doença. Nos últimos 80 anos, não houve variações bruscas na taxa de mortalidade nos EUA, mostrando que o manejo e o tratamento do câncer de pâncreas ainda continuam sendo um desafio até os dias de hoje (SIEGEL et al. 2014).

Os fatores de risco para o adenocarcinoma de pâncreas podem ser divididos em fatores genéticos ou ambientais. Os fatores genéticos são responsáveis por cerca de 10% dos adenocarcinomas pancreáticos ductais. Síndrome de Lynch, Polipose adenomatosa familiar, pancreatite hereditária e síndrome Peutz-Jeghers são algumas das síndromes hereditárias que acentuam o risco para o adenocarcinoma de pâncreas. Já entre os fatores ambientais, portanto modificáveis, estão presentes: fumo, obesidade e

doenças crônicas do pâncreas (diabetes mellitus e pancreatite crônica, por exemplo) (BECKER et al. 2014).

Como na maioria dos tumores, a formação do tumor de pâncreas se dá por meio de diversas alterações genéticas e mutações herdadas ou adquiridas em genes associados ao câncer. As principais alterações moleculares envolvidas na carcinogênese pancreática são a ativação do oncogene KRAS e a inativação dos genes supressores de tumor TP53, p16/CDKN2A e SMAD4 (KUMAR et al. 2010; COLLINS e PASCA DI MAGLIANO 2014; ESER et al. 2014).

O modelo de progressão para o adenocarcinoma de pâncreas, análogo ao pólipó no câncer de cólon, mostra a neoplasia intraepitelial pancreática como uma lesão pré-maligna encontrada nos ductos pancreáticos, que antecede o adenocarcinoma. A neoplasia intraepitelial pancreática pode ser categorizada como baixo grau (PanIN – 1A ou 1B), intermediário (PanIN – 2) ou grau elevado (PanIN – 3) (KUMAR et al. 2010; RYAN et al. 2014).

De acordo com RYAN et al. (2014), o adenocarcinoma de pâncreas passa por diversas mutações, diferentes lesões pré-malignas, apresentando uma capacidade de invasão local e metástase à distância, características de tumor fibrótico e hipovascular, resultando em extensa reação estromal e hipóxia, reprogramação do metabolismo celular e evasão de imunidade.

O estroma do adenocarcinoma de pâncreas sofre intensa reação desmoplásica, criando um microambiente que propicia resistência tumoral a drogas citotóxicas. As células estreladas do pâncreas, quando ativadas,

produzem grande quantidade de matriz extracelular com ácido hialurônico, laminina, desmina e colágeno I/III. Estas células podem assumir um fenótipo de miofibroblastos. Além das células estreladas, outros componentes celulares como fibroblasto, células do sistema imune, células endoteliais e células nervosas também estão presentes, provocando um microambiente fibrótico e hipovascular que dificulta a entrega das drogas citotóxicas, (RUCKI e ZHENG 2014; SCHOBER et al. 2014).

Os sinais e sintomas inespecíficos e a localização do pâncreas em região retroperitoneal, propiciam a progressão da doença e levam a um diagnóstico tardio. Dores abdominais, perda de peso, astenia, anorexia e diabetes (em 50% dos pacientes) são alguns dos sinais e sintomas presentes no câncer de pâncreas (BOWEN e RIALI 2008). Se o tumor atingir a cabeça do pâncreas (60 a 70% dos casos), pode ocorrer a presença de icterícia pela distensão da árvore biliar em 50% dos pacientes (KUMAR et al. 2010).

Para determinar o estadiamento da doença e o tratamento recomendado, é necessário avaliar o tamanho do tumor, extensão peripancreática, estruturas afetadas como artérias, veias e rede linfática e verificar possíveis metástases (BILICI 2014).

A ressecção cirúrgica parece ser crucial para o aumento da sobrevida, estando indicada para o estágio I ou II que apresente uma lesão ressecável. Para definir a ressecabilidade do tumor é necessário avaliar o comprometimento venoso, porém, mesmo com a ressecção, a maioria dos

pacientes apresenta recidiva local ou disseminação hematogênica (TAKEUCHI e KITAGAWA 2009).

A quimioterapia e/ou radioterapia adjuvante (tratamento realizado após o procedimento cirúrgico) tem papel complementar na tentativa de evitar recidiva local ou metástases. Enquanto o uso da quimioterapia é bem comprovado, o uso da radioterapia ainda continua controverso (CHUONG et al. 2014). A associação de quimioterapia e radioterapia mostra-se pouco eficiente e causa mais toxicidade, comparado com o uso de quimioterapia isolada (GOODMAN e SAIF 2014).

A quimioterapia que demonstrou melhor benefício no tratamento adjuvante é a gencitabina ou 5-fluorouracil (5-FU). STOCKEN et al. (2014) mostraram que não há diferença no tratamento entre a gencitabina (sobrevida global média de 23,6 meses) e 5-FU (sobrevida global média de 23 meses).

Os pacientes com doença metastática raramente sobreviviam mais do que dois anos. Com o advento dos novos protocolos quimioterápicos como, por exemplo, o FOLFIRINOX em 2011, cerca de 10% dos pacientes sobrevivem mais que dois anos (RYAN et al. 2014).

Nos pacientes que apresentam doença localmente avançada ou irressecável (estádio III), estudos mostram contradição em relação ao uso de radioterapia. Para a quimioterapia, há diversas combinações de agentes citotóxicos, mas os protocolos FOLFIRINOX (oxaliplatina, irinotecano e 5-FU) e a gencitabina com nab-paclitaxel mostraram uma melhor sobrevida global comparadas com o uso da gencitabina de forma isolada. Porém,

esses protocolos são mais tóxicos, sendo indicados para os pacientes que apresentam um melhor *performance status*. Para os pacientes que não podem realizar esses protocolos devido a um comprometimento do *performance status*, só resta a gencitabina como terapia de escolha (GRESHAM et al. 2014; THOTA et al. 2014).

Tratamentos associando inibidores de EGFR com gencitabina mostraram uma discreta melhora na sobrevida (6,24 vs. 5,91 meses; $p = 0.038$) comparados ao uso da gencitabina como monoterapia (MOORE et al. 2007).

Diante de tudo que foi exposto, percebe-se que o tratamento do câncer de pâncreas ainda é um desafio. Um dos fatores que contribui para esta dificuldade é a resistência aos agentes citotóxicos, contribuindo para um pior prognóstico e uma alta taxa de mortalidade (WANG et al. 2011; LONG et al. 2012).

1.2 CONCEITO E VISÃO GERAL DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

Tumores iniciais crescem como massas não-vascularizadas, que podem proliferar por meio de uma lesão pré-existente. Após atingirem um tamanho de aproximadamente 2-3 mm, os tumores requerem sua própria vascularização (revisado por FOLKMAN 1995). Assim, a indução de angiogênese e de vasculatura tumoral é considerada fator patognomônico

do processo maligno e são necessárias à progressão tumoral (revisado por STRIETER 2005).

Células tumorais podem propagar-se invadindo os vasos sanguíneos vizinhos ou usando os capilares formados dentro do tumor. Nas duas formas, há indução de transição epitélio-mesênquima (TEM), que constitui uma mudança na expressão de moléculas de adesão (ex.: integrinas, lamininas) e na ativação de proteases (ex: metaloproteinases de matriz), que eventualmente permitem às células tumorais entrarem na circulação (ELSHIMALI e GRODOY 2006).

A disseminação do câncer pode ocorrer de diferentes formas. Células tumorais circulantes (CTC), que são células raras circundadas por bilhões de células hematopoiéticas na circulação sanguínea podem ser citadas como um exemplo (MEGO et al. 2010). A presença de CTCs no sangue periférico foi relatada pela primeira vez pelo médico austríaco Thomas ASHWORTH (1869), quando fazia a necropsia de um paciente com tumores subcutâneos metastáticos, situados na parede anterior do tórax e do abdômen. Ele observou células na circulação (obtidas da veia safena da perna direita) idênticas às provenientes dos tumores e postulou que, se estas células eram oriundas de uma estrutura tumoral existente, elas deviam ter atravessado grande parte do sistema circulatório para alcançar a parte interna da veia safena da perna direita.

Atualmente, postula-se que as chamadas CTCs tendem a metastatizar em certos órgãos, que são seletivos para determinados

tumores, conforme conceito histórico de “solo e semente”, formulado por Stephen Paget (LURJE et al. 2010).

Considerando-se que as CTCs e o tumor de onde provêm são considerados “estranhos” para o sistema imune hospedeiro, elas precisam escapar da resposta imune. Este escape é realizado por meio da habilidade de formar grupos de microtumores ou microêmbolos (MEs), que atingem sítios distantes. Tem sido demonstrado que a formação de agregados de 5-10 CTCs ocultas escapa do sistema imune, promovendo recrutamento de fatores pró-angiogênicos a partir do microambiente local e expressão de novos marcadores de superfície (MUKAI 2005).

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

A detecção primária de CTC pode ajudar a identificar pacientes em necessidade de terapias sistêmicas adicionais após ressecção cirúrgica do tumor primário. Apesar de todas as terapias serem desenvolvidas para prevenir a recaída local ou metástase, a seleção de pacientes baseia-se no risco estatístico de desenvolverem recorrência, sem saber se de fato eles abrigam qualquer CTC. Isto pode levar a tratamento desnecessário desses

pacientes, expondo-os a agentes tóxicos com efeitos colaterais graves (FEHM et al. 2008). Desta forma, incluir a detecção ou contagem de CTCs na análise dos pacientes tornaria o tratamento mais direcionado e quem sabe até menos sofrível, pois estaria tratando quem realmente necessitasse, evitando a exposição excessiva.

Em adição ao seu uso como fator prognóstico, o monitoramento de CTCs após tratamento adjuvante também poderia auxiliar na conduta clínica. Dentre os órgãos para os quais as células tumorais podem migrar, encontra-se a medula óssea (M.O.) (RIETHDORF e PANTEL 2008).

A M.O. pode ser um ponto comum de migração de CTCs provenientes de vários tumores epiteliais sólidos. Muitos estudos têm indicado que a presença de CTCs na M.O. após terapia adjuvante é uma característica de prognóstico desfavorável (FEHM et al. 2008). Porém, a aspiração de M.O. é um procedimento invasivo, desconfortável e, muitas vezes, doloroso para os pacientes. Por isso, esforços têm sido feitos no sentido de detectar CTCs do sangue periférico de pacientes com câncer, porém, seu uso ainda não foi implantado na prática clínica. Além disso, há poucos estudos comparando exames de M.O. com os de sangue periférico e o significado clínico de CTCs no sangue periférico ainda precisa ser melhor esclarecido (RIETHDORF e PANTEL 2008).

1.3 APLICAÇÃO CLÍNICA

SLADE et al. (2009) fizeram um estudo para comparar o método de detecção de CTCs (*CellSearch System*) com o sistema de monitoramento de micrometástases da MO (ICC- *immunocytochemistry* e RT-PCR) em pacientes em seguimento após diagnóstico de câncer de mama, sem evidência de metástases. Os resultados mostraram que algumas pacientes com diagnóstico inicial de câncer de mama apresentaram evidências de micrometástases durante o seguimento, apesar da ausência de evidências clínicas de metástases. Entre dezoito, sete pacientes (39%) classificadas como T1N0 tinham CTCs quando comparadas com as que eram linfonodo positivas (23 de 33, correspondendo a 70%; $p = 0.042$). Apesar do pequeno número de casos, esses autores observaram que a detecção de CTCs e DTCs (do inglês, *disseminated bone marrow tumour cells*) foi maior em pacientes com maior risco de recorrência ($p = 0.042$ e $p < 0.001$, respectivamente) e que os números de CTCs foram maiores em pacientes com pior prognóstico. Neste estudo, tanto DTCs quanto CTCs levaram às mesmas conclusões sendo, portanto, equivalentes em termos de significado clínico.

Progressos têm ocorrido com o desenvolvimento de sistemas de enriquecimento e de detecção imunoistoquímica de CTCs. O mais conhecido é o *CellSearchTM System*, que separa as células com pérolas magnéticas cobertas com anticorpos anti-EpCAM seguido pela imunocitoquímica das células capturadas com anti-citoqueratina fluorescente. A leitura é feita em

microscópio semi-automatizado (RIETHDORF e PANTEL 2008). No ano de 2007, esse sistema foi aprovado pelo FDA para uso em monitoramento de pacientes com tumores metastáticos de mama, próstata e colorretal (Foods and Drugs Administration-FDA 2007).

Usando o *CellSearch System*, CRISTOFANILLI et al. (2004), em trabalho com 177 pacientes com câncer de mama metastático, fizeram contagem das CTCs antes e após o início do tratamento para a doença metastática. Pacientes com níveis de CTCs iguais ou superiores a 5 por 7,5 mL de sangue, quando comparadas com as que apresentavam menos de 5 CTCs/ 7,5 ml, tiveram menor sobrevida livre de progressão (SLP) (2,7 vs. 7 meses, $p < 0.001$) e menor sobrevida global (SG) (10,1 vs. 18 meses, $p < 0.001$). Após o primeiro seguimento, depois do início do tratamento, esta diferença entre os grupos persistiu (em relação às sobrevidas e ao número de CTCs). Pela análise multivariada, os níveis de CTCs antes e após o início do tratamento mostraram ser preditores significativos de SG e SLP. Ainda foi possível observar que aproximadamente 70% dos pacientes com doença metastática tinham acima de 1 CTC/ 7,5 mL de sangue periférico. Outros grupos reproduziram e confirmaram o valor prognóstico da contagem de CTC antes da primeira linha de tratamento, demonstrando uma maior sobrevida nas pacientes que apresentam contagem de CTC < 5 CTCs/7,5ml, independentemente da carga tumoral, fenótipo da doença, histologia, receptor hormonal, HER2 ou se a paciente teve doença recorrente ou novas metástases (MEGO et al. 2010; GRADILONE et al. 2011).

MAESTRO et al. (2009) pesquisaram CTCs em 798 pacientes, entre eles, 683 pacientes com tumores sólidos (mama: 438; colorretal: 195; e próstata: 50) e 106 voluntários saudáveis, utilizando a plataforma *CellSpotter Analyzer®*, que classifica a célula em CTC se positiva para anticorpos de células epiteliais (citoqueratinas 8 18) e negativas para anticorpo específico para leucócito (CD45). Nesse estudo, eles demonstraram que o ponto de corte ≥ 2 CTCs/7,5 ml de sangue é seguro para tumores sólidos e que o número de CTCs é maior nos pacientes metastáticos comparado aos pacientes com doença localizada ($p < 0.001$). Não houve detecção de CTCs nos voluntários saudáveis.

No câncer de próstata metastático, DE BONO et al. (2008), classificaram os pacientes por meio da contagem de CTCs no sangue periférico em favorável e não favorável (< 5 e ≥ 5 CTCs/7,5 ml, respectivamente). Comparado ao grupo favorável, os pacientes do grupo não favorável apresentaram mediana menor de SG antes (21.7 vs. 11.5 meses; $p < 0.0001$) e após (19.6 - 20.7 vs. 6.7 - 9.5 meses; $p < 0.0001$) o tratamento sistêmico.

O valor prognóstico das CTCs no câncer de próstata metastático foi reforçado por uma metanálise com 33 trabalhos. Os autores demonstraram que a presença de CTCs foi fator de pior SLP (HR e 95 % IC 2.15 [1.69 2.73], $n=18$, $p < 0.00001$) e SG (HR e 95 % IC 2.43 [2.07 2.86], $n=16$, $p < 0.00001$) para os pacientes com câncer de próstata (MA et al. 2014).

Em câncer colorretal metastático, utilizando a mesma categorização utilizada por DE BONO et al. (2008), COHEN et al. (2008) também

classificaram os pacientes em favoráveis (< 3 CTCs/ml de sangue) ou em não favoráveis (≥ 3 CTCs/ml de sangue). Os pacientes não favoráveis apresentaram uma pior mediana de SLP (4.5 vs. 7.9 meses; $p < 0.0002$) e SG (9.4 vs. 18.5 meses; $p < 0.0001$), comparados com os pacientes do grupo favorável. Uma metanálise confirmou o valor prognóstico das CTC no câncer colorretal. Na análise de 36 estudos, os pacientes que apresentaram CTCs mostraram uma pior sobrevida livre de recorrência (HR 3.24 [95% IC: 2.06–5.10], $n = 26$) e SG (95% IC: 2.28 [1.55–3.38], $n = 21$) (RAHBARI et al. 2010).

No câncer de pulmão, os dados são mais robustos para o Câncer de Pulmão não Pequenas Células (CPNPC). KREBS et al. (2011) demonstraram que ao realizar a contagem de CTCs em sangue periférico de 101 pacientes com CPNPC em estágio III e IV, os pacientes que apresentavam uma melhor SLP (6.8 vs. 2.4 meses, $p < 0.001$) e SG (8.1 vs. 4.3 meses; $p < 0.001$) eram os que apresentavam uma contagem < 5 CTCs/7,5 ml de sangue, quando comparados com os pacientes que apresentavam ≥ 5 CTCs/7,5 ml de sangue periférico.

Outros estudos demonstraram o valor prognóstico para a contagem de CTCs não apenas para a doença metastática, mas para a doença detectada no estágio inicial. Para o câncer colorretal e de mama foi possível correlacionar a detecção de CTCs (≥ 1 CTC/7,5 ml de sangue) com um pior prognóstico, mesmo em estágios iniciais da doença (Colorretal - SG: 49.8 vs. 38.4 meses; $p < 0.001$; Mama – SG: $p = 0.005$; SLP: $p = 0.01$) (LUCCI et al. 2012; BORK et al. 2015).

No câncer de pâncreas, o marcador tumoral usado atualmente é o CA 19.9 (do inglês, *Carbohydrate Antigen 19.9*), porém este marcador pode se elevar em paciente com doenças não malignas, como cirrose, pancreatite crônica, colangite e em pacientes do grupo sanguíneo de Lewis. Em até 35% dos pacientes com câncer de pâncreas, os níveis de CA 19.9 podem não sofrer alteração, o que caracteriza uma necessidade de um marcador mais eficaz para o diagnóstico e previsão de eficácia terapêutica (CEN et al. 2012; KHOJA et al. 2012).

As CTCs são um potencial marcador para o câncer de pâncreas. Após isoladas, é possível avaliar seu conteúdo quanto à genética tumoral, proteômica e biologia molecular. Isto permite o estudo do curso farmacodinâmico de um paciente, além de fornecer uma visão sobre o processo de metástase, facilitando assim a descoberta de novas terapias-alvo (CEN et al. 2012; KHOJA et al. 2012).

Devido ao prognóstico ruim dos pacientes com câncer de pâncreas, poucos estudos têm sido realizados relacionando a doença com CTCs. Há alguns relatos de casos e raros trabalhos com série de pacientes.

KURIHARA et al. (2008) avaliaram os níveis de CTCs em 26 pacientes com câncer de pâncreas num período de dois anos, em estádios II a IVb. Usaram indivíduos saudáveis para confirmar a especificidade do teste e notaram que esses indivíduos não tinham nenhuma CTC na circulação. Onze pacientes apresentaram CTCs, todos em estágio IV. Houve uma diferença significativa entre os níveis de CA 19.9 encontrados entre os pacientes CTC- positivos e negativos ($p < 0.05$). A sobrevida mediana dos

pacientes CTC-negativos foi maior do que dos positivos, mostrando que a positividade de CTC pode afetar a sobrevida.

REN et al. (2011) trabalharam com pacientes com câncer de pâncreas tratados com 5-FU. Participaram do estudo 41 pacientes (estádio III (32) e IV (9)). Dos participantes do estudo, 33 apresentaram CTCs, numa média de 16 (0 - 59) CTCs/7,5ml de sangue. Após a exposição ao 5-FU, o número de pacientes que apresentou CTCs caiu para 12 e a média variou 3,6 a 8,6 (0-40) CTCs/7,5ml de sangue. Estes dados indicam que as CTCs têm potencial para serem aplicadas como biomarcador farmacodinâmico.

KHOJA et al. (2012) avaliaram duas plataformas tecnológicas para detecção de CTCs: *CellSearch System* e ISET (Rarecells, France). Ao todo, 54 pacientes participaram do estudo e foi observada correlação direta entre as duas técnicas em 27 deles. A mediana de contagem de CTCs variou entre os métodos *CellSearch System* e ISET (média: 2 vs. 26 CTC/7,5 ml de sangue, respectivamente). O estudo mostrou uma maior detecção de CTCs pela técnica ISET, provavelmente porque este método independe de marcação de citoqueratinas, EpCAM e consegue separar células em TEM, por ser um método anticorpo-independente.

Em diversos estudos realizados com a plataforma ISET, foi possível estabelecer uma contagem segura e correlação positiva com os achados clínicos. VONA et al. (2004), utilizando a tecnologia ISET, pesquisaram CTCs em pacientes com o câncer hepático sem metástase, hepatite crônica, cirrose hepática e indivíduos saudáveis. Dos 44 pacientes com câncer hepático, foi possível observar CTCs em 23 destes. Não foi detectada

nenhuma CTC nos outros grupos do estudo. Segundo os autores, foi possível correlacionar a presença de CTC (≥ 1 CTC/3ml de sangue) em pacientes com tumores difusos ($p = 0.0001$) e trombose portal por tumor ($p = 0.006$). Os pacientes que apresentaram CTC sobreviveram menos do que os pacientes que não apresentaram ($p = 0.001$).

MAZZINI et al. (2014) conseguiram estabelecer para melanoma uveal que a presença de > 10 CTC/10ml de sangue e microêmbolos (MEs) foram preditores de piores SLP ($p = 0.012$) e SG ($p = 0.017$), maior diâmetro basal ($p = 0.019$) e altura tumoral ($p = 0.048$). O grupo controle (pacientes com alterações no nervo coróide) não apresentou CTCs.

1.4 CTC E RESPOSTA AO TRATAMENTO ANTINEOPLÁSICO

PIERGA et al. (2008) estudaram o número de CTCs antes e após a quimioterapia neoadjuvante em 118 pacientes com câncer de mama não metastático, estágio II ou III, que não tinham indicação para cirurgia conservadora. Das 118 pacientes, em apenas 97 foi possível avaliar o número de CTCs antes da terapia neoadjuvante, utilizando a plataforma *CellSearch System*. Destas 22 pacientes apresentaram ≥ 1 CTC/7,5 ml de sangue periférico, com mediana de 2 CTCs/7,5 ml. Após a quimioterapia neoadjuvante, das 86 pacientes analisadas, foi possível observar 1 CTC/7,5ml de sangue em 15 pacientes. Do total de pacientes do estudo 23 apresentaram resposta patológica completa. Não houve correlação com detecção de CTC antes ($p = 0.84$) ou após ($p = 0.47$) quimioterapia

neoadjuvante. Porém, as pacientes CTC positivas, antes da quimioterapia neoadjuvante, apresentaram recidiva precoce ($p = 0.013$; tempo de acompanhamento: 18 meses). Não houve correlação entre detecção de CTC antes da quimioterapia neoadjuvante e sobrevida livre de metástase ($p = 0.07$). Nas análises uni e multivariada, a detecção de CTCs antes ou após a quimioterapia neoadjuvante foi fator prognóstico independente ($p = 0.013$ e $p = 0.017$, respectivamente). De acordo com os autores, não foi possível correlacionar a contagem de CTCs e resposta patológica completa, que é a principal avaliação para resposta à quimioterapia neoadjuvante. Porém, a contagem de CTCs foi fator prognóstico independente de recidiva precoce.

No câncer colorretal metastático, COHEN et al. (2008) estudaram o número de CTCs pelo *CellSearch System* antes e após início da primeira ou segunda linha de tratamento quimioterápico ou terceira linha com um inibidor de EGFR (do inglês, *epidermal growth factor family*). As coletas de sangue para detecção de CTCs após o tratamento proposto foram realizadas com os seguintes intervalos: da semana 1 a 2, 3 a 5, 6 a 12 e 13 a 20 e o ponto de corte escolhido para análise de SLP e SG foi de $\geq 3\text{CTCs}/7,5\text{ ml}$ de sangue. Os pacientes que apresentaram $\geq 3\text{CTCs}/7,5\text{ ml}$ de sangue, comparados os com $< 3\text{CTCs}/7,5\text{ml}$, tiveram pior SLP (mediana, 4.5 vs. 7.9 meses; $p < 0.0002$) e SG (mediana: 9.4 vs. 18.5 meses; $p < 0.0001$). Para entender a dinâmica das CTCs após a exposição ao agente citotóxico, os pacientes foram subclassificados em sempre favoráveis (mantiveram $< 3\text{CTCs}/7,5\text{ml}$ antes e durante o tratamento), favoráveis (inicialmente $\geq 3\text{CTCs}/7,5\text{ ml}$ e após o tratamento $< 3\text{CTCs}/7,5\text{ml}$), desfavoráveis (inicialmente < 3

CTCs/7,5 ml e após o tratamento ≥ 3 CTCs/7,5ml) e sempre desfavoráveis (mantiveram ≥ 3 CTCs/7,5ml antes e durante o tratamento). Para os pacientes favoráveis as SLP e SG foram estatisticamente melhores comparadas aos sempre desfavoráveis (SLP mediana: 6,2 vs. 1,6 meses, $p = 0.0194$; SG mediana: 11 vs. 3,7 meses, $p = 0.0002$). Os pacientes do grupo sempre favoráveis sobreviveram mais, comparados aos do grupo desfavoráveis (SG mediana: 17,7 vs. 11 meses, $p = 0.0019$). Estes dados demonstram o valor prognóstico das CTCs antes do início do tratamento proposto e seu valor preditivo, demonstrando que a resposta à quimioterapia pode ser analisada pela diminuição de CTCs.

DE BONO et al. (2008) estudaram a presença de CTCs em 231 pacientes, antes e após o tratamento com hormonioterapia para câncer de próstata metastático resistente à castração, pelo *CellSearch System*. Utilizando a mesma classificação realizada por COHEN et al. (2008), os pacientes foram subclassificados em sempre favoráveis (mantiveram < 5 CTCs/7,5ml antes e durante o tratamento); favoráveis (inicialmente ≥ 5 CTCs/7,5 ml e após o tratamento < 5 CTCs/7,5ml); desfavoráveis (inicialmente < 5 CTCs/7,5 ml e após o tratamento ≥ 5 CTCs/7,5ml); e sempre desfavoráveis (mantiveram ≥ 5 CTCs/7,5ml antes e durante o tratamento). Os pacientes do grupo sempre desfavoráveis demonstraram pior SG comparados aos favoráveis (média, 6,8 vs. 21,3 meses, $p = 0.0001$) ou sempre favoráveis (média 6,8 vs. > 26 meses, $p < 0.0001$).

Diferentemente dos outros trabalhos citados, SMERAGE et al. (2014) propuseram mudança do tratamento quimioterápico, dependendo do número

de CTCs detectadas. Utilizando o *CellSearch System*, 595 pacientes com câncer de mama metastático foram recrutadas para o estudo. Antes do início do tratamento, as pacientes foram separadas nas que apresentavam < 5 CTCs/7,5ml de sangue (276 pacientes, braço A) e com ≥ 5 CTC/7,5ml de sangue (288 pacientes, braço B). Após 21 dias, foi realizada nova contagem de CTC com as pacientes do braço B. As pacientes que apresentaram diminuição do número de CTCs (< 5 CTCs/7,5ml de sangue 165 pacientes) continuaram no braço B, as pacientes que se mantiveram com ≥ 5 CTCs/7,5ml de sangue (123 pacientes) foram randomizadas para continuar no mesmo protocolo quimioterápico (braço C1, 64 pacientes) ou iniciar outro tratamento (braço C2, 59 pacientes). Não houve diferença estatisticamente relevante no tratamento dos braços C1 e C2 na SLP (mediana, 3,5 vs. 4,6 meses, $p = 0.64$) e SG (mediana 10,7 vs. 12,7 meses, $p = 0.98$). Comparando os três braços, houve diferença estatisticamente relevante nas SLP e SG entre os pacientes do braço A, braço B e braço C (SLP mediana 11,1, 8,9 e 4,9 meses, respectivamente, $p < 0.001$; SG mediana, 35 23 e 13 meses, respectivamente, $p < 0.001$), demonstrando o valor prognóstico da contagem de CTCs.

1.5 CTC E IMAGEM RADIOLÓGICA

Na tentativa de usar as CTCs no monitoramento clínico de pacientes com câncer de mama metastático, HAYES et al. (2006) avaliaram o número de CTCs antes do início do tratamento e depois de 3 a 5, 6 a 8, 9 a 15 e 15 a

20 semanas de tratamento em 177 pacientes. O número de CTCs foi comparado aos achados radiológicos por tomografia computadorizada. As CTCs foram detectadas pelo *CellSearch System* e o ponto de corte utilizado foi ≥ 5 CTCs/7,5ml sangue. As pacientes que apresentaram resposta ao tratamento (antes do tratamento, ≥ 5 CTCs/7,5ml e durante o percurso do tratamento < 5 CTCs/7,5ml; mediana SG 19.8 meses; 95% IC 14.6 a >25) apresentavam o mesmo risco de morte que aquelas pacientes que nunca excederam 5 CTCs/7,5ml de sangue nas contagens (mediana SG 22.6 meses; 95% IC 20.5 a >25). Os resultados do estudo mostraram que, em qualquer tempo de seguimento onde as CTCs foram avaliadas, elas foram capazes de prever o resultado clínico, demonstrando que os pacientes que apresentaram < 5 CTCs/7,5ml antes do tratamento, ou apresentaram este valor no decorrer do tempo analisado, responderam ao tratamento proposto. Este estudo mostrou que as CTCs poderiam ser utilizadas para determinar quando um tratamento está sendo benéfico aos pacientes, antes do início da toxicidade secundária ou apresentação de sinais de progressão, que podem demorar meses ou diversos ciclos de quimioterapia para aparecer nos exames radiológico e físico e/ou pelos marcadores séricos.

Reforçando o estudo de HAYES et al. (2006), GRADILONE et al. (2011), em estudo com câncer de mama metastático, demonstraram que a presença de ≥ 5 CTCs/7,5ml de sangue periférico foi fator de pior prognóstico independente e que a avaliação sérica das CTCs ao longo do tratamento pode fornecer uma previsão da evolução clínica comparado aos exames radiológicos. Mostraram ainda que a caracterização molecular,

estudo de resistência à droga citotóxica, célula tronco tumoral, expressão de HER2 e receptores de estrógeno e progesterona, são cruciais para a personalização do tratamento.

Em estudo do nosso grupo de pesquisa de CHINEN et al. (2013), o exame de imagem (tomografia computadorizada) foi comparado à contagem de CTC por dois métodos diferentes, MACS *Miltenyi*® e ISET, em uma paciente diagnosticada com CPNPC metastático, antes do primeiro ciclo e do terceiro ciclo de quimioterapia (paclitaxel e carboplatina). A contagem de CTCs antes do primeiro ciclo de quimioterapia foi 26,7 CTCs/ml pelo método Miltenyi e 73,5 CTCs/ml pelo método ISET. Após o terceiro ciclo de quimioterapia, a paciente apresentou progressão tumoral, mostrando que a quimioterapia não foi eficaz no controle da doença. Na detecção de CTCs, foram observadas 0,65 CTC/ml pelo método Miltenyi e 128 CTCs/ml pelo método ISET. Essa diferença da contagem de CTCs entre as duas metodologias empregadas pode ser explicada pela TEM, já que o Miltenyi depende de marcadores epiteliais para a detecção das CTCs. As CTCs detectadas pelo ISET apresentavam marcação positiva para N – caderina e falta de marcação de E – caderina, demonstrando fenótipo mesenquimal, consequentemente, maior poder de migração e invasão das CTCs. A evolução clínica foi coerente com a contagem feita pelo ISET, mostrando aumento do número de CTCs, expressão de marcadores mesenquimais e progressão tumoral que a paciente demonstrou em seguida, com detecção de novas lesões (pulmonar e pleural). Este resultado mostra que a cinética

de CTC detectada pelo sistema ISET é compatível com o achado de imagem.

1.6 CTC E TRANSPORTADORES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA ÀS DROGAS

A principal causa de morte por câncer é, indubitavelmente, o aparecimento de metástase, o que demonstra que a quimioterapia sistêmica é geralmente ineficaz, particularmente no controle do processo metastático (GAZZANIGA et al. 2010).

Os mecanismos de resistência aos agentes citotóxicos podem ser divididos em intrínsecos, onde os fatores de resistência são preexistentes, provocando ineficácia da terapia no começo do tratamento, ou adquiridos, onde inicialmente o tumor é sensível à droga citotóxica e, por meio de mecanismos de resposta adaptativa, o tumor adquire resistência após a exposição ao agente citotóxico. Nos mecanismos intrínsecos, encontram-se o microambiente tumoral, estroma celular e mecanismos como TEM e célula-tronco tumoral (CTT) Entre os mecanismos adquiridos pelo tumor, encontram-se o efluxo da droga citotóxica (do inglês, *multidrug-resistance-related proteins* [MRPs]), insensibilidade à indução de apoptose induzida pela droga citotóxica e mecanismo de desintoxicação da droga (GAZZANIGA et al. 2010; WANG et al. 2011; HOLOHAN et al. 2013).

Existem diversos mecanismos de resistência à droga presentes no câncer de pâncreas, como por exemplo, expressão gênica aberrante,

mutações genéticas, desregulação em vias chaves de sinalização, TEM, estroma celular e presença de células-tronco tumoral (CTT) (WANG et al. 2011; LONG et al. 2012).

O valor prognóstico das CTCs em diferentes malignidades epiteliais sugere que estas sejam importantes na progressão tumoral e metástase. Contudo, algumas questões permanecem não resolvidas, principalmente as referentes ao tipo de terapia que poderia ser adotada quando os níveis de CTCs aumentassem no decurso do tratamento. Uma solução hipotética poderia ser a troca para um regime quimioterápico diferente ou a adição de novos agentes. Mas quais agentes e quais regimes? E de acordo com quais regras? (GAZZANIGA et al. 2008). Outra pergunta continua em aberto: As CTCs podem ser usadas para individualizar as decisões terapêuticas (BEAR 2008)?

Um trabalho realizado por GAZZANIGA et al. (2010) tentou responder a esta questão da individualização por meio da caracterização do padrão de resistência às drogas das CTCs, tendo como base um painel de expressão de transportadores envolvidos na resistência aos quimioterápicos padrões.

Este grupo focou o estudo nas proteínas relacionadas à MDR mais comumente usadas nos tumores sólidos. Foram avaliadas as seguintes proteínas: MRP1 (envolvida na resistência à antraciclinas, alcalóides da vinca, metotrexato, imatinibe, irinotecano, topotecano), MRP2 (semelhante a MRP1, com exceção da cisplatina), MRP4 (resistência ao metotrexato, ao irinotecano e ao topotecano), MRP5 (resistência ao 5-fluorouracil (5-FU), à cisplatina e ao metotrexato), MRP7 (resistência aos taxanos e aos alcalóides

da vinca). Como gencitabina não é substrato para MRPs, foram incluídos dois genes associados ao seu transporte e metabolismo: Hent1 (do inglês, *human equilibrative nucleoside transporter-1*) e dCK (do inglês, *deoxycytidine kinase*). Foram analisados pacientes com tumores sólidos (n=105; com os seguintes tipos de tumores: 18 colorretal, 46 bexiga 14 mama 10 câncer de pulmão não-pequenas células (CPNPC), 4 estômago, 4 ureter, 5 ovário, um esôfago e três cabeça e pescoço) antes do início da quimioterapia sistêmica, com intuito de prever o perfil de sensibilidade das CTCs. Os resultados não foram disponibilizados para os médicos e nem para os pacientes. O perfil de resistência às drogas nas CTCs correlacionou-se com SLP e sobrevida livre de doença em 24 meses ($p < 0,001$). De acordo com a resposta clínica, 21/32 pacientes em estágio IV apresentaram progressão de doença e dentre eles, o ensaio de quimiosensibilidade mostrou resistência em 20/21 e sensibilidade foi encontrada em 1/21. No grupo dos 11 pacientes com doença metastática com quadro estável, o ensaio de sensibilidade mostrou uma predição de resposta de 100%. Assim, o teste de resistência foi capaz de prever a resposta ao tratamento em 98% dos pacientes, com 100% de especificidade. Nenhuma amostra de paciente saudável foi positiva para CTC. Os valores preditivos positivo e negativo encontrados foram de 96,5 e 100%, respectivamente.

Em estudo realizado por GRADILONE et al. (2011), com mulheres portadoras de câncer de mama metastático (n=44), 28 (67%) tiveram a presença de CTCs detectada. Após pesquisa da expressão de MRPs por meio de RT-PCR nessas células, foi possível classificar as pacientes em

“resistentes” (19 pacientes), se expressassem marcação positiva para MRP, ou “sensíveis” (9 pacientes), caso não expressassem. As pacientes classificadas como “resistentes” apresentaram pior SLP comparadas ao grupo com “sensibilidade” (5.4 vs. 19.5 meses; $p < 0,001$). A expressão de dois ou mais MRPs (19/28, 68% dos pacientes) foi fator de pior prognóstico, quando comparada aos pacientes com nenhuma ou uma expressão de MRP (9/28, 32% dos pacientes) na SLP (7.05 vs. 16.44 meses; $p = 0.004$). Este estudo demonstra que a caracterização molecular da CTC é imprescindível para distinguir subpopulações de CTCs, podendo futuramente ser utilizada no monitoramento da eficácia da terapia sistêmica.

1.7 GENES DE RESISTÊNCIA ÀS DROGAS

O tumor pâncreas possui como base de tratamento quimioterápico a gencitabina. A gencitabina (2' 2'- difluorodeoxicitidina) é um antimetabólito pirimidínico com analogia estrutural com deoxicitidina. É altamente hidrofóbico, o que faz com que necessite de transportadores ativos para entrar nas células, como Hent1, por exemplo. Uma vez dentro da célula, a gencitabina pode ser convertida em sua forma inativa 2' 2'- difluorodeoxiuridina pela citidina deaminase ou fosforilada pela dCK a dFdC-5'-difosfato e aos metabólitos ativos difosfato e trifosfato (PLUNKETT et al. 1995). Entretanto, apesar de alguns estudos feitos com estes metabólitos e enzimas, tentando mostrar sua correlação com resistência/sensibilidade, dados confirmatórios ainda são necessários.

Nos últimos tempos, a combinação baseada em oxaliplatina, 5-FU, irinotecano e ácido fólico, tem beneficiado os pacientes com tumores de pâncreas metastáticos com um ganho de SG e SLP (GRESHAM et al. 2014). No entanto, mutações nos genes que codificam enzimas de reparo de DNA e ALDH podem influenciar a atividade e toxicidade destes quimioterápicos. Pode ocorrer a modulação da resposta e toxicidade a 5-FU por meio da variabilidade nos genes que codificam diidropirimidina desidrogenase, envolvida no metabolismo de 5-FU, timidilato sintase (TYMS), que é alvo do 5-FU e metilenotetraidrofolato redutase, que converte 5,10-metilenotetraidrofolato em 5-metiltetraidrofolato (BOIGE et al. 2010).

O mecanismo de ação do 5-FU pode variar dependendo da dose e da forma de administração. A infusão contínua resulta no anabolismo de 5-FU, formando principalmente o FdUMP, que age como um forte inibidor da ligação de TYMS, inibindo assim a síntese de DNA (SOMMER e SANTI 1974). O tratamento em *bolus* favorece o anabolismo em FUTP e sua incorporação no RNA, que interfere com o processamento normal do pré-RNA^r. Dessa forma, a resistência relacionada ao modo de administração do 5-FU pode envolver diversos fatores e isso é consistente com o fato de que linhagem de células de carcinoma de cólon resistentes ao tratamento com 5-FU em *bolus* permanecem sensíveis à exposição contínua. Um mecanismo comum de resistência clínica ao *bolus* e à infusão está relacionado ao aumento dos níveis de TYMS e sua inibição. TYMS é uma enzima importante na síntese “de novo” de dTMP, um precursor essencial de DNA, que catalisa a metilação de dUMP (deoxi-uridina monofosfato) a deoxi-

timidina monofosfato (SOMMER e SANTI 1974). TYMS é o alvo das fluoropirimidinas. A quantidade intrínseca de TYMS parece ser um preditor de resposta dos pacientes ao 5-FU.

Após a exposição ao agente citotóxico, uma das medidas tomadas para a adaptação e a sobrevivência celular é a alteração do alvo da droga, mudando o sítio de ligação por mutação ou alteração no nível de expressão. Neste mecanismo de resistência, a célula aumenta a expressão de TYMS, levando a uma menor eficácia da ação citotóxica (HOLOHAN et al. 2013; LIMA et al. 2013; NIERO et al. 2014).

Altos níveis de expressão de TYMS em pacientes com câncer colorretal em estágio inicial parecem predizer SG ruim tanto em pacientes tratados quanto em não tratados com quimioterapia após cirurgia. Ainda, pacientes com câncer colorretal metastáticos com altos níveis de TYMS não respondem ao tratamento infusional com 5-FU, enquanto aqueles com baixos níveis apresentam melhores taxas de resposta (KIM et al. 2009; CALASCIBETTA et al. 2010). Contudo, apesar de muitos estudos relatarem SG ruim em tumores com alta expressão de TYMS, o real valor prognóstico desta enzima ainda não está estabelecido.

Em outro trabalho do nosso grupo (ABDALLAH et al. 2015), o foco da pesquisa foi a expressão de TYMS nas CTCs em pacientes com câncer colorretal metastático, com terapia baseada em 5-FU. Dos 34 pacientes em que foi possível realizar o teste, 9 expressaram TYMS nas CTCs. Houve correlação estatisticamente significativa entre a presença de CTC e expressão de TYMS ($p = 0,042$). O mesmo não foi verdadeiro quando

avaliou-se a expressão de TYMS no tumor primário e nas metástases. Este resultado mostra que a expressão de TYMS nas CTCs tem potencial como biomarcador de resistência ao 5-FU.

Topoisomerase I (TDP1A) é uma enzima que tem papel fundamental no controle da topologia do DNA. Drogas antineoplásicas que têm como alvo a Topo I, como campotecinas ou etoposídeos, formam complexos estáveis Topo I-DNA, impedindo a atividade da enzima Topo I em se religar com DNA (NITISS e WANG 1996). Contudo, o papel da expressão de Topo I em pacientes submetidos às terapias que têm como alvo esta enzima ainda não foi determinado. KOSTOPOULOS et al. (2009), em estudo com 498 pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia adjuvante à base de 5-FU sozinho ou associado a irinotecano (38% dos casos), observaram por imunistoquímica uma expressão de TYMS e de Topo I em 43% e 48 % dos casos, respectivamente. Pela análise univariada, nenhuma correlação entre expressão de TYMS e de Topo I foi encontrada com SG e SLP. Entretanto, pela análise multivariada, a expressão de Topo I associou-se com risco reduzido de morte (HR= 0,61, IC95% 0,42-0,88; $p= 0.009$). No subgrupo de pacientes tratados com irinotecano, aqueles que expressavam Topo I tiveram melhor SG (HR= 0,47, IC95% 0,23-0,94; $p = 0.033$). Outro trabalho realizado também com TYMS, mas associada a outras proteínas (ERCC1 e GST) foi realizado por KIM et al. (2009). Este grupo selecionou 70 pacientes com câncer colorretal metastático e analisou a expressão das proteínas por imunistoquímica. ERCC1, TYMS e GST (glutathione-S-transferase) foram encontradas em 55,7%, 68,8% e 71,4% dos casos,

respectivamente. Pacientes sem expressão de TYMS responderam melhor à quimioterapia ($p = 0.009$). A SG mediana foi maior em pacientes sem expressão de ERCC1 ($p = 0.047$). Pacientes positivos para ERCC1 e TYMS ou positivos para as três proteínas pesquisadas tiveram pior SG ($p = 0.0017$ e $p = 0.032$). A análise multivariada mostrou que tanto ERCC1 quanto TYMS tiveram impacto significativo na SG (HR= 1,72; $p = 0.023$).

Considerando o mecanismo de ação dos derivados da platina, estudos têm avaliado o papel de enzimas envolvidas no reparo de DNA como possíveis preditores de sensibilidade ou resistência a estas drogas, como ERCC1 (do inglês, *Excision Repair Cross-Complementation group 1*) e BRCA1 (*Breast Cancer 1*). Alguns estudos têm mostrado uma melhor resposta para pacientes com baixos níveis de ERCC1 medidos por RT-PCR, sugerindo que quantidades reduzidas desta enzima afetam a capacidade das células de reparar os danos causados pela droga ao DNA (LORD et al. 2002; CEPPI et al. 2006).

KANG et al. (2010) avaliaram o padrão de expressão de ERCC1, BRCA1, XRCC1 e β III-tubulina por imunoistoquímica em espécimes cirúrgicos de 82 pacientes com CPNPC que fizeram tratamento neoadjuvante com quimioterápicos baseados em platina e taxanos. Os níveis de ERCC1, BRCA1 e XRCC1 aumentaram proporcionalmente aos níveis de morte celular ($p < 0.05$), já os de β III-tubulina não se correlacionaram com a viabilidade celular. Pela análise multivariada, estágio patológico inicial, quimioterapia adjuvante, altos níveis de expressão de

ERCC1 e baixos de β III-tubulina foram bons fatores prognósticos para SG ($p < 0.05$).

Como se pode observar, há alguns estudos mostrando correlação entre expressão de genes de resistência/sensibilidade às drogas e resposta à terapia, mas raríssimos (SOMLO et al. 2011) mostram essa expressão nas CTCs e as correlaciona com a expressão no tumor.

1.8 CTC E A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA

As CTCs podem entrar na corrente sanguínea de duas formas: por um derramamento passivo de células pelo tumor primário ou através do mecanismo de TEM. O derramamento passivo de células do tumor primário acontece em larga escala, em estágios iniciais da formação tumoral (TJENSVOLL et al. 2014).

Na TEM, a célula perde o fenótipo epitelial, adquirindo morfologia fibroblástica, alongada, diminuindo a adesão célula – célula e célula – matriz extracelular e modificando estruturalmente o citoesqueleto. Estas alterações fornecem às células mobilidade, migração e poder de invasão e resistência à apoptose. Acredita-se que a TEM seja imprescindível para a invasão e metastização dos tumores epiteliais, além de promover um importante mecanismo de resistência a drogas citotóxicas, como por exemplo, a resistência à gencitabina no câncer de pâncreas e dos inibidores de EGFR no CPNPC (ELLENRIEDER et al. 2001; WANG et al. 2011; BONNOMET et al. 2012; CEN et al. 2012; LONG et al. 2012; HOLOHAN et al. 2013).

A família da caderina é o principal grupo molecular envolvido na TEM. Para a célula adquirir fenótipo mesenquimal, as células epiteliais diminuem a regulação da E – caderina (caderina epitelial) e citoqueratinas e aumentam a regulação de marcadores mesenquimais, como a N – caderina (caderina mesenquimal), vimentina e fibronectina. Além disso, as células epiteliais aumentam a atividade da metaloproteinases (MMPs) e do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), que são os principais responsáveis pela degradação da matriz extracelular, alterando, assim, a adesão celular (matriz extracelular), capacitando as células cancerígenas a penetrarem no tecido e a invadirem-no. A ativação da uPA está associada a um pior prognóstico em câncer de mama. As células podem se desprender do tumor isoladamente ou em MEs. Estes MEs mostram-se mais eficazes na invasão linfática ou venosa e na sobrevivência na corrente sanguínea (ARUMUGAM et al. 2009; MEGO et al. 2010; WANG et al. 2011; LI et al. 2013).

Não se entende completamente o mecanismo molecular da TEM na progressão tumoral e resistência a drogas citotóxicas. Acredita-se que diversos fatores de transcrição (TWIST, SNAIL, SLUG, ZEB1 e ZEB2) e vias de sinalização (Wnt, TGF- β , Hedgehog, Notch e NF- κ B) estão envolvidas na indução da TEM. Dentre essas vias de sinalização, o TGF β -R (do inglês, *Transforming Growth Factor Beta receptor*) tem um importante papel na carcinogênese pancreática nos estágios avançados da doença. O TGF- β promove o espalhamento celular, migração, angiogênese e invasão tumoral, além de aumentar a expressão e ativação da MMP2 e uPa. Em linhagens celulares deste tumor, já foi evidenciada a importância do TGF- β para a

indução da TEM, podendo ser o mecanismo que o TGF- β utiliza para contribuir com a progressão tumoral. A via de sinalização NOTCH ganha evidência por desempenhar importante função na aquisição da TEM e promover o fenótipo de célula tronco tumoral (CTT). O aumento da regulação dessa via foi correlacionado com resistência à gencitabina, evidenciando que a via de sinalização NOTCH no câncer pancreático promove a resistência à droga citotóxica por meio da TEM (ELLENRIEDER et al. 2001; ARUMUGAM et al. 2009; WANG et al. 2011; BONNOMET et al. 2012; LONG et al. 2012; LI et al. 2013).

Para o desenvolvimento de novas terapias alvo, é crucial o entendimento do mecanismo de resistência à droga citotóxica. Novas terapias capazes de eliminar células com fenótipo TEM e CTT são cruciais, revertendo a resistência tumoral, permitindo uma melhor resposta ao tratamento por aumentar a sensibilidade tumoral às drogas citotóxicas (WANG et al. 2011; HOLOHAN et al. 2013).

A perda da expressão de marcadores epiteliais e o aumento de marcadores mesenquimais já foram correlacionados como um pior prognóstico para diversos tumores, como mama, CPNPC, colorretal, fígado, entre outros (ARUMUGAM et al. 2009; HOLOHAN et al. 2013). Em estudo *in vitro* com modelos xenográficos transplantados com linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-468), BONNOMET et al. (2012) demonstraram que o tumor primário é heterogêneo e que apresenta diversas regiões em TEM. Estes autores verificaram expressão de vimentina (marcador mesenquimal) no tumor primário, nas CTCs e na metástase. As CTCs

apresentaram alta expressão de vimentina, demonstrando que a TEM, uma importante ferramenta para a heterogeneidade do tumor primário, pode estar envolvida no extravasamento celular do tumor, contribuindo diretamente para a metástase. Ainda, esses autores correlacionaram a presença de TEM ao subtipo de câncer de mama com pior prognóstico (triplo negativo).

No câncer de pâncreas, diversos estudos mostram a importância da TEM para a resistência tumoral aos agentes citotóxicos. ARUMUGAM et al. (2009) utilizaram dez linhagens celulares de câncer pancreático para verificar a morfologia e característica das células que seriam resistentes às drogas citotóxicas. Das 10 linhagens, 5 apresentaram sensibilidade (HPDE, L3.6pl, BxPC3, CFPAC, SU86.86) e 5 foram resistentes (PANC-1, Hs766T, AsPC-1, MIAPaCa-2, MPanc96), levando em consideração o nível de apoptose estimulado por 10 μ M de gencitabina. A morfologia das células sensíveis era homogênea enquanto a das células resistentes era irregular, mostrando um fenótipo mesenquimal. Nos marcadores de TEM, houve correlação inversamente significativa ($p = 0.006$) entre E – caderina e Zeb – 1, confirmando que as células com fenótipo epitelial têm alta expressão de E – caderina e não expressam Zeb – 1 e vimentina, e as células com fenótipo mesenquimal não expressavam E – caderina e têm alta expressão de Zeb – 1 e vimentina e são resistentes às drogas citotóxicas. Em ensaio de migração, as células mesenquimais migraram mais que as epiteliais. Para verificar a importância do Zeb – 1 na resistência tumoral, o Zeb – 1 foi silenciado nas linhas celulares que apresentavam resistência à droga citotóxica. Houve um aumento dos marcadores epiteliais e

consequentemente aumento da apoptose dessas células quando expostas a gencitabina, 5-FU e cisplatina. Estes dados confirmam a importância da TEM na resistência à droga citotóxica.

LI et al. (2013) fizeram um estudo com o objetivo de avaliar a correlação da CTC com TEM no câncer hepático. Na análise das CTCs, utilizaram técnica de imunofluorescência (miniMACS Milteny®). A presença de CTC foi estatisticamente relevante nos pacientes com trombose portal por tumor ($p < 0.001$), estágio III e IV da doença ($p = 0.005$) e tamanho tumoral ($p < 0.001$). Nos pacientes que realizaram ressecção tumoral ou quimioembolização, os que tinham CTC positiva, apresentaram recorrência tumoral ou metástase ($p = 0.002$) e mortalidade ($p = 0.007$) maior do que os que não tinham CTC no sangue periférico após um ano da primeira coleta. A expressão da vimentina e twist (marcadores mesenquimais) foi estatisticamente significativa nos pacientes com trombose portal por tumor ($p = 0.0003$, $p < 0.001$, respectivamente). Além disso, a expressão da vimentina também foi correlacionada ao tamanho tumoral maior ($p < 0.001$). Em análise imunoistoquímica, a expressão de vimentina, twist e ZEB1 foi significativa maior no tumor hepático do que em outras doenças hepáticas ($p = 0.002$, $p < 0.001$, $p = 0.016$, respectivamente). Os tumores que expressavam E – caderina ($p = 0.001$) não expressavam vimentina e twist ($p = 0.020$) e a expressão de E-caderina era baixa nos pacientes com trombose portal por tumor ($p = 0.007$), demonstrando a importância da TEM na disseminação de células tumorais do tumor primário.

No câncer de próstata, PAL et al. (2015) utilizaram o *CellSearch System* para correlacionar o aparecimento das CTCs e expressão de marcadores da TEM nestas células. Incluíram pacientes com alto risco de recidiva local pós prostatectomia radical, coletando sangue periférico duas semanas antes, no ato cirúrgico, um mês e três meses depois do procedimento cirúrgico. Nenhum paciente (n = 34) apresentava metástase à distância (comprovados por exames de imagem) no momento da primeira coleta de sangue, contudo, alguns apresentaram CTCs (mediana = 0 em todos os pacientes; mediana = 2 nos pacientes que apresentaram CTCs) pós-procedimento cirúrgico. Segundo os autores, a presença de CTC pode refletir a presença de micrometástases ocultas. Além disto, as CTCs com fenótipo mesenquimal e de CTT teriam uma maior agressividade para causar metástase. Neste estudo não foi possível correlacionar o número de CTCs e marcadores de superfície para TEM e CTT no grupo de alto risco de recidiva de câncer de próstata pós-prostatectomia. A falta de significância para os achados desse estudo, segundo os autores, foi o número limitado da amostra. Outra possível causa foi a plataforma de detecção utilizada no estudo, que pode não captar as células em TEM, já que é dependente exclusivamente de marcadores epiteliais para a captura das CTCs.

As CTCs podem apresentar perda de marcadores epiteliais, adquirindo o fenótipo mesenquimal através da TEM. O *CellSearch System* depende da expressão de marcadores epiteliais, como citoqueratina e EpCAM, portanto, se as CTCs estiverem em TEM, o sistema não será capaz de captá-las. A TEM pode ser uma das explicações pela grande diferença

que há no número de CTCs coletadas pelos diferentes métodos de identificação. Por este motivo, a detecção de CTC não pode ser baseada exclusivamente pela marcação positiva de citoqueratinas ou outros marcadores epiteliais (KHOJA et al. 2012; REN et al. 2013). Mas, para BIDARD et al. (2013), apesar de saberem da relevância da TEM no câncer de pâncreas e as limitações do *CellSearch System*, as células epiteliais identificadas conseguem demonstrar um real impacto no curso da doença.

Deste modo, o uso das CTCs pode ajudar a determinar os pacientes que apresentarão melhor prognóstico clínico, além de ser um possível biomarcador específico para neoplasias malignas utilizado para avaliar a resposta ao tratamento quimioterápico.

O adenocarcinoma de pâncreas tem alta letalidade, poucos pacientes descobrem a doença em estágio inicial e a resistência à droga citotóxica é um dos principais fatores para a progressão da doença. A falta de um marcador específico pode dificultar a conduta clínica na análise de resposta ao tratamento quimioterápico.

Portanto, este presente trabalho teve como base determinar a importância das CTCs na resistência às drogas citotóxicas, seu impacto nas SLP e SG e seu uso como biomarcador específico para o câncer de pâncreas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Correlacionar o número de CTCs no sangue periférico de pacientes com tumor de pâncreas localmente avançado ou metastático com características clínicas da população estudada, resposta ao tratamento e sobrevidas livre de progressão e global.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Correlacionar os níveis de CTCs com os exames radiológicos;
- Observar a correlação entre a expressão de transportadores (MRP1, MRP2, MRP4, MRP5, dCK), genes de resistência às drogas (ERCC1 e TYMS) e a expressão de genes da transição epitélio-mesênquima (vimentina, TGF β -R e MMP2) nas CTCs e a sobrevida livre de progressão e global.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Este trabalho foi realizado no A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brasil. Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição **(Registro CEP nº 1367/10; Anexo 1)**. Foi um estudo prospectivo e quantitativo. A amostra foi recrutada por conveniência consecutiva. Foram incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de pâncreas localmente avançado ou metastático, comprovado radiologicamente por meio de tomografia computadorizada ou ressonância magnética, que estavam iniciando o tratamento sistêmico ou apresentaram progressão tumoral e que não realizaram nenhum procedimento cirúrgico quatro dias antes das coletas.

Após assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, eram realizadas três coletas de 8ml de sangue periférico, do início do tratamento sistêmico e as outras duas com intervalo de 40 e 80 dias da primeira coleta. Este período entre as coletas foi proposto levando em consideração que o paciente realizaria dois ciclos de quimioterapia e não estaria na vigência de droga citotóxica na próxima coleta por no mínimo uma semana. Na segunda e terceira coleta não foram considerados o dia e o ciclo de quimioterapia em que o paciente estava. Os dados clínicos levantados por meio do prontuário que foram correlacionados com os níveis de CTCs/ml foram: sexo, idade,

estadiamento tumoral, TNM, nível sérico de CA 19,9 e grau histológico. Os critérios RECIST foram considerados para determinar progressão.

3.2 MÉTODOS

As coletas de amostras de sangue (8 mL) foram realizadas em tubo de EDTA. As amostras foram armazenados em temperatura ambiente por até quatro horas sob homogeneização e processadas no sistema ISET® (*Rarecells Diagnostics*, Paris, França), de acordo com as instruções do fabricante.

O ISET permite isolar as CTCs de forma intacta do sangue por meio de filtragem direta sem o uso de anticorpos. Esta metodologia explora o tamanho da CTC em comparação com os leucócitos que são menores, utilizando uma membrana de policarbonato com poros cilíndricos com oito micrometros de diâmetro. Foi considerada CTC a célula que apresentasse os seguintes critérios: tamanho nuclear igual ou maior que 16µm, irregularidade do contorno nuclear, presença de citoplasma visível, alta proporção núcleo-citoplasma ($> 0,8$) e marcação positiva para CD44 (KHOJA et al. 2012; KREBS et al. 2012).

As imagens obtidas dos resultados desta técnica foram feitas usando um microscópio de luz (*Axioskop 40 -Carl Zeiss*, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (*Sony Cyber-shot DSC- S75*).

Embora o ISET seja usado apenas para pesquisa, ele foi submetido a validações técnica (VONA et al. 2004; KREBS et al. 2012) e clínica

(HOFMAN et al. 2012; MAZZINI et al. 2014), mostrando seu valor prognóstico em pacientes com estágio inicial e tardio de CPNPC. Nós também relatamos a sua vantagem, comparando a um teste marcador-específico (Miltenyii) e demonstramos que a detecção de CTCs pelo ISET tem potencial para dar evidências da progressão de um câncer de pulmão metastático antes da progressão tornar-se evidente em exames de imagem (CHINEN et al. 2013).

O Protocolo de filtração do ISET utilizava 8 ml de sangue periférico que poderia ficar até 4 horas em homogeneização. Cada amostra (4ml de sangue no tubo de EDTA) era transferida para um tubo falcon e completado com solução preparada na hora do uso, tampão e formaldeído (71 ml de tampão e 1,6ml de formaldeído, com pH a 7,3) até um volume total de 40 ml em cada tubo falcon. Esta solução era incubada por 10 minutos no homogeneizador. Durante a homogeneização, o ISET era ligado e testado com PBS na pressão de - 10. Após o teste, o bloco com as iniciais do paciente era encaixado, a amostra era distribuída uniformemente e era filtrada a uma pressão de -10, logo após sendo despejado PBS no bloco para nova filtração. Após filtração, o bloco era retirado do aparelho e a membrana seca por 10 minutos no escuro. Após secagem, a membrana era embrulhada em papel laminado e congelada a -20 °C.

3.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE GENES DE RESISTÊNCIA/SENSIBILIDADE ÀS DROGAS, TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL E CÉLULA TRONCO TUMORAL

Foram realizados testes de imunocitoquímica nas CTCs para verificar a expressão proteica de genes codificadores de resistência/sensibilidade às drogas relacionadas aos tratamentos propostos. As terapias propostas envolviam as seguintes drogas citotóxicas: irinotecano, oxaliplatina, 5-FU e gencitabina. Para cada droga citotóxica foi escolhido um marcador (Quadro 1).

A célula em TEM é fator que influencia na resistência às drogas citotóxicas. Para definir o fenótipo celular, utilizamos três marcadores mesenquimais, vimentina, MMP2 e TGF β -R. Para cada anticorpo utilizado neste estudo, foi determinada uma concentração específica (Quadro 1).

Quadro 1 - Anticorpos utilizados, indicação, concentração adotada, fabricante e especificações

Anticorpo	Indicação	Expressão	Diluição	Fabricante	Especificações
MRP1	Irinotecano	Demonstra resistência por mecanismo de fluxo da droga citotóxica dentro da célula (WANG et al. 2011).	1/100	Sigma	Policlonal. Código: HPA002380.
MRP2			1/100	Sigma-Aldrich	Policlonal. Código: HPA004860
MRP4			1/100	Sigma	Policlonal. Código: HPA002476
MRP5	5FU Oxaliplatina	Marcador de resistência a drogas citotóxicas da platinas (GAZZANIGA et al. 2010).	1/100	Sigma-Aldrich	Monoclonal, clone: M5I-1. Código: M6067
ERCC1	Oxaliplatina	Marca resistência a droga citotóxica (LORD et al. 2002; CEPPI et al. 2006).	1/100	Sigma-Aldrich	Policlonal. Código: SAB4500795
TYMS	5FU	Marca resistência a droga citotóxica (KIM et al. 2009; CALASCIBETTA et al. 2010).	1/230	Sigma-Aldrich	Monoclonal, clone 3A1. Código: WH0007298M1.
dCK	Gencitabina	Demonstra sensibilidade ao agente citotóxico (GAZZANIGA et al. 2010).	1/500	Sigma-Aldrich	Código: D4695
CD45	Leucócito	Marcador de todas as células leucocitárias (BYDLOWSKI et al. 2009)	1/100	Sigma-Aldrich	Policlonal. Código: M7165
MMP2	TEM	Implica na invasão tumoral e metastase através da degradação da matriz extracelular (PEREIRA et al. 2014)	1/100	Sigma	Código: M4065
TGFβ-R		TGF-β em tumores avançados pode provocar a EMT (LISZKA 2014)	1/100	Sigma-Aldrich	Código: SAB4502958
Vimentina		Encontrado como marcador mesenquimal (XIAO et al. 2015)	1/100	Dako	Monoclonal, clone: V9. Código: M0725

Cada membrana do ISET apresenta 10 *spots*, cada *spot* foi cortado e colocado em uma placa de 24-*wells*. Após uma série de hidratação e banhos com tampões específicos e bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, o primeiro anticorpo escolhido foi incubado por uma hora. Depois deste período, foi adicionado *Dual Long System HRP (Envision™ Fix Dako)* e realizada a coloração com DAB (Dako®). Após a coloração, foi colocado o segundo anticorpo escolhido, incubado por mais uma hora e adicionados *Rabbit/mouse (Link) (Kit Envision™ sistem/AP)* e *AP Enzyme (Enhancer™)*. Para a coloração do segundo anticorpo, utilizamos *Permanet Red* (Dako®). Quando secos, os *spots* foram colocados nas lâminas para leitura.

Para avaliação e distinção das CTCs de glóbulos brancos (leucócitos) contaminantes, além de análise citomorfológica, foi utilizada imunocitoquímica com dupla marcação (DAB+/Permanet Red; Dako®) dos seguintes anticorpos: anti-vimentina (1:1.500; clone V9, Dako®), um marcador mesenquimal e o anti-CD45 (1:100; clone 2B11+PD7/26, Dako®), um marcador de superfície de leucócitos.

Para a contagem de CTC, foram utilizados oito *spots* filtrados no ISET (correspondente a 8 ml de sangue), incluindo 4 corados com hematoxilina - eosina, como descrito por KREBS et al. (2012). Os controles positivos e negativos foram realizados para cada coloração IHC. Para controles, foram usados sangue do indivíduo saudável enriquecido com células de linhagem sugerida pelo fabricante de cada anticorpo. Os glóbulos brancos do indivíduo saudável foram utilizados como controle positivo para CD45. Para a reação

negativa, foi utilizado um ponto sem anticorpos. Microêmbolos tumorais circulantes (MEs) foram definidos como grupos ou aglomerados de células tumorais contendo três ou mais núcleos distintos e previamente identificados em pacientes com câncer metastático (HOFMAN et al. 2012).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características demográficas e clínicas foram apresentadas por meio de frequência absoluta e relativa (características qualitativas) ou por meio da média, mediana e valores mínimo e máximo observados (características quantitativas).

Para a análise estatística, categorizamos os valores das CTCs observadas em cada avaliação de acordo com a mediana. Tivemos que avaliar de acordo com a mediana, porque não há ponto de corte seguro estabelecido para contagem de CTCs para o tumor de pâncreas por meio do método que usamos (ISET).

O teste Qui-Quadrado foi utilizado para associar as características demográficas e clínicas com as CTCs categorizadas (acima ou abaixo da mediana) em cada momento de avaliação.

O teste de Kaplan-Meier foi utilizado para obter as estimativas dos tempos de sobrevida em seis meses e em um ano, bem como a estimativa do tempo mediano de sobrevida (global e livre de progressão). O teste Log-Rank foi utilizado para comparar os riscos de óbito/progressão de doença entre grupos.

O nível de significância adotado foi o de 5% e o software IBM SPSS versão 17 foi utilizado nas análises.

4 RESULTADOS

4.1 PACIENTES

Foram incluídos 21 pacientes com adenocarcinoma de pâncreas localmente avançado ou metastático, 10 homens (47,6%) e 11 mulheres (52,4%), com idade mediana de 67 anos (41-84 anos). O estágio IV da doença foi observado em 14 pacientes (66,7%) e o grau histológico predominante foi o “moderadamente diferenciado”, encontrado em 8 pacientes (38,1%). O principal sítio de metástase foi o fígado (9 pacientes - 42,9%). A estratégia terapêutica mais comum no momento da inclusão no estudo foi paliativa (17 pacientes - 81%). Característica basal dos pacientes pode ser vista nas Tabelas 1 e 2. Houve 1 perda de amostra no *baseline*, 6 perdas entre o *baseline* e 1º *follow-up* e 3 perdas entre o 1º *follow-up* e 2º *follow-up* (Quadro 2).

Quadro 2- Número de pacientes analisados em cada coleta

Coleta	Num. de pacientes analisados	Perda da amostra	motivo
<i>Baseline</i>	20	1	falha na análise
1º <i>Follow-up</i>	15	4	óbito
		2	abandono
2º <i>Follow-up</i>	12	2	óbito
		1	abandono

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes recrutados

Característica		n	%
Sexo	Masculino	10	47,6
	Feminino	11	52,4
Idade	< 67	9	42,9
	≥ 67	12	57,1
Estádio	II	3	14,3
	III	4	19,1
	IV	14	66,7
Tamanho Tumoral (T)	2	1	4,8
	3	6	28,6
	4	8	38,1
	sem dados	6	28,6
Comprometimento Linfonodal (N)	0	6	28,6
	1	7	33,3
	sem dados	8	38,1
Metástase (M)	0	4	19,1
	1	8	38,1
	sem dados	9	42,8
Grau Histológico	não avaliado	7	33,3
	bem diferenciado	2	9,4
	moderadamente diferenciado	8	38,1
	pouco diferenciado	4	19,4
Terapia Antineoplásica	gencitabina	6	28,6
	FOLFOX	4	19,0
	FOLFIRI	3	14,3
	FOLFIRINOX	7	33,3
	5FU	1	4,8
Estratégia Terapêutica	Adjuvante	1	4,8
	Neoadjuvante	1	4,8
	Paliativa	17	81,0
	Dados não disponíveis	2	9,4

Tabela 2 - Achados clínicos, proposta de tratamento, número de CTC, Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Progressão dos pacientes pesquisados

Caso	Estádio	T	N	M	Graduação histológica	esquema QT proposto	CTC1 baseline (num/8,5ml)	Ca 19.9	CTC2- 1º follow-up (num/8,5ml)	Ca 19.9	CTC3 - 2º follow-up (num/8,5ml)	Ca 19.9	SLP	SG
C9	II	3	1	0	MD	FOLFIRI	14,96	364,4	37	391,3	16	119,2	1,12	5,2
C16	II					FOLFIRINOX	22,48	3,9					2,34	2,34
C19	II A	3	0	0	MD	FOLFOX	20	794,1	0	554,9	8		15,82	15,82
C4	III	4	1	x	BD	FOLFOX	40		93		6		12,3	17,73
C11	III	4	1	x	BD	FOLFIRINOX	40		8	123,2			6,74	17,04
C2	III	3	1	0		FOLFIRI	194,4	109,4	66		65	1482	3,09	14,14
C8	III	4	x	0	MD	FOLFIRI	20		77				1,91	1,91
C20	IV				MD	FOLFOX	22,48	76,8	27	50,2	0		7,73	11,71
C6	IV					Gencitabina	114		5		5	478,6	3,36	11,12
C5	IV	4	1	1	PD	FOLFIRINOX	0		5		84		3,42	9,05
C1	IV	4		1	PD	FOLFIRINOX	46,4	>10000	175	3826	36	2762	8,26	8,26
C10	IV	4	0	x	MD	Gencitabina	20	>10000	11	7336	8	>10000	3,62	5,59
C17	IV	3	0	1	MD	FOLFIRINOX	16,8	793,3	20		0		2,34	4,08
C12	IV				MD	FOLFIRINOX	24,24	157					3,72	3,72
C7	IV	3	1	1		FOLFOX		>10000	27	>10000	58		1,55	3,62
C14	IV	4	0	1		Gencitabina	5,04		0		0		1,48	3,32
C15	IV	2	0	1	PD	FOLFIRINOX	180	1118	20	1458			2,53	2,53
C18	IV	4	0	1	MD	Gencitabina	7,52	1000					2,47	2,47
C13	IV					Gencitabina	33,28						1,58	1,58
C21	IV					FOLFOX	32,8						1,12	1,12
C3	IV	3	1	1	PD	Gencitabina	17						0,79	0,79

Legenda: BD: Bem diferenciado; PD: Pouco diferenciado; MD: Moderadamente diferenciado

4.2 CONTAGEM DE CTC

Foram realizadas três coletas de CTCs com intervalo de 40 dias entre as coletas. A mediana de CTC detectada pelo sistema ISET no *baseline* foi de 22 CTCs/8ml de sangue (0 – 194,4). No primeiro follow-up a mediana foi de 20 CTCs/8ml de sangue (0 – 175) e, no segundo follow-up, foi encontrada a mediana de 8 CTCs/8ml de sangue (0 – 84). O valor absoluto de cada paciente encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Número de CTCs em 8ml de sangue periférico

Paciente	<i>baseline</i>	<i>1º follow-up</i>	<i>2º follow-up</i>
C1	46,4	175	4,5
C2	194,4	66	8,125
C3	17		
C4	40	93	0,75
C5	0	5	10,5
C6	114	5	0,625
C7		27	7,25
C8	20	77	
C9	14,96	37	2
C10	20	11	1
C11	40	8	
C12	24,24		
C13	33,28		
C14	5,04	0	0
C15	180	20	
C16	22,48		
C17	16,8	20	0
C18	7,52		
C19	20	0	0,94
C20	22,48	27	0
C21	32,8		

4.3 CTC E AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

As CTCs foram correlacionadas com os achados clínicos de cada paciente (sexo, idade, tipo histológico, nível sérico de Ca 19.9, estadiamento tumoral, TNM e grau histológica) nas três coletas. O ponto de corte escolhido para a correlação com os achados clínicos foi a mediana de cada coleta. Não houve diferença estatisticamente significativa, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Correlação dos achados clínicos com o número de CTC

		baseline		total	p								
		< 22,4 (%)	≥ 22,4 (%)			1º follow-up		total	p	2º follow-up		total	p
						< 20 (%)	≥ 20 (%)			< 8 (%)	≥ 8 (%)		
Sexo	Masculino	4 (44)	6 (50)	10	0.85	2 (33)	4 (44)	6	0.91	1 (20)	4 (57)	5	0.49
	Feminino	5 (56)	6 (50)	11		4 (67)	5 (56)	9		4 (80)	3 (43)	7	
Idade	< 67	2 (22)	7 (58)	9	0.10	1 (17)	6 (67)	7	0.17	3 (60)	1 (14)	4	0.30
	≥ 67	7 (78)	5 (42)	12		5 (83)	3 (33)	8		2 (40)	6 (86)	8	
Estádio	II	2 (22)	1 (8)	3	0.54	1 (17)	1 (11)	2	0.77	0 (0)	2 (29)	2	0.42
	III	1 (11)	3 (25)	4		1 (17)	3 (33)	4		1 (20)	1 (14)	2	
	IV	6 (67)	8 (67)	14		4 (67)	5 (56)	9		4 (80)	4 (57)	8	
Ca 19,9	< 793,5	1 (20)	4 (80)	5	0.24	2 (50)	2 (50)	4	>0.99	1 (50)	1 (50)	2	>0.99
	≥ 793,5	4 (66,7)	2 (33,3)	6		2 (66,7)	1 (33,3)	3		1 (33,3)	2 (66,7)	3	
T	2	0 (0)	1 (17)	1	0.44	0 (0)	1 (12)	1	0.30	1 (33)	4 (57)	5	>0.99
	3	4 (44)	2 (33)	6		1 (20)	4 (50)	5		2 (67)	3 (43)	5	
	4	5 (56)	3 (50)	8		4 (80)	3 (38)	7		2 (67)	2 (33)	4	0.81
N	0	5 (62)	1 (20)	6	0.36	3 (60)	2 (33)	5	0.78	1 (33)	4 (67)	5	
	1	3 (38)	4 (80)	7		2 (40)	4 (67)	6		0 (0)	3 (50)	3	0.67
M	0	3 (38)	1 (25)	4	0.83	1 (33)	3 (43)	4	0.67	2 (100)	3 (50)	5	
	1	5 (62)	3 (75)	8		2 (67)	4 (57)	6		2 (40)	2 (29)	4	0.40
Graduação	não avaliado	1 (11)	6 (50)	7	0.06	2 (33)	2 (22)	4	0.94	1 (20)	0 (0)	1	
	bem diferenciado	0 (0)	2 (17)	2		1 (17)	1 (11)	2		2 (40)	3 (43)	5	
	moderadamente diferenciado	6 (67)	2 (17)	8		2 (33)	4 (44)	6		0 (0)	2 (29)	2	
Histológica	pouco diferenciado	2 (22)	2 (17)	4		1 (17)	2 (22)	3					

4.4 CTC E SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA DE LIVRE DE PROGRESSÃO

Não houve diferença estatisticamente relevante na SG quando relacionada à mediana do número de CTCs (Tabela 5, Figura 1). O mesmo aconteceu para a SLP (Tabela 5, Figura 1).

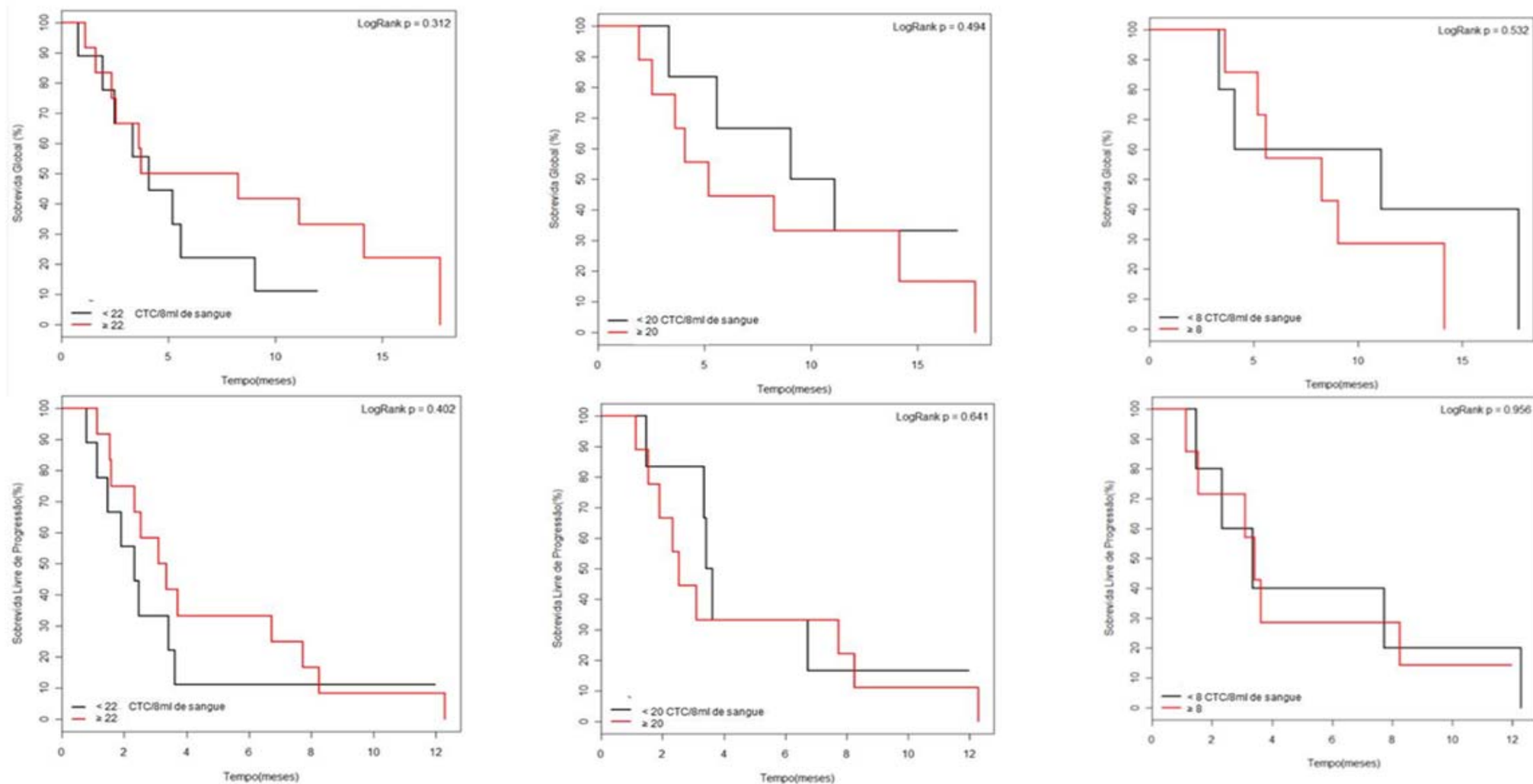


Figura 1 - Curva de Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Progressão na mediana de CTC no *baseline*, 1º *follow-up* e 2º *follow-up*.

Tabela 5 - Correlação da sobrevida global e livre de progressão com a mediana de cada coleta de CTC

		n	SG - 1 ano	Media (meses)	p	SLP - 1 ano	Media (meses)	p
<i>Baseline</i>	< 22	9	11%	4,08	0.31	11%	2,34	0,40
	≥ 22	12	33%	3,72		8%	3,09	
1º <i>follow-up</i>	< 20	6	33%	10,08	0.49	17%	3,52	0,64
	≥ 20	9	33%	5,2		11%	2,53	
2º <i>follow-up</i>	< 8	5	40%	11,12	0.53	20%	3,36	0,96
	≥ 8	7	29%	8,26		14%	3,42	

4.5 GENES DE RESISTÊNCIA À DROGA

4.5.1 Análise da Marcação Positiva para Genes de Resistência à Droga Citotóxica

Na tentativa de determinar se há resistência à droga citotóxica na CTC, foi realizado um teste de imunocitoquímica para avaliar se haveria marcação positiva destes genes nas CTCs. Os anticorpos foram testados nas CTCs conforme o tratamento proposto ao paciente no momento do recrutamento.

Para o irinotecano, foram testados os genes MRP1, MRP2 e MRP4. Entre os 10 pacientes que apresentam como proposta terapêutica o irinotecano, apenas em 6 havia material suficiente para o teste e nenhum apresentou marcação positiva para estes genes.

No caso da oxaliplatina, foram testados os genes MRP5 e ERCC1. O MRP5 foi testado em 14 pacientes, em dois houve marcação positiva. Já o ERCC1, foi testado em 8 pacientes e em dois houve marcação positiva. Não houve equidade entre os pacientes que apresentaram marcação positiva.

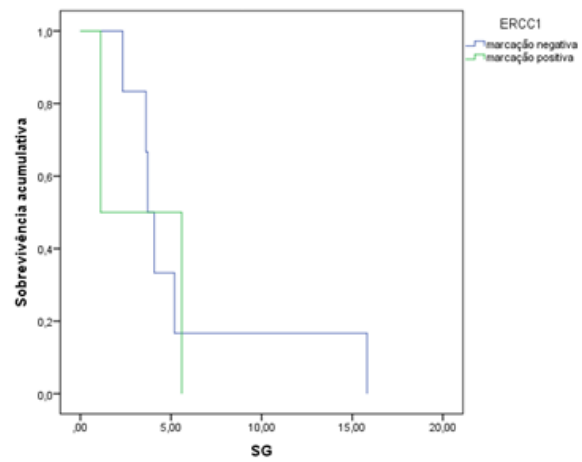
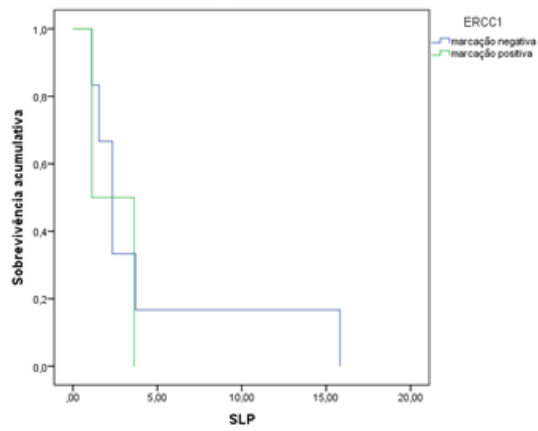
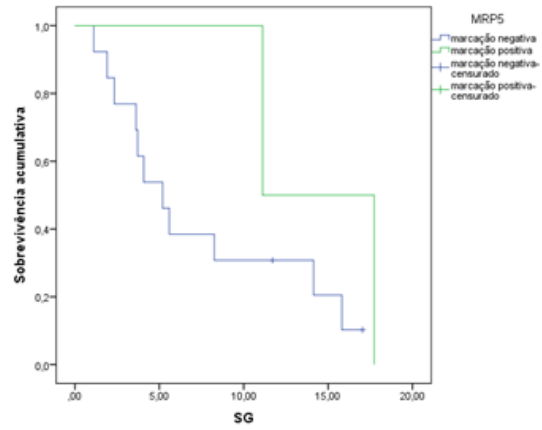
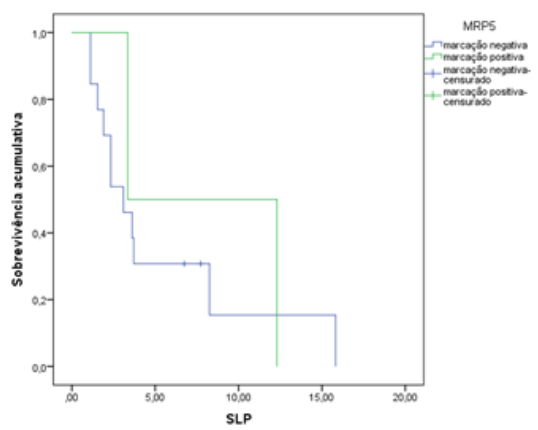
Para testar resistência ao 5-FU, os genes MRP5 e o TYMS foram testados. O MRP5 foi testado em 15 pacientes, em dois houve marcação positiva. Dos 14 pacientes testados, para TYMS, três apresentaram marcação positiva. Como mostrado na oxaliplatina, não houve paridade entre os pacientes que apresentaram marcação positiva.

Para verificar sensibilidade a Gencitabina, que é o principal quimioterápico utilizado em adenocarcinoma de pâncreas, testamos o anticorpo dCK. Nos 13 pacientes testados para dCK, seis apresentaram marcação positiva.

Quando comparadas as SLP e SG dos pacientes que apresentaram marcação positiva para o gene de sensibilidade à droga *versus* que não apresentaram, não houve diferença estatisticamente relevante (**Tabela 6**, **Figura 2**).

Tabela 6 - Análise da expressão de resistência/sensibilidade a droga citotóxica da CTC na SLP e SG

Anticorpo	Marcação (num. de pacientes)		SLP (valor p)	SG (valor p)
	positiva	negativa		
MRP5	2	13	0.17	0.24
ERCC1	2	6	0.53	0.88
TYMS	3	13	0.31	0,79
dCK	6	7	0.66	0.40



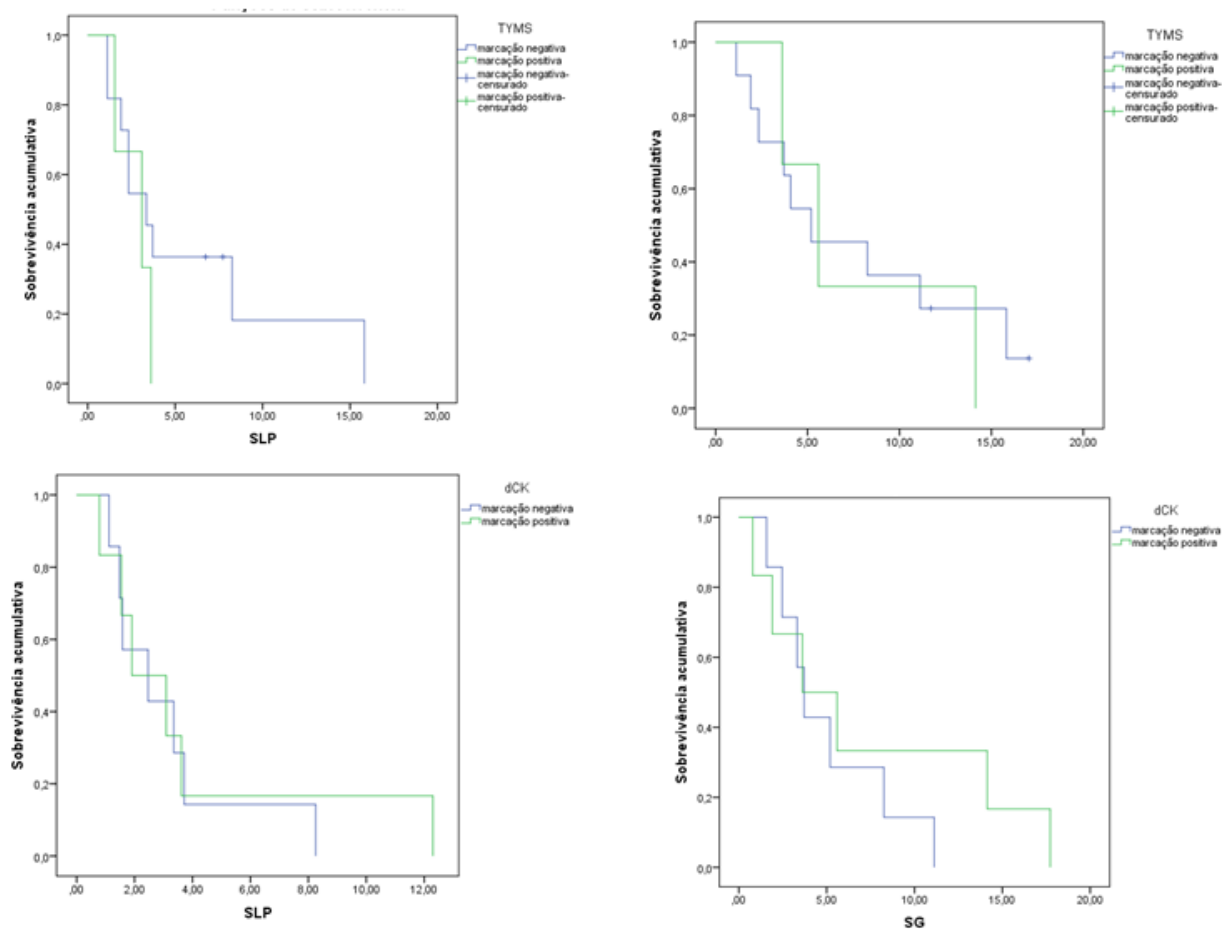


Figura 2 - Curva de Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Progressão (SLP) da marcação de resistência/sensibilidade a droga citotóxica nas CTCs.

4.5.2 Análise Individual dos Pacientes que apresentaram Marcação Positiva para Genes de Resistência à Droga Citotóxica

Entre os 21 pacientes desta coorte, apenas 8 apresentaram, no mínimo, uma marcação positiva para anticorpos de genes de resistência/sensibilidade à droga citotóxica. Segue análise individual destes pacientes.

A Paciente C2

Estádio III, sem metástase ao diagnóstico, havia realizado tratamento cirúrgico e sistêmico (5FU/ gencitabina/ FOLFOX), após nova progressão, foi recrutado para a pesquisa e proposto o protocolo quimioterápico FOLFIRI.

Na análise imunocitoquímica, apresentou marcação positiva para resistência ao 5FU e sensibilidade à gencitabina. Paciente progrediu rapidamente com o tratamento FOLFIRI (3,1 meses), apresentou um maior tempo livre de progressão com o GEMOX (5,7 meses) que é composto pela gencitabina (marcação positiva para sensibilidade na CTC) e a oxaliplatina. Mas, mesmo apresentando resistência ao 5FU, demorou quase o mesmo tempo para progredir com a capecitabina (5,4 meses).

Tabela 7 - Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C2)

data	tratamento	progressão	coleta	nº de CTC	Gene com marcação positiva
16-jan-13	FOLFIRI		<i>baseline</i>	194	dCK; TYMS
4-mar-13			<i>1º follow-up</i>	66	
20-abr-13	GEMOX	peritônio+local+marcador			
15-mai-13			<i>2º follow-up</i>	65	
9-out-13	capecitabina	clínico+imagem			
22-mar-14		Morte			

B Paciente C3

Estádio IV, com metástase em fígado, mostrou sensibilidade ao agente citotóxico gencitabina na CTC. No dia que iria iniciar o tratamento sistêmico, apresentava quadro de diarreia, desidratação e tromboembolismo pulmonar. Faleceu 55 dias após o diagnóstico sem iniciar o quimioterápico proposto.

Tabela 8 - Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C3)

data	tratamento	progressão	coleta	nº de CTC	Gene com marcação positiva
16-jan-13	gencitabina		<i>baseline</i>	17	dCK
9-fev-13		morte			

C Paciente C4

Este paciente havia realizado gencitabina por quatro meses, apresentando a doença estável, ficou em seguimento por 21 meses. Em PET-CT foi diagnosticado recidiva da doença, sendo proposto o protocolo FOLFOX (oxaliplatina + 5FU). Na análise de resistência à droga citotóxica, apresentou sensibilidade a gencitabina e resistência aos derivados de platina.

Após a recidiva da doença, mesmo apresentando resistência a derivados de platina, o protocolo quimioterápico FOLFOX possibilitou maior tempo sem progressão (12,3 meses), comparados com as outras propostas terapêuticas [gencitabina com radioterapia (4,9 meses) e FOLFIRI (0,46 meses)].

Tabela 9 - Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C4)

data	tratamento	progressão	Coleta	nº de CTC	Gene com marcação positiva
	Gencitabina/seguimento				
30-out-12	FOLFOX		<i>baseline</i>	40	dCK; MRP5
10-jan-13			<i>1º follow-up</i>	93	
25-fev-13			<i>2º follow-up</i>	6	
8-nov-13	Gencitabina e RTX	peritônio			
8-abr-14	FOLFIRI	Clinica			
22-abr-14		Morte			

D Paciente C6

Estádio IV, proposto tratamento paliativo com gencitabina. Na análise de resistência apresentou resistência aos derivados de platina. Mesmo apresentando este perfil de resistência, o protocolo quimioterápico FOLFOX possibilitou maior tempo sem progressão (5,5 meses), comparado com a gencitabina (3,4 meses).

Tabela 10 - Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C6)

data	tratamento	progressão	coleta	nº de CTC	Gene com marcação positiva
5-fev-13	Gencitabina		<i>baseline</i>	114	MRP5
11-mar-13			<i>1º follow-up</i>	5	
18-abr-13			<i>2º follow-up</i>	5	
18-mai-13	FOLFOX	Peritônio			
31-out-13	sem tratamento	clínico + imagem			
9-jan-14		Morte			

E Paciente C7

Estádio IV, com metástase hepática, proposto protocolo quimioterápico FOLFOX. Na análise de imunocitoquímica, apresentou sensibilidade a gencitabina e resistência ao 5-FU. Durante o curso da doença, apresentou um discreto aumento no tempo sem progressão com gencitabina (2,07 meses), comparado com tratamento composto por 5-FU (1,5 meses).

Tabela 11 - Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C7)

data	tratamento	progressão	coleta	nº de CTC	Gene com marcação positiva
22-mar-13	FOLFOX		<i>baseline</i>	-	dCK; TYMS
2-mai-13			<i>1º follow-up</i>	27	
8-mai-13	Gencitabina	linfonodal			
7-jun-13			<i>2º follow-up</i>	58	
10-jul-13		morte			

F Paciente C8

Estádio III, proposto inicialmente gencitabina, após progressão tumoral, paciente foi recrutado e iniciou nova linha de tratamento com o protocolo FOLFIRI. Mesmo demonstrando sensibilidade à gencitabina nas CTCs, o uso deste quimioterápico não impediu uma progressão rápida (2,5 meses). Na análise imunocitoquímica não foi demonstrada marcação positiva para resistência ao 5-FU e/ou irinotecano, porém houve progressão mais rápida (1,9 meses), comparado com a gencitabina, que apresentava marcadores de sensibilidade na CTC.

Tabela 12 - Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C8)

data	tratamento	progressão	coleta	nº de CTC	Gene com marcação positiva
	Gencitabina				
8-nov-12	FOLFIRI		<i>baseline</i>	20	dCK
3-jan-13			1º <i>follow-up</i>	77	
5-jan-13		morte			

G Paciente C10

Esta paciente apresentava lesão localmente avançada, com suspeita de metástase peritoneal. Foi escolhido como tratamento sistêmico a gencitabina.

Quando iniciou o tratamento sistêmico, apresentava 20 CTCs/ 8ml sangue e > 10.000U/ml de Ca 19,9, na análise de imunocitoquímica, apresentou marcadores de resistência para derivados de platina e 5-FU e sensibilidade a gencitabina na CTC. No primeiro *follow-up*, apresentava 11 CTCs/8ml e 7.337 U/ml de CA19,9 em sangue periférico. Mostrou melhora no nível sérico com benefício sintomático, seguiu no tratamento quimioterápico. No segundo *follow-up*, apresentou 8 CTCs/8ml de sangue e > 10.000 U/ml de CA 19,9. Após 47 dias do segundo *follow-up*, a paciente apresentou progressão diagnóstica em peritônio, pulmão e pâncreas, devido às condições clínicas, o tratamento sistêmico foi suspenso.

Tabela 13 - Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C10).

data	tratamento	progressão	coleta	nº de CTC	Gene com marcação positiva
27-mar-13	Gencitabina		<i>baseline</i>	20	TYMS, dCK
2-mai-13			<i>1º follow-up</i>	11	
7-jun-13			<i>2º follow-up</i>	8	
15-jul-13	Sem tratamento	peritônio + pulmão			
13-set-13			Morte		

H Paciente C21

Estádio IV, com metástase hepática, proposto tratamento com FOLFOX. Na análise imunocitoquímica na CTC apresentou resistência aos derivados de platina, apresentando progressão 1,1 meses após o início do tratamento sistêmico.

Tabela 14 - Análise individual entre a coleta de CTC, tratamento proposto e progressão tumoral (paciente C21)

data	tratamento	progressão	coleta	nº de CTC	Gene com marcação positiva
25-out-13	FOLFOX		<i>baseline</i>	33	ERCC1
28-nov-13			morte		

4.6 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA

Para definir o fenótipo mesenquimal nas CTCs, utilizamos três marcadores: Vimentina, MMP2 e TGF β -R. Dos 16 pacientes testados para TGF β -R, 4 apresentaram marcação positiva. Ao testar MMP2 em 13 pacientes, 6 apresentaram marcação positiva. Três pacientes apresentaram marcação positiva em ambos marcadores. Já para vimentina, dos 11 pacientes testados, nenhum apresentou positividade nas CTCs.

Não houve diferença estatisticamente relevante na SLP entre os pacientes que apresentaram marcação positiva para TGF β -R em comparação aos que não apresentaram marcação positiva (1,73 meses vs. 1,36 meses; $p = 0.83$). O mesmo serve para a SG (6,95 vs. 6,53 meses; $p = 0.89$), não apresentando diferença estatisticamente relevante.

Apesar de não apresentar diferença estatisticamente relevante, os pacientes que apresentaram fenótipo mesenquimal pela marcação positiva de MMP2, progrediram mais rápido (media: 2,84 meses) em comparação aos pacientes sem essa marcação (media: 4,86 meses; $p = 0.22$) (Tabela 15, Figura 4).

Na SG, não houve diferença estatisticamente relevante ($p = 0.99$) quando comparados os pacientes que apresentaram marcação positiva (5,82 meses), com os que não apresentaram (6,39 meses) para MMP2.

Levando em consideração os dois marcadores, os pacientes que apresentaram fenótipo mesenquimal, por marcação positiva no mínimo em um dos marcadores (MMP2 e/ou TGF β -R) na CTC, apesar de não haver

diferença estatisticamente relevante ($p = 0.14$), progrediram mais rápido do que os pacientes que não apresentaram marcação positiva para os marcadores mesenquimais (média: 2,84 vs. 5,43 meses) (Tabela 15, Figura 3).

Na SG, os pacientes que apresentaram o fenótipo mesenquimal com marcação positiva em no mínimo um dos marcadores (MMP2 e/ou TGF β -R) na CTC, apresentaram uma sobrevida média menor, comparada com os pacientes que não apresentaram marcação positiva (5,82 vs. 7,45 meses; $p = 0.65$).

Tabela 15 - SLP dos pacientes que apresentaram marcação positiva para marcadores de TEM

Anticorpo	Marcação na CTC	N	Media (meses)	p
MMP2	negativa	7	4,86	0.22
	positiva	6	2,84	
MMP2 e/ou TGF β -R	negativa	10	5,43	0.14
	positiva	6	2,84	

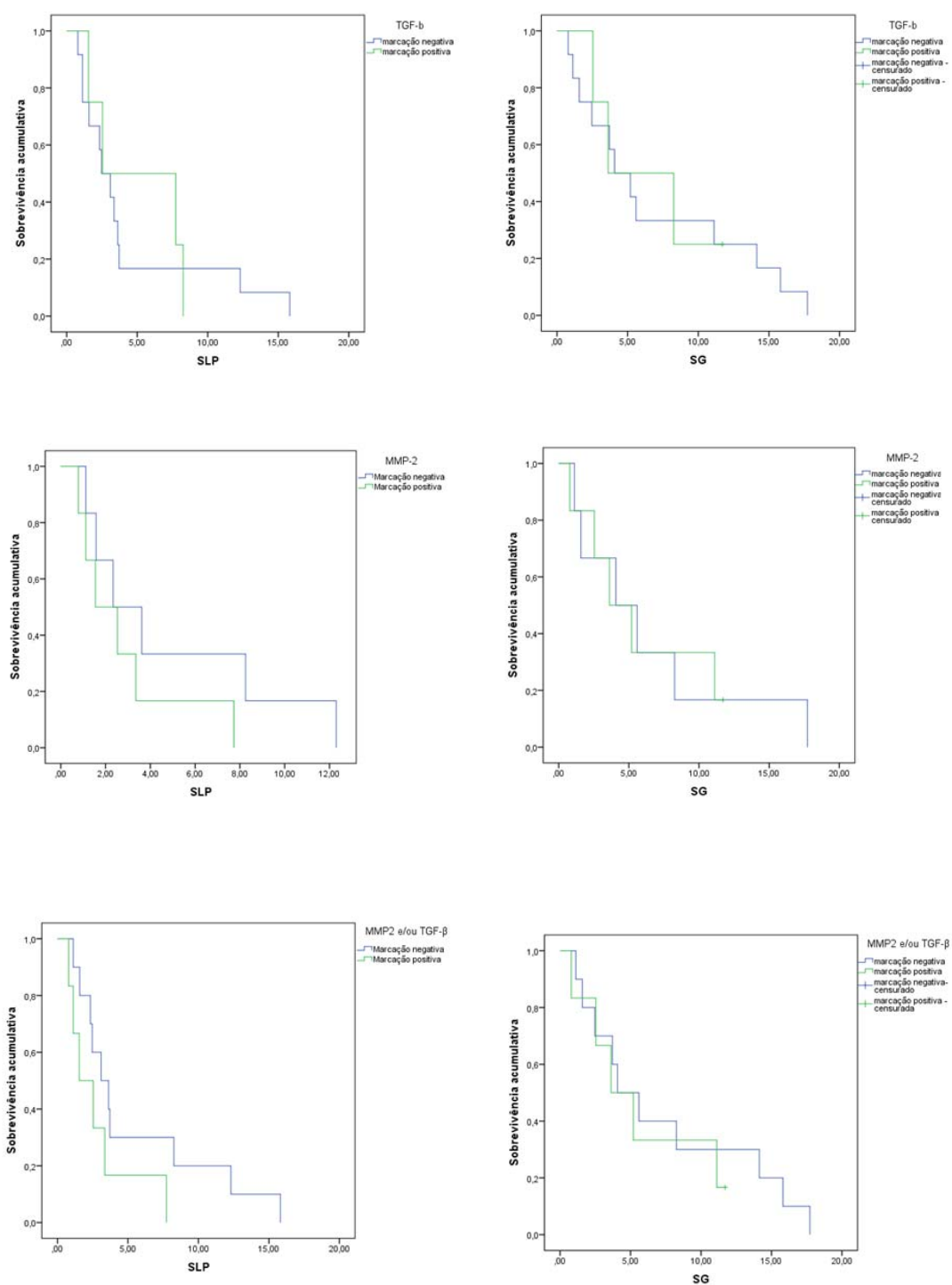


Figura 3 - Curva de sobrevida livre de progressão e sobrevida global para marcadores de TEM.

4.7 COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE CTC COM OS ACHADOS DE IMAGEM

A dinâmica do número de CTC com os achados de imagem foram comparados para avaliar seu potencial de avaliar a progressão diagnóstica.

Entre 21 pacientes, apenas em 15 foi possível realizar esta análise, isso porque o paciente deveria ter no mínimo duas coletas de CTC para possibilitar esta correlação. Na Figura 4, todos os pacientes tiveram uma queda da CTC e depois a PD, porém, o tempo da progressão pós 2º *follow-up* variou de 8 dias a 9 meses.

Entre os pacientes que apresentaram progressão entre 1º *follow-up* e 2º *follow-up*, quatro apresentaram diminuição do número de CTCs e três apresentaram aumento. Não houve um padrão da cinética do número de CTCs quando comparada com a PD diagnosticada pelos exames radiológicos.

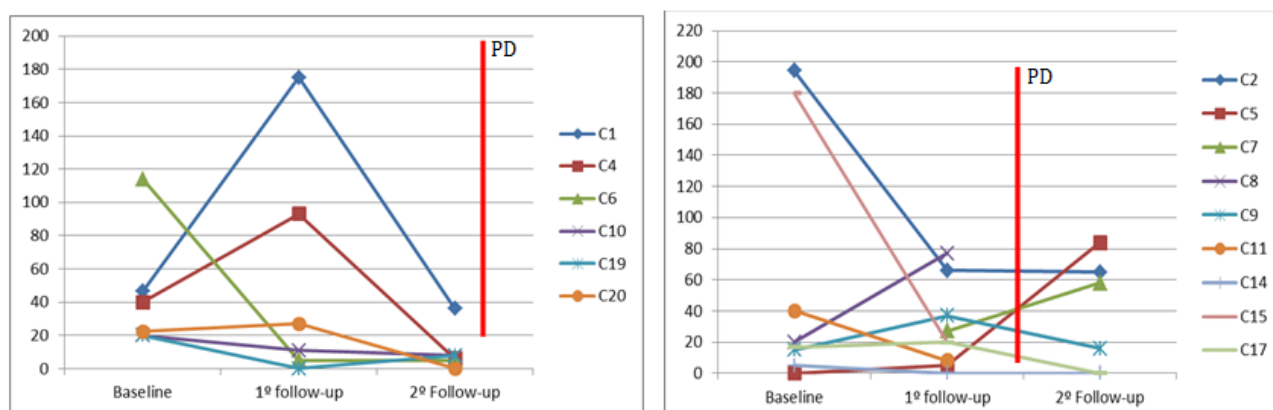


Figura 4 - Progressão diagnóstica (PD) após 2º *follow-up* e entre o 1º *follow-up* e 2º *follow-up*.

4.8 NÚMERO DE CTC E A QUIMIOTERAPIA

Na tentativa de responder o objetivo onde o número de CTC simbolizaria a efetividade do protocolo quimioterápico, subclassificamos os pacientes em dois grupos, levando em consideração a mediana de cada coleta. Os pacientes que mantiveram o número de CTCs abaixo da mediana nas duas coletas analisadas ou que estavam acima da mediana e na próxima coleta ficaram abaixo da mediana foram classificados como favoráveis, já os pacientes que mantiveram o número de CTCs acima da mediana nas duas coletas analisadas ou que estavam abaixo da mediana e aumentaram acima da mediana foram classificados como desfavoráveis. Esta análise foi realizada entre as três coletas. Não houve diferença estatisticamente relevante comparando os favoráveis e desfavoráveis como mostra a Tabela 16.

Tabela 16 - SLP e SG nos pacientes favoráveis ou não favoráveis após tratamento quimioterápico

Amostras analisadas	número de pacientes	SLP (valor de p)	SG (valor de p)
<i>baseline e 1º follow-up</i>			
favoráveis	5	0.10	0.08
desfavoráveis	9		
<i>1º follow-up e 2º follow-up</i>			
favoráveis	8	0.98	0.41
desfavoráveis	4		
<i>baseline e 2º follow-up</i>			
favoráveis	7	0.95	0.52
desfavoráveis	5		

5 DISCUSSÃO

A relevância da CTC no adenocarcinoma de pâncreas é controversa. Este estudo objetivou determinar a importância da CTC na resistência/sensibilidade à droga citotóxica, como biomarcador específico e o impacto na SLP e SG.

Na busca de identificar um grupo de pacientes com câncer pancreático que pudesse beneficiar-se com o estudo das CTCs, correlacionamos a mediana da contagem de CTCs em cada coleta com o sexo, idade, tipo histológico, nível sérico de CA19,9, estadiamento tumoral, TNM e grau histológico.

Nós utilizamos a mediana de contagem de CTCs para as correlações porque na literatura, não há limiar seguro para câncer de pâncreas utilizando a plataforma de detecção ISET. Contudo, o *CellSearch System* conseguiu estabelecer um ponto de corte para diversos tumores como, mama, próstata, CPNPC, colorretal e pâncreas (Mama, próstata e CPNPC: < 5 CTC/7,5ml de sangue; Colorretal: < 3 CTC/7,5ml de sangue; Pâncreas: $\geq$ 1 CTC/7,5ml de sangue) (CRISTOFANILLI et al. 2004; COHEN et al. 2008; DE BONO et al. 2008; KURIHARA et al. 2008; KREBS et al. 2011; BIDARD et al. 2013; HAN et al. 2014).

O *CellSearch System* utiliza antígenos epiteliais como as citoqueratinas e EpCam, classificando as células encontradas como CTCs quando a marcação é positiva para antígenos epiteliais e negativo para

antígeno leucocitário (CD45). Porém, esse tipo de plataforma pode desconsiderar uma subpopulação de CTC que está na TEM, onde há uma diminuição da expressão dos marcadores epiteliais. Outras técnicas como a RT-PCR apresentam alta sensibilidade, porém baixa especificidade, levando a uma alta taxa de falsos-positivos (MEGO et al. 2010; KREBS et al. 2012, 2014; MA et al. 2014).

A escolha por correlacionar os achados clínicos com a mediana de cada coleta, e não com o limiar já estabelecido por *CellSearch System*, foi realizada levando em consideração a grande diferença entre o número de CTCs detectadas por estas duas plataformas, já que o sistema ISET é independente de marcador, isolando as CTCs por filtragem e classificando-as pelo tamanho e morfologia celulares, captando maior número de CTCs e MEs (KHOJA et al. 2012).

KREBS et al. (2012) compararam a detecção do número de CTCs entre a plataforma ISET e *CellSearch System* em pacientes com CPNPC. O sistema ISET captou a presença de MEs em 38% dos pacientes testados, além de uma maior quantidade de CTC e em maior número de pacientes (média: 71 CTCs/7,5ml de sangue (0 - 1045); 80% dos pacientes) comparado com *CellSearch System* [média: 4 CTCs/7,5ml de sangue (0 - 78); 23% dos pacientes].

Em estudo com câncer de pâncreas, KHOJA et al. (2012) compararam as plataformas ISET e *CellSearch System* e encontraram resultados muito parecidos com KREBS et al. (2012). A média de CTCs detectadas pelo ISET foi de 26 CTC/7,5ml de sangue, já o *CellSearch*

detectou 9 CTC/7,5 ml de sangue, mostrando diferença estatisticamente relevante entre as duas plataformas ($p = 0.000002$).

Neste presente estudo, as medianas de cada coleta assemelham-se com os dados encontrados por KHOJA et al. (2012) e KREBS et al. (2012). Apresentando 22 CTCs/7,5ml de sangue periférico na primeira coleta, 20 CTCs/7,5ml na segunda e 8 CTCs/7,5ml na terceira.

BIDARD et al. (2013) correlacionam a contagem CTC, utilizando CellSearch System, com diversas características clínicas de pacientes com adenocarcinoma de pâncreas. Os pacientes com ≥ 1 CTC/7,5ml de sangue apresentam pior diferenciação tumoral (pouco diferenciado ou indiferenciado; $p = 0.04$) e progrediam mais rápido ($p = 0.03$). Em relação à SG houve pior sobrevida na presença de ≥ 1 CTC/7,5ml e Hb < 110 g/l ($p = 0.003$) ou fosfatase alcalina maior que o limite do valor normal ($p = 0.03$). Entretanto, não houve correlação positiva entre o número de CTCs com os achados clínicos em outros estudos (KURIHARA et al. 2008; HAN et al. 2014).

A análise de CTC em câncer de pâncreas foi vista como um potencial biomarcador específico para diagnóstico precoce da neoplasia e para verificar a resposta clínica ao tratamento, já que a biópsia pode ser contraindicada devido os seus riscos e a atuação limitada dos marcadores tumorais, como CA 19.9 (MUDAN et al. 2010; TJENSVOLL et al. 2014).

O CA 19.9 é uma glicoproteína anômala produzida pela célula neoplásica quando sintetiza a estrutura sialilada sialil-Lewis. Atualmente, o CA 19.9 tem sido utilizado como o principal marcador tumoral sanguíneo

capaz de auxiliar no diagnóstico, monitoramento da resposta clínica e predição de sobrevida no câncer pancreático com sensibilidade de 80% e especificidade de 82% (KO et al. 2005; CEN et al. 2012).

KO et al. (2005) estudaram o nível sérico de CA 19.9 e sua correlação com sobrevida em pacientes com câncer pancreático por meio de estudo retrospectivo. Os pacientes que apresentavam grande declínio no nível sérico de CA 19.9 durante o tratamento ($>75\%$) sobreviviam mais (mediana: 12 vs. 6.02 meses) e apresentavam um maior tempo para a falha do tratamento (TFT) (mediana: 6 vs. 3.36 meses), comparado aos pacientes com menor declínio (0 – 25%) (ambos com $p < 0.001$). Houve significativa correlação da porcentagem do CA 19.9 com a SG ($p = 0.004$) e TFT ($p = 0.007$).

Outros trabalhos reforçaram o achado de KO et al. (2005). KHOJA et al. (2012) demonstraram que o percentual de CA 19.9 tem valor prognóstico na SLP ($p = 0.0003$) e SG ($p = 0.01$). STOCKEN et al. (2014) evidenciaram que o nível sérico de CA 19.9 é fator prognóstico independente na SG ($p < 0.001$). Porém, o CA 19.9 não é específico para câncer de pâncreas, podendo ser encontrado em outras neoplasias gástricas, neoplasias benignas ou doenças pancreáticas, como a cirrose e a pancreatite crônica. Aproximadamente 10% de indivíduos com câncer de pâncreas são incapazes de produzir essa glicoproteína. Estes fatores tornam o impacto do nível sérico do CA 19.9 controverso (REN et al. 2011; CEN et al. 2012; KHOJA et al. 2012; BIDARD et al. 2013).

As CTCs parecem ser biomarcadores para o câncer de pâncreas. Nas coortes de pacientes onde a CTC foi analisada, nenhum dos indivíduos saudáveis apresentou CTC, mostrando sua especificidade. Além disso, o isolamento destas células permite a análise proteômica, genética e molecular das células tumorais (KURIHARA et al. 2008; CEN et al. 2012; REN et al. 2013).

KURIHARA et al. (2008) analisaram a contagem de CTCs em 26 pacientes com câncer pancreático metastático pelo *CellSearch System* e correlacionaram com diversos achados clínicos. Não foi possível observar diferença estatística no tamanho tumoral, invasão arterial ou venosa esplênica, veia porta, artéria mesentérica superior ou invasão vascular. Os pacientes com ≥ 1 CTC/7,5ml de sangue apresentavam maior nível sérico de CA 19.9 em comparação aos negativos para CTC ($15\,496 \pm 22\,572$ U/ml vs. 1452 ± 3800 U/ml; $p < 0.05$), demonstrando correlação entre o número de CTC e nível sérico de CA 19.9. Outros estudos tentaram reproduzir essa correlação sem sucesso (KHOJA et al. 2012; BIDARD et al. 2013).

No presente estudo não foi possível verificar correlação estatisticamente relevante com os achados clínicos dos pacientes. A principal hipótese para a não relevância foi a heterogeneidade da população estudada, tanto no recrutamento, como na terapia de escolha. Dos 21 pacientes recrutados, 13 não haviam recebido tratamento prévio ao recrutamento. Além disto, durante o tratamento, diversos protocolos quimioterápicos foram utilizados. No momento do recrutamento, 6 pacientes utilizaram a gencitabina (28%), três FOLFIRI (14%), 4 FOLFOX (19%), 7

FOLFIRINOX (33%) e um realizou 5-FU (4%). Outro fator foi a falta dos dados de prontuário, como por exemplo, no caso do CA 19.9. Dos 21 pacientes, em apenas 12 (57%) foi possível correlacionar o nível sérico de CA 19,9 com o número de CTC na primeira coleta, influenciando a análise dos obtidos.

Na sobrevida livre de progressão e sobrevida global, diversos estudos já demonstraram a relevância do número de CTCs, utilizando o *CellSearch System* para tumores metastáticos como mama, próstata, pulmão e colorretal (MAESTRO et al. 2009; LIBERKO et al. 2013; KREBS et al. 2014; LOWES e ALLAN 2014; MA et al. 2014; TORPHY et al. 2014).

No câncer de pâncreas, em 2008, KURIHARA et al. pesquisaram CTCs em pacientes com câncer de pâncreas metastático ($n = 26$), com pancreatite crônica ($n = 11$) e indivíduos saudáveis ($n = 10$). Não houve detecção de CTCs nos pacientes portadores de pancreatite crônica e nos indivíduos saudáveis. Em 11 pacientes portadores de câncer de pâncreas (42%) foi possível detectar ao menos 1 CTC/7,5 ml de sangue. Os pacientes que apresentavam CTC na amostra coletada tiveram uma menor SG, comparados com os que não apresentaram CTC ($p < 0,001$). A mesma diferença estatística relevante para SG foi encontrada quando foram comparados os pacientes em estágio IV da doença que apresentavam ou não CTC ($p < 0,01$).

Em estudo com 23 pacientes, KHOJA et al. (2012) não conseguiram demonstrar diferença estaticamente relevante na SLP ($p = 0.13$) e SG ($p = 0.26$) utilizando um ponto de corte ≥ 1 CTC/7,5 ml de sangue. Contudo,

BIDARD et al. (2013) provaram que os pacientes que apresentavam CTC na corrente sanguínea (≥ 1 CTC/7,5 ml de sangue) tinham SG menor ($p = 0.01$), comparados com os pacientes que não apresentavam CTCs na corrente sanguínea. Nesse estudo, poucos pacientes apresentaram uma ou mais CTCs na corrente sanguínea no *baseline* (5%) e no 1º *follow-up* (9%), possivelmente pelo método de coleta dependente de EpCam e citoqueratinas (*CellSearch System*). Mas, para BIDARD et al. (2013) e sua equipe, o fato do sistema de coleta da CTC não ser sensível para as células emTEM, não influenciou em mostrar que a CTC tem impacto na SG. Em uma metanálise, HAN et al. (2014) mostraram que os pacientes que tinham CTC na amostra coletada, apresentavam uma menor SLP ($p = 0.001$) e SG ($p < 0.001$), comparados aos pacientes que não apresentavam. Os resultados se mantiveram para SLP, mesmo dividindo a amostra pelo método detecção da CTC, *CellSearch System* ($p < 0,001$) e RT-PCR ($p = 0,032$). Segundo o autor, esses resultados indicam que o prognóstico do paciente com câncer de pâncreas está associado à presença de CTC. Apesar desses resultados, limitações como o pequeno número de estudos e de pacientes, diferentes métodos de detecção e tratamento podem acarretar resultados controversos. Devido a essas limitações, o resultado estatístico não é robusto, não podendo estimar o papel prognóstico da CTC no câncer de pâncreas.

No presente trabalho, não houve correlação estatisticamente relevante do número de CTCs comparado com a SLP e SG, diferentemente do que foi encontrado em outros relatos (KURIHARA et al. 2008; KHOJA et

al. 2012; HAN et al. 2014), embora a técnica por nós utilizada seja bastante sensível e específica, como demonstrado por outros trabalhos do nosso grupo (CHINEN et al. 2014) e por outros grupos (VONA et al. 2004; KHOJA et al. 2012; KREBS et al. 2012).

Metodologias atuais como imagem radiológica, história, exame físico e testes sorológicos, são utilizadas para ajudar a definir o tratamento. Porém, não permitem uma avaliação precisa e precoce do benefício clínico do tratamento, principalmente em pacientes com doença não mensurável. Esta avaliação tardia pode acarretar em tratamento com terapia ineficaz por uso prolongado ou interrupção precipitada de terapia eficaz (HAYES et al. 2006).

As lesões pancreáticas são difíceis de serem biopsiadas e são consideradas, muitas vezes, inseguras e impraticáveis. As CTCs, consideradas “biópsias líquidas” poderiam auxiliar no diagnóstico, predição de resposta ao tratamento, além da resposta tumoral nos tumores pancreáticos (ZHOU et al. 2011; CEN et al. 2012; KHOJA et al. 2012). MUDAN et al. (2010), utilizaram a captação de CTCs para descartar as hipóteses geradas por meio de uma tomografia computadorizada. Os possíveis diagnósticos para uma massa encontrada na cauda do pâncreas era de lesão cística, lesão decorrente da pancreatite alcoólica ou adenocarcinoma. Utilizando o *CellSearch System* foi identificado 4 CTCs/7,5ml de sangue periférico, confirmando a hipótese de adenocarcinoma, que foi posteriormente confirmada por uma biópsia laparoscópica.

Neste presente estudo, foi testado se a cinética do número de CTCs poderia ser usada para indicar o aparecimento de progressão tumoral. Porém, essa hipótese não foi confirmada. Para avaliar essa variável, realizamos três coletas de CTCs com intervalo de 40 dias entre elas. Dos 21 pacientes recrutados, em 15 (71%) foi possível avaliar as CTCs em dois momentos e em apenas 11 (52%) foi possível avaliar as CTCs nos três momentos, impactando negativamente no resultado do estudo. As causas para a diminuição de pacientes entre as coletas era óbito ou abandono da pesquisa.

Outra possível funcionalidade da CTC, além de auxílio no diagnóstico, como marcador e no entendimento da dinâmica tumoral, é verificar a resposta ao tratamento proposto, de forma simples, pouco invasiva e que poderia monitorizar a resposta do tumor em tempo real (MEGO et al. 2010; KREBS et al. 2014; MA et al. 2014).

No câncer de pâncreas, REN et al. (2011) estudaram o número de CTCs após exposição ao 5-FU. Dentre 41 pacientes recrutados, em 33 (80,5%) foi possível detectar CTCs, pelo método *MACS Miltenyi*, antes do início do tratamento. Após o primeiro ciclo de quimioterapia com 5-FU, apenas 12 (29,3%) apresentavam CTC na corrente sanguínea, com média de $3.8 \pm 6.8/7,5$ ml de sangue periférico. Houve correlação estatisticamente relevante com o limiar ≥ 2 CTCs/7.5 ml de sangue periférico comparados com tamanho tumoral ($p = 0.054$) e acometimento linfonodal ($p = 0.007$).

Não há na literatura estudos comparando diversos momentos de contagem de CTCs em pacientes com câncer de pâncreas. Possivelmente,

pela dificuldade de acompanhar estes pacientes por períodos prolongados de tempo, devido à rápida progressão tumoral e curta SG. Neste estudo, para verificar o impacto da terapia antineoplásica com o número de CTCs, classificamos os pacientes em dois grupos, os favoráveis (pacientes que apresentaram contagem de CTCs abaixo da mediana ou diminuição da coleta anterior para a coleta posterior) e os desfavoráveis (pacientes que se mantiveram acima da mediana ou aumentaram o número de CTCs da coleta anterior para a coleta posterior). Nos três momentos analisados, não foi possível encontrar diferença estatisticamente relevante na SLP e SG, quando comparamos as coletas de *baseline* e *1º follow-up* (SLP: $p = 0.10$; SG: $p = 0.84$) *1º follow-up* e *2º follow-up* (SLP: $p = 0.98$; SG: $p = 0.41$) e *baseline* e *2º follow-up* (SLP: $p = 0.95$; SG: $p = 0.52$) entre o grupo favoráveis e desfavoráveis. A falta de poder estatístico pode ser devido ao fato dos pacientes estarem em diversas linhas de tratamentos e protocolos quimioterápicos e à perda de pacientes entre as coletas propostas. Dos 21 pacientes, antes da segunda coleta, 6 saíram da pesquisa (4 óbitos e 2 abandonos, cerca de 29%) e antes da terceira coleta, ao todo, 9 pacientes (43%) não estavam mais na pesquisa (6 faleceram e três abandonaram a pesquisa).

A quimioterapia é uma das estratégias terapêuticas mais importantes no tratamento do câncer, porém, sua efetividade é limitada pela resistência ao agente citotóxico. Esta resistência leva a uma falha no tratamento, permitindo que um grupo de células tumorais sobreviva na corrente

sanguínea e na medula óssea, permitindo assim a sua disseminação e, conseqüentemente, a metástase (WANG et al. 2011; HOLOHAN et al. 2013).

Em nosso trabalho não foi possível correlacionar a presença de marcação positiva para genes e/ou proteínas que determinam resistência à droga citotóxica com uma diminuição da sobrevida livre de progressão e sobrevida global. Os pacientes que apresentaram sensibilidade a gencitabina por meio de marcação positiva de dCK, também não obtiveram melhores taxas de sobrevida. Tentamos reproduzir achados de outros tumores para o câncer de pâncreas, mas não conseguimos. As possíveis causas estão na heterogeneidade tumoral do adenocarcinoma pancreático e seus diversos mecanismos de resistência às drogas citotóxicas intrínsecos e adquiridos, mostrando que não existe um único mecanismo responsável pela resistência. Outra possibilidade está no recrutamento dos pacientes que foi feito em diversos momentos do tratamento (antes do tratamento sistêmico ou em troca de linha terapêutica por PD), levando à heterogeneidade da população estudada.

No câncer de pâncreas, um diferencial encontrado em seu microambiente é a grande reação desmoplásica, tornando o tumor mais denso e hipovascularizado, promovendo uma pior entrega dos agentes citotóxicos. No câncer pancreático, as células estreladas do pâncreas, adquirem fenótipo miofibroblasto, originando a produção de citoqueratinas, componentes da matriz extracelular e intensa reação desmoplásica, ocasionando microambiente altamente fibroso, hipóxia tumoral e menor efeitos das drogas citotóxicas (gencitabina). O microambiente tumoral no

câncer de pâncreas parece ser por si só um mecanismo de resistência à droga citotóxica (WANG et al. 2011; SCHOBER et al. 2014).

Na TEM, o fenótipo mesenquimal promove a invasão e migração, contribuindo nos estágios iniciais da metástase, além de ser um importante mecanismo de resistência à droga citotóxica. O fenótipo epitelial também tem a sua relevância, principalmente nos estágios avançados de colonização e progressão tumoral, permitindo a aderência ao tecido que ocorrerá a metástase (MEGO et al. 2010; CEN et al. 2012).

Neste presente estudo, utilizamos a vimentina, MMP2 e TGF β -R para identificar fenótipo mesenquimal nas CTCs. Apesar dos dados não apresentarem relevância estatística, os pacientes que expressaram marcadores de TEM (MMP2 e/ou TGF β -R) progrediram mais rápido (média: 2,84 vs. 5,43 meses; $p = 0.14$) e sobreviveram menos (média: 5,82 vs. 7,45 meses; $p = 0.65$) comparado aos pacientes que não apresentavam fenótipo mesenquimal. A vimentina é um marcador mesenquimal muito utilizado para definir a TEM em diversos estudos. No nosso estudo, a vimentina não foi identificada em nenhuma das amostras testadas, demonstrando a heterogeneidade das CTCs. Acreditamos que o número da amostra foi o principal responsável pela falta de relevância estatística da TEM nas SLP e SG.

6 CONCLUSÕES

- Nesta amostra, identificamos que a contagem de CTC não se mostrou relevante na análise de SLP e SG comparado com as características clínicas da população estudada e resposta ao tratamento do câncer de pâncreas;
- Identificamos que não houve padrão na cinética da CTC entre as coletas e a imagem radiológica;
- Na análise de expressão de transportadores e genes de resistência a droga citotóxica demonstramos que não houve diferença na SLP ou SG entre os grupos de pacientes que apresentavam marcação de resistência comparados aos que não apresentavam. Mas pode ser que a análise de marcador nas CTCs seja útil, como observamos pelas curvas separadas de SLP e SG para expressão de MMP2 E TGF β -R.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. **Cancer Res** 2009; 69:5820-8.

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

Bear HD. Measuring circulating tumor cells as a surrogate end point for adjuvant therapy of breast cancer: what do they mean and what should we do about them? **J Clin Oncol** 2008; 26:1195-7.

Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. **World J Gastroenterol** 2014; 20:11182-98.

Bidard FC, Huguet F, Louvet C, et al. Circulating tumor cells in locally advanced pancreatic adenocarcinoma: the ancillary CirCe 07 study to the LAP 07 trial. **Ann Oncol** 2013; 24:2057-61.

Bilici A. Prognostic factors related with survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. **World J Gastroenterol** 2014; 20:10802-12.

Bydlowski SP, Debes A A., Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2009; 31:25–35.

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

Bonnomet A, Syne L, Brysse A, et al. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. **Oncogene** 2012; 31:3741-53.

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

Bowen KA, Riall TS. Periampullary adenocarcinoma: diagnosis and survival after pancreaticoduodenectomy. In: Hayat MA, editor. **Methods of cancer diagnosis, therapy and prognosis: gastrointestinal carcinoma**. New York: Springer; 2008. p.211-26.

Calascibetta A, Contino F, Feo S, et al. Analysis of the thymidylate synthase gene structure in colorectal cancer patients and its possible relation with the 5-Fluorouracil drug response. **J Nucleic Acids** 2010; 2010. pii:306754.

Cen P, Ni X, Yang J, Graham DY, Li M. Circulating tumor cells in the diagnosis and management of pancreatic cancer. **Biochim Biophys Acta** 2012; 1826:350-6.

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

Chinen LT, de Carvalho FM, Rocha BM, et al. Cytokeratin-based CTC counting unrelated to clinical follow-up. **J Thorac Dis** 2013; 5:593-9.

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

Chuong MD, Boggs DH, Patel KN, Regine WF. Adjuvant chemoradiation for pancreatic cancer: what does the evidence tell us? **J Gastrointest Oncol** 2014; 5:166-77.

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

Collins MA, Pasca di Magliano M. Kras as a key oncogene and therapeutic target in pancreatic cancer. **Front Physiol** 2014; 4:407.

Costanzo LS. **Fisiologia**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. Pâncreas endócrino; p.422-30.

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

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

Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, et al. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. **Cancer Res** 2001; 61:4222-8.

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

Eser S, Schnieke A, Schneider G, Saur D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. **Br J Cancer** 2014; 111:817-22.

[FDA] Foods and Drugs Administration. **DECI 4 ZO0as - Summary**. Available from: <URL:http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf6/k062013.pdf> [2013 jul 2].

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

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

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

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

Goodman MD, Saif MW. Adjuvant therapy for pancreatic cancer. **JOP** 2014; 15:87-90.

Gradilone A, Naso G, Raimondi C, et al. Circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): prognosis, drug resistance and phenotypic characterization. **Ann Oncol** 2011; 22:86-92.

Gresham GK, Wells GA, Gill S, Cameron C, Jonker DJ. Chemotherapy regimens for advanced pancreatic cancer: a systematic review and network meta-analysis. **BMC Cancer** 2014; 14:471.

Han L, Chen W, Zhao Q. Prognostic value of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a meta-analysis. **Tumour Biol** 2014; 35:2473-80.

Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. **Clin Cancer Res** 2006; 12:4218-24.

Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. **Clin Cancer Res** 2011; 17:827-35.

Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer** 2013; 13:714-26.

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

Khoja L, Backen A, Sloane R, et al. A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker. **Br J Cancer** 2012; 106:508-16.

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

Ko AH, Hwang J, Venook AP, Abbruzzese JL, Bergsland EK, Tempero MA. Serum CA19-9 response as a surrogate for clinical outcome in patients receiving fixed-dose rate gemcitabine for advanced pancreatic cancer. **Br J Cancer** 2005; 93:195-9.

Koeppen BM, Santon BA. **Fisiologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. Introdução ao sistema endócrino; p.657-60.

Kostopoulos I, Karavasilis V, Karina M, et al. Topoisomerase I but not thymidylate synthase is associated with improved outcome in patients with resected colorectal cancer treated with irinotecan containing adjuvant chemotherapy. **BMC Cancer** 2009; 9:339.

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

Krebs MG, Hou JM, Sloane R, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. **J Thorac Oncol** 2012; 7:306-15.

Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. **Nat Rev Clin Oncol** 2014; 11:129-44.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 8^a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2010. The pancreas; p.900-3.

Kurihara T, Itoi T, Sofuni A, et al. Detection of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a preliminary result. **J Hepatobiliary Pancreat Surg** 2008; 15:189-95.

Li YM, Xu SC, Li J, et al. Epithelial-mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease. **Cell Death Dis** 2013; 4:e831.

Liberko M, Kolostova K, Bobek V. Essentials of circulating tumor cells for clinical research and practice. **Crit Rev Oncol Hematol** 2013; 88:338-56.

Lima A, Azevedo R, Sousa H, Seabra V, Medeiros R. Current approaches for TYMS polymorphisms and their importance in molecular epidemiology and pharmacogenetics. **Pharmacogenomics** 2013; 14:1337-51.

Liszka L. Ductal adenocarcinoma of the pancreas usually retained SMAD4 and p53 protein status as well as expression of epithelial-to-mesenchymal transition markers and cell cycle regulators at the stage of liver metastasis. **Pol J Pathol** 2014; 65:100-12.

Long J, Zhang Y, Yu X, et al. Overcoming drug resistance in pancreatic cancer. 2012. **NIH Public Access**. 2012; 15:817-28.

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

Lowes LE, Allan AL. Recent advances in the molecular characterization of circulating tumor cells. **Cancers (Basel)** 2014; 6:595-624.

Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. **Lancet Oncol** 2012; 13:688-95.

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

Ma X, Xiao Z, Li X, et al. Prognostic role of circulating tumor cells and disseminated tumor cells in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. **Tumour Biol** 2014; 35:5551-60.

Mcphee SJ, Ganong WF. **Fisiopatologia da doença**. 5ª ed. Porto Alegre: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2007. Distúrbios do pâncreas exócrino; p.367-9.

Maestro LM, Sastre J, Rafael SB, et al. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages. **Anticancer Res** 2009; 29:4839-43.

Mazzini C, Pinzani P, Salvianti F, et al. Circulating tumor cells detection and counting in uveal melanomas by a filtration-based method. **Cancers (Basel)** 2014; 6:323-32.

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

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. **J Clin Oncol** 2007; 25:1960-6.

Mudan S, Giakoustidis A, Thillainayagam AV, Jacob J, Stebbing J. Clinical utility of circulating tumor cell measurement in the diagnosis of indeterminate lesions of the pancreas. **Future Oncol** 2010; 6:177-9.

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

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

Niero EL, Rocha-Sales B, Lauand C, et al. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. **J Exp Clin Cancer Res** 2014; 33:37.

Nitiss JL, Wang JC. Mechanisms of cell killing by drugs that trap covalent complexes between DNA topoisomerases and DNA. **Mol Pharmacol** 1996; 50:1095-102.

Pal SK, He M, Wilson T, et al. Detection and phenotyping of circulating tumor cells in high-risk localized prostate cancer. **Clin Genitourin Cancer** 2015; 13:130-6.

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

Pereira IT, Ramos EA, Costa ET, et al. Fibronectin affects transient MMP2 gene expression through DNA demethylation changes in non-invasive breast cancer cell lines. **PLoS One** 2014; 9:e105806.

Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. **Clin Cancer Res** 2008; 14:7004-10.

Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. **Semin Oncol** 1995; 22:3-10.

Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:1714-26.

Reed E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. **Clin Cancer Res** 2005; 11:6100-2.

Ren C, Han C, Zhang J, et al. Detection of apoptotic circulating tumor cells in advanced pancreatic cancer following 5-fluorouracil chemotherapy. **Cancer Biol Ther** 2011; 12:700-6.

Ren C, Chen H, Han C, et al. Detection and molecular analysis of circulating tumor cells for early diagnosis of pancreatic cancer. **Med Hypotheses** 2013; 80:833-6.

Riethdorf S, Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. **Pathobiology** 2008; 75:140-8.

Rodrigues JFO. **Tumores endócrinos do pâncreas**. Porto; 2010. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina Universidade do Porto].

Rucki AA, Zheng L. Pancreatic cancer stroma: understanding biology leads to new therapeutic strategies. **World J Gastroenterol** 2014; 20:2237-46.

Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. **N Engl J Med** 2014; 371:1039-49.

Schober M, Jesenofsky R, Faissner R, et al. Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. **Cancers (Basel)** 2014; 6:2137-54.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics 2014. **CA Cancer J Clin** 2014; 64:9-29.

Slade MJ, Payne R, Riethdorf S, et al. Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment. **Br J Cancer** 2009; 100:160-6.

Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. **J Clin Oncol** 2014; 32:3483-9.

Somlo G, Lau SK, Frankel P, et al. Multiple biomarker expression on circulating tumor cells in comparison to tumor tissues from primary and metastatic sites in patients with locally advanced/inflammatory, and stage iv breast cancer, using a novel detection technology. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 128:155-63.

Sommer H, Santi DV. Purification and amino acid analysis of an active site peptide from thymidylate synthetase containing covalently bound 5-fluoro-2'-deoxyuridylate and methylenetetrahydrofolate. **Biochem Biophys Res Commun** 1974; 57:689-95.

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

Stocken DD, Ghaneh P, Cunningham D, et al. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gencitabine following pancreatic cancer resection. **JAMA** 2014; 304:1073-81.

Takeuchi H, Kitagawa Y. Circulating tumor cells in gastrointestinal cancer. **J Hepatobiliary Pancreat Sci** 2010; 17:577-82.

Thota R, Pauff JM, Berlin JD. Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review. **Oncology (Williston Park)** 2014; 28:70-4.

Tjensvoll K, Nordgård O, Smaaland R. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: methods of detection and clinical implications. **Int J Cancer** 2014; 134:1-8.

Torphy RJ, Tignanelli CJ, Kamande JW, et al. Circulating tumor cells as a biomarker of response to treatment in patient-derived xenograft mouse models of pancreatic adenocarcinoma. **PLoS One** 2014; 9:e89474.

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

Wang Z, Li Y, Ahmad A, et al. Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 2011; 8:27-33.

Xiao S, Liu L, Fang M, et al. BPTF associated with EMT indicates negative prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. **Dig Dis Sci** 2015; 60:910-8.

Zhou J, Hu L, Yu Z, Zheng J, et al. Marker expression in circulating cancer cells of pancreatic cancer patients. **J Surg Res** 2011; 171:631-6.

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

A.C. Camargo
Cancer Center

São Paulo, 27 de novembro de 2013.

A

Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen.

Aluno: José Luiz Gasparini (Mestrado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1367/10D

“Detecção de células tumorais circulantes em pacientes com câncer de pâncreas e sua correlação com a evolução clínica tumoral”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 26/11/2013, tomaram conhecimento e aprovaram os seguintes documentos:

- 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 “Detecção de células tumorais circulantes e correlação com a evolução clínica tumoral”, registrado neste CEP sob nº 1367/10. O projeto afiliado em referência será a dissertação de Mestrado do aluno *José Luiz Gasparini*.
- Projeto de Mestrado, datado de Novembro de 2013.

Atenciosamente,


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

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**NOME DO ESTUDO: DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS
CIRCULANTES
E SUA CORRELAÇÃO COM EVOLUÇÃO CLÍNICA TUMORAL**

Investigador Responsável: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

Nome do (a) Voluntário (a): _____

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

OBJETIVOS DO ESTUDO

Usar um equipamento laboratorial novo no mercado para detectar células tumorais circulantes (são células que se desprendem do tumor) no sangue periférico e correlacionar seus níveis com:

- marcadores tumorais sanguíneos, observados pelo exame de sangue que você faz a pedido do seu médico;
- resposta ao tratamento (verificaremos se há diminuição dos níveis dessas células durante e após o seu tratamento);
- genes de resistência a drogas;
- tempo de vida após o tratamento.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Ao concordar em participar deste estudo, você será submetido a três coletas de sangue (aproximadamente 20 mL), em três momentos: antes do início do tratamento sistêmico, 3 ou quatro semanas após o início do tratamento e a cada 9 ou 12 semanas, dependendo do tratamento, por dois anos ou, se a doença progredir, até a progressão.

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

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo, caso você participe ou não deste estudo. Nenhum dano imediato ou tardio, que comprometa a sua saúde, poderá ser decorrente deste estudo.

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

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

BENEFÍCIOS

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

MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES

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

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Os pesquisadores se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo, porém, por se tratar de nova tecnologia, os resultados não poderão indicar cura ou piora do seu quadro, pois ainda não temos valores de referência para estabelecer uma comparação. Contatos dos pesquisadores: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189-5000, ramal 2776); Dr. Marcello F. Fanelli (2189- 5000, ramal 2765).

CUSTOS

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

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

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

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

BASES DA PARTICIPAÇÃO

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

SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE

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

ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Você não terá nenhum tipo de remuneração ao aceitar participar deste estudo. A pesquisa não envolve nenhuma forma de compensação financeira aos participantes. Não existe nenhum tipo de indenização para complicações causadas pelo tratamento.

ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PACIENTE SUJEITO À PESQUISA

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

INFORMAÇÕES SOBRE NOMES, TELEFONES E ENDEREÇOS PARA CONTATOS

Esclarecimentos para questões sobre os direitos dos participantes na pesquisa e/ou danos relacionados à pesquisa, contatar os pesquisadores Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189 5000 ramal 2776) ou Dr. Marcello F. Fanelli (2189 5000 ramal 2779). 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 07:00 às 18:00h e de sexta-feira das 07:00 às 16:00h (Telefone 2189-5020; endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211- Liberdade- São Paulo, SP).

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

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

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

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

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

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

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

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

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

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

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