

**DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES
E SUA CORRELAÇÃO COM EVOLUÇÃO CLÍNICA EM
CÂNCER DE PULMÃO NÃO PEQUENAS CÉLULAS
METASTÁTICO**

MILENA SHIZUE TARIKI

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

Área de Concentração: Oncologia

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

**Co-Orientador: Dr. Vladmir Claudio Cordeiro
de Lima, Dr. Aldo Lourenço Abbade Dettino**

**São Paulo
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Tariki, Milena Shizue

Detecção de células tumorais circulantes e sua correlação com evolução clínica tumoral em câncer de pulmão não pequenas células metastático / Milena Shizue Tariki – São Paulo, 2015.

66p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores: 1. CÉLULAS NEOPLÁSICAS CIRCULANTES/patologia. 2. METÁSTASE NEOPLÁSICA/diagnóstico. 3. CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS/diagnóstico. 4. EVOLUÇÃO CLÍNICA TUMORAL.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Ronaldo, pelo apoio constante e paciência quase infinita em todas as minhas conquistas.

Aos meus pais, Amélia e Rubens, minhas referências de vida.

Ao meu padrinho Gelson Batocchio, que primeiro me despertou o olhar para a Oncologia

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e suas famílias

A minha orientadora, Dra Ludmilla Thome Domingos Chinen e ao Dr Marcello Ferretti Fanelli, chefe do departamento de Oncologia Clínica do Hospital ACCamargo Cancer Center, pela oportunidade de colaborar no desenvolvimento desse projeto e de outros na instituição. Agradeço a infinita paciência e dedicação da Dra Ludmilla em me ensinar todos os passos que envolveram esse trabalho e toda colaboração que me fez olhar a Ciência de forma diferente a partir do Mestrado.

Aos meus colegas Emne Abdallah, José Luiz Gasparini Júnior e Marcilei Buim, que acreditaram no projeto e se dedicaram intensamente para que ele acontecesse.

Ao meu colega do Departamento e orientador Aldo Dettino, que recrutou a maioria dos pacientes incluídos nesse estudo, dedicando-se também de forma intensa.

Ao meu orientador Dr Vladimir Lima e Helano Carioca, grandes inspirações para eu continuar a investir tempo e trabalho para, de alguma forma, colaborar com a melhora clínica dos pacientes oncológicos

Ao estatístico Vinicius Calsavara,

A bibliotecária Suely Francisco e funcionários

À Pós Graduação da Fundação Antônio Prudente

RESUMO

Tariki MS. **Detecção de células tumorais circulantes e sua correlação com evolução clínica tumoral em câncer de pulmão não pequenas células metastático**. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Câncer de pulmão acomete 1,8 milhões de pessoas no mundo, com 1,6 milhões de óbitos decorrentes. É a principal neoplasia em incidência e mortalidade, com 56% dos casos diagnosticados já em fase avançada. Apesar do grande avanço no desenvolvimento de novos tratamentos para doença avançada na última década, faltam biomarcadores validados para a prática clínica, com valor prognóstico e preditivo de resposta a esses tratamentos. A detecção de CTCs no sangue periférico desses pacientes tem se mostrado como possível biomarcador em câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC). **Objetivo:** O intuito desse estudo foi avaliar detecção de células tumorais circulantes (CTCs) em pacientes com CPNPC metastático, quanto ao valor prognóstico (correlação com sobrevida global (SG) e livre de progressão (SLP)) e preditivo (resposta radiológica). **Método e Pacientes:** Amostras de sangue para detecção de CTCs pelo método ISET (Rarecells Paris, France) foram coletadas antes do primeiro ciclo da nova quimioterapia, após 8 semanas do início e 16 semanas após o início, coincidindo com avaliação radiológica de resposta ao tratamento. Foram incluídos pacientes com diagnóstico de CPNPC metastático ao diagnóstico, ou que apresentaram recidiva após tratamento de doença localizada e que iriam iniciar novo tratamento sistêmico. **Resultados:** A amostra foi constituída por 32 pacientes, sendo 17 (53,1%) homens e 15 (46,9%) mulheres. O tipo histológico mais comum foi adenocarcinoma (n= 26; 81,25%). CTCs foram detectadas em 78,2% (25) dos pacientes no início do tratamento, em 85,2% (23) dos pacientes após 8 semanas e em 76,2% (16) após 16 semanas. Foi considerado como *cut-off* a mediana de contagem de

CTCs por 8mL de sangue em cada momento, cujo valor foi de 16 CTCs/8mL. Houve uma tendência a maiores SLP e SG entre os pacientes com níveis abaixo da mediana comparados aos pacientes com níveis iguais ou superiores a ela ($p=0,083$ e $p=0,45$) após 8 semanas do início do tratamento. Quando avaliada cinética das CTCs nos momentos *baseline* e após 8 semanas nos pacientes submetidos a *doublet* de platina, houve diferença em SLP entre os pacientes que evoluíram com diminuição de CTCs ou se mantiveram indetectáveis (8,48 meses) comparados com aqueles cujos níveis aumentaram (3,42 meses; $p=0,047$). Não houve correlação entre contagem de CTCs e resposta radiológica. **Conclusão:** CTCs são detectáveis em alta porcentagem de pacientes com CPNPC metastático. Houve uma tendência a maior SLP e SG entre os pacientes com níveis abaixo da mediana, especialmente após 8 semanas do tratamento (CTC2). Houve uma maior SLP entre os pacientes cujos níveis se mantiveram indetectáveis ou diminuíram suas contagens ao longo do tratamento, *versus* aqueles que aumentaram na população submetida a *doublet* de platina.

SUMMARY

Tariki MS. [**Detection of circulating tumor cells and its correlation with clinical outcome in metastatic non-small cell lung cancer**]. São Paulo, 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Lung cancer occurs in approximately 1,8 million people and causes 1,6 million deaths worldwide. It is the main cancer in incidence and mortality, with 56% of cases diagnosed in advanced stage. In spite of the great improvement in developing new drugs for advanced disease in the last decade, it lacks biomarkers validated for clinical practice, with prognostic value and predictive of response to those new treatments. Detection of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of these patients has emerged as a potential biomarker for non-small cell lung cancer (NSCLC).

Objective: The aim of this study was to evaluate detection of circulating tumor cells in patients with metastatic non-small cell lung cancer in terms of prognosis (disease-free survival (DFS) and overall survival(OS)) and prediction of radiographic response. **Methods and patients:** Blood samples for detection of CTCs by ISET method (Rarecells Paris,France) were collected before the first cycle of the new chemotherapy, 8 weeks after the beginning and 16 weeks after the beginning, matching radiographic evaluation. Patients with metastatic or relapsed non-small cell lung cancer, candidates to a new systemic treatment were included. **Results:** 32 patients were included, 17 of them men (53,1%) and 15 women (46,9%). The most common histology was adenocarcinoma (n=26, 81,25%). CTCs were detectable in 78,2% (25) of patients at the beginning of treatment, in 85,2% (25) of patients 8 weeks after, and in 76,2% (16) after 16 weeks. Median of CTCs/8mL was considered cut-off point for each time, which was 16 CTCs/8mL. There was a trend in longer disease-free survival and overall survival in those patients whose CTCs level were under median, compared to those equal or above it (p value = 0,083 and 0,45) after eight weeks of

chemotherapy. When comparing CTC's kinetics at baseline and 8 weeks after treatment with platinum doublets, there was a difference in disease-free survival in those patients with decrease of CTC's levels or whose levels remained undetectable (8,48 months), comparing to an increase (3,42 months; $p=0,047$). There was no correlation between CTC's levels and radiographic response. **Conclusion:** CTCs are detectable in a high percentage of patients with metastatic NSCLC. There was a trend of higher DFS and OS in patients with CTC's levels above median, especially after 8 weeks of treatment (CTC2). A higher DFS was observed in patients whose CTC's levels decreased after 8 weeks of treatment or remained undetectable, in those submitted to doublet platinum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração dos achados nas células, após o processo de filtração no ISET®.....	18
Figura 2	Sobrevida Livre de Progressão segundo mediana de contagem de CTC2 (primeiro <i>follow-up</i>).....	28
Figura 3	Sobrevida Global segundo mediana de Contagem de CTC2 (primeiro <i>follow-up</i>).....	29
Figura 4	Sobrevida Global segundo mediana de Contagem de CTC3 (segundo <i>follow-up</i>).....	31
Figura 5	Sobrevida livre de progressão mediana dos grupos de diferentes cinéticas das CTCs nos momentos <i>baseline</i> (CTC1) <i>versus</i> CTCs no primeiro <i>follow-up</i> (CTC2).....	32
Figura 6	Cinética de CTCs (CTC1 <i>versus</i> CTC2).....	33
Figura 7	Mediana de idade e Sobrevida Global.....	34
Figura 8	Curva de Sobrevida Global dos estádios T1 ou T2 e T3 ou T4	38
Figura 9	Sobrevida Global dos grupos N0 e N maior que 1.....	39
Figura 10	Sobrevida Livre de progressão conforme cinética de CTCs (CTC1 <i>versus</i> CTC2).....	41
Figura 11	SLP conforme cinética das CTCs no momento CTC1 <i>versus</i> CTC3.....	42
Figura 12	SLP conforme tipo histológico.....	46
Figura 13	SG conforme tipo histológico.....	47

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Cálculos de sensibilidade e especificidade através do método padrão (imagem) versus valores de mediana nas CTCs 1, 2 e 3.....	22
Quadro 2	Grupos de Evolução de CTCs entre coletas inicial (CTC1) versus primeiro <i>follow-up</i> (CTC2) e inicial versus segundo <i>follow-up</i> (CTC3).....	25
Quadro 3	Características de cada paciente quanto ao tipo histológico, estágio T, N e M, contagem de CTCs nos momentos 1, 2 e 3, sobrevida livre de p.....	35
Quadro 4	Coleta de CTCs nos momentos 1, 2 e 3 e avaliação de resposta radiológica de cada paciente progressão (SLP) e sobrevida global (SG).....	36
Quadro 5	Associação entre níveis de CTCs no momento 2o <i>follow-up</i> e variáveis clínicas sexo, mediana de idade, tipo histológico, estadio T agrupado, estadio N agrupado e número de sítios metastático.....	36
Quadro 6	Coleta de CTCs nos momentos 1, 2 e 3 e avaliação de resposta radiológica de cada paciente.....	44
Quadro 7	Sobrevida Livre de Progressão e Sobrevida Global conforme variáveis clínicas sexo, mediana de idade e estadios agrupados T e N	45
Tabela 1	Valores de sensibilidade e especificidade segundo curva ROC e mediana de contagem de CTCs (segundo e terceiro momentos).....	21
Tabela 2	Características clínico-patológicas dos pacientes.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
CD45	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, C
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK	Citoqueratina
CO	Cintilografia Óssea
CPNPC	Câncer de Pulmão não pequenas células
CT	Tomografia Computadorizada
CTC	Circulating Tumor Cell
DAPI	<i>4-6-diamino-2-phenylindole</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISET	Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells
MET	Mesenchymal Epithelial Transition factor
PD1	Programmed Cell Death-1
PDL1	Programmed Cell Death Ligand-1
PETCT	Tomografia por emissão de Pósitrons
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RET	Rearranged During Transfection
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
ROS1	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS
RR	Risco Relativo
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SG	Sobrevida Global
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEM	Transição Epitélio-Mesênquima

TKI	Tirosine-kinase Inhibitor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Panorâmica atual do câncer de pulmão não pequenas células.....	1
1.2	Importância da análise de células tumorais circulantes.....	4
1.3	Aplicação clínica.....	8
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo primário	12
2.2	Objetivos secundários	12
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1	Desenho do Estudo	13
3.2	Critérios Gerais de Inclusão	14
3.3	Critérios Gerais de Exclusão	14
3.4	Pacientes.....	15
3.5	Amostras de Sangue	17
3.5.1	Isolamento, purificação e leitura de CTCs pelo ISET	17
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
5	RESULTADOS.....	20
5.1	Pacientes.....	20
5.2	Contagem de CTCs.....	21
5.2.1	Interpretação dos resultados obtidos nas coletas de CTCs e definição de ponto de corte.....	21
5.2.2	Modificação dos níveis de CTCs ao longo do tratamento: avaliação da cinética nos momentos CTC1 versus CTC2 e CTC1 versus CTC3..	23
5.3	CTCs e correlação com sobrevida livre de progressão e global.....	27

5.4	Avaliação do impacto das variáveis clínicas mediana de idade, estágio T e estágio N agrupado na contagem de CTCs nos momentos 1, 2 e 3.....	35
5.5	Avaliação da cinética da contagem de CTCs e correlação com sobrevida livre de progressão.....	37
5.6	Avaliação de contagem de CTCs nos momentos 1, 2 e 3 e cinética nos momentos CTC1 versus CTC2 e CTC1 versus CTC3 na subpopulação de pacientes submetidos a doublet de platina.....	40
5.7	Correlação de contagem de CTCs com avaliação de resposta radiológica	43
5.8	Impacto das variáveis clínicas na sobrevida livre e progressão e sobrevida global	45
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	565
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	57

ANEXO

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 PANORÂMICA ATUAL DO CÂNCER DE PULMÃO NÃO PEQUENAS CÉLULAS

O câncer de pulmão é o câncer mais comum e a principal causa de morte por câncer em ambos os gêneros no mundo, com estimados 1,8 milhões de casos novos e 1,6 milhões de óbitos decorrentes da doença estimados para o ano de 2012 (BRAMBILLA et al. 2014). Nos EUA, foram estimados 224.210 casos novos e 159.260 mortes decorrentes de câncer de pulmão no ano de 2014 (SIEGEL et al. 2015), sendo menos comum apenas do que câncer de mama e próstata. No Brasil, foram estimados 27.330 casos novos por câncer de pulmão em 2014, sendo o segundo câncer mais comum em homens e o quarto em mulheres, excluindo-se os cânceres de pele não-melanoma (Ministério da Saúde 2014). Possui taxa de mortalidade maior do que qualquer outro tipo de câncer, com apenas 16,6% dos pacientes vivos após 5 anos do diagnóstico (HOWLANDER et al. 2011).

O câncer de pulmão é representado, em 85% dos casos, pelo subtipo histológico não pequenas células, que compreende os adenocarcinomas, os carcinomas espinocelulares e os carcinomas de grandes células, e o restante, 15%, é representado principalmente pela histologia pequenas células. Os adenocarcinomas são a histologia mais comum nos EUA e entre os não fumantes.

O panorama do câncer de pulmão acompanha o perfil do tabagismo, responsável por 85 a 90% dos casos desta neoplasia, constituindo uma das causas de morte por câncer mais evitável no mundo. O risco aumenta conforme o número de maços ao dia e tempo de exposição. Outros fatores de risco conhecidos são a exposição a carcinógenos ambientais e ocupacionais como poluição atmosférica, asbesto, arsênio, radônio e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, dentre outros, responsáveis por cerca de 5 a 10% dos casos (OMENN et al. 1986; STRAIF et al. 2009; LOOMIS et al. 2013). Além disso, contribuem também em cerca de 5% dos casos, a inflamação pulmonar recorrente, a fibrose pulmonar secundária, a tuberculose e história familiar (FRAUMENI et al. 1975).

Os sintomas mais comuns, como tosse, dispnéia e dor torácica, estão presentes em geral na fase avançada da doença. Isso contribui para que na maioria (56%), estes tumores sejam diagnosticados tardiamente, quando já existem metástases à distância (ETTINGER et al. 2012). Nestes casos, a sobrevida estimada em 5 anos é de apenas 3,7%.

O tratamento dos pacientes em estágio IV é basicamente sistêmico, com uso de mono ou poliquimioterapia, combinadas ou não ao uso de anticorpos monoclonais, além de inibidores de tirosina-quinase em pacientes portadores de mutações específicas que ativam vias que são fundamentais para crescimento e desenvolvimento tumoral (*driver mutations*). Dentre o arsenal de quimioterápicos estão os antimetabólitos (como gemcitabina e pemetrexede), taxanos (docetaxel e paclitaxel), alcalóides da vinca (vinorelbine). Quando optado pela combinação, em geral são associados a

derivados de platina (cisplatina e carboplatina) e, eventualmente, a anticorpo monoclonal (bevacizumabe). Dentre os inibidores tirosino-quinase estão o erlotinibe, gefitinibe (inibidores EGFR), crizotinibe (inibidor ALK). A escolha do regime a ser utilizado depende, basicamente, da *performance* do paciente, além da idade, comorbidades, linha de tratamento e presença ou não de mutações ativadoras em genes conhecidos como EGFR, ALK, ROS1, RET, MET etc.

Em termos de tratamento sistêmico, houve grande avanço em ganho de sobrevida e qualidade de vida nas últimas décadas. A sobrevida global, que nos primeiros estudos da década de 70 não ultrapassava 6 meses (WOODCOCK et al. 1983), atingiu o patamar dos 30 meses com esquemas de tratamento mais recentes (PAO e CHMIELECKI 2010, GROEN et al. 2011). Além de quimioterapia, muito se evoluiu no manejo destes pacientes nos setores de diagnóstico por imagem, anatomia patológica, radioterapia, cirurgia e tratamento de suporte.

No entanto, no campo de desenvolvimento de biomarcadores, muito ainda precisa ser feito para que haja ferramentas que possam ser utilizadas na prática clínica. São estimados que apenas 45 a 54% dos pacientes que progridam a primeira linha de quimioterapia, recebam linhas subsequentes de tratamento sistêmico (LANGER et al. 2015). Isso evidencia que os exames de imagem, padrão atual de avaliação de resposta ao tratamento, identificam progressão de doença de forma muito tardia. Não é incomum, por exemplo, que no momento da progressão, paciente apresente intercorrências sérias como síndrome de veia cava superior e compressão

medular, sintomas neurológicos por franca progressão em sistema nervoso central ou carcinomatose meníngea, sepse grave, eventos tromboembólicos etc. De fato, muitos pacientes acabam evoluindo a óbito de forma rápida por esses motivos.

1.2 IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

Estudos têm demonstrado que as células tumorais na circulação sanguínea, advindas do tumor primário, podem originar metástases à distância (COELLO et al. 2004, PATERLINI-BRECHOT e BENALI 2007; CHAFFER e WEINBERG 2011). A presença dessas células pode representar, inclusive, um dos hallmarks do câncer (invasividade), inicialmente proposto por HANAHAN e WEINBERG (2000). Recentemente, o interesse nas técnicas de isolamento de CTCs (do inglês, *Circulating Tumor Cells*) tem sido crescente, em diferentes neoplasias sólidas, após vários estudos demonstrarem correlação entre a contagem dessas células e o prognóstico de algumas neoplasias (CRISTOFANILLI et al. 2004, BUDD et al. 2006; HAYES et al. 2006; DANILA et al. 2007; COHEN et al. 2008; DE BONO et al. 2008; KREBS et al. 2011). A utilidade das CTCs abrange: - rastreamento (ILIE et al. 2014), - avaliação da doença inicial, cuja detecção poderia prever risco maior de recidiva (HOFMAN et al. 2011a): - doença metastática, cujo acompanhamento dos níveis de CTCs ao longo do tratamento sistêmico poderia prever resposta ou não, antes mesmo da

avaliação radiológica (HOFMAN et al. 2011b; PARKINSON et al. 2012), implicando mudança precoce de conduta para um tratamento possivelmente mais eficaz. Além disso, a análise molecular das CTCs permite detectar de forma menos invasiva, driver mutations, o que permitiria selecionar terapia mais eficaz, com menor toxicidade (MAHESWARAN et al. 2008; PAILLER et al. 2013). Outra aplicação da análise de CTCs está na identificação de genes de resistência a drogas, por meio da imunocitoquímica, possibilitando tratamento mais personalizado (GAZZANIGA et al. 2008, 2010).

Existem diferentes técnicas para isolar as células tumorais circulantes, que são classificados em imunológicos (imunocitoquímica combinada com fluorescência, técnicas de separação imunomagnéticas), físicos (separação das células por tamanho, densidade) e moleculares (RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction). Os marcadores moleculares geralmente usados são as citoqueratinas 19 e 20. Embora sensíveis, as técnicas de RT-PCR são pouco específicas, levando a resultados falso-positivos, por contaminação com leucócitos (THORSTEINSSON e JESS 2011).

Um dos métodos moleculares mais conhecido é o AdnaTest™ (AdnaGen AG, Langenhagen, Germany), que tem sido usado em estudos com câncer de mama e permitindo uma análise mais específica, pois usa marcadores deste tumor (MULLER et al. 2012). Contudo, após isolamento das CTCs não permite análises adicionais (BEDNARZ-KNOLL et al. 2011).

O sistema *CellSearch*™ (Veridex, Huntingdon, Valley,PA) é um método imunológico que consiste na coleta de sangue em tubo patenteado

(*Cellsave*, Veridex) que permite que as CTCs fiquem viáveis por até 72 horas. O sistema *CellSearch*TM permite que as CTCs sejam visualizadas e quantificadas, porém não avalia a morfologia das células. A separação das células é feita por meio de pérolas magnéticas usando anticorpos anti-EpCAM e anti-citoqueratinas (anti-CK 8,18 e 19). A seleção negativa, para diferenciação dos leucócitos, é feita com anti-CD45. Para que uma célula seja considerada CTC, precisa apresentar núcleo oval, positividade para citoqueratina e DAPI (*4-6-diamino-2-phenylindole*). Este último, para comprovar a presença de núcleo e excluir fragmentos celulares. Além disso, as células precisam ser negativas para CD45. A análise requer 7,5 mL de sangue periférico.

Estudos com centenas de pacientes correlacionando contagem de CTCs e prognóstico pela do uso da técnica de *CellSearch* TM System (Johnson & Johnson) levou a aprovação desta técnica pelo US Food and Drug Administration -FDA (2015) para monitoramento de resposta ao tratamento sistêmico em câncer de mama, próstata e de cólon e reto metastáticos (CRISTOFANILLI et al. 2004; RIETHDORF et al. 2007; COHEN et al. 2008; DE BONO et al. 2008).

Transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo no qual as células perdem características epiteliais, tais como uma diminuição na expressão da molécula E-caderina, e adquirem um fenótipo mesenquimal, acompanhado pelo aumento de expressão de vimentina, por exemplo. TEM está envolvida na maior flexibilidade celular, particularmente durante a embriogênese, mas também permite remodelamento dinâmico durante a

regeneração de tecidos diferenciados (SHOOK e KELLER 2003). Células cancerosas metastáticas, com potencial invasivo passam pelo processo de TEM. Acredita-se que este processo ocorra em estágios iniciais da invasão de carcinoma e que proteja as células da morte, ajude-as a escapar da resposta imunológica e mais importante, confirmam resistência a terapias convencionais (LIANIDOU et al. 2013). CTCs têm se mostrado, pelos métodos diagnósticos disponíveis, como uma população heterogênea de células com potencial variável para estabelecer metástases distantes. Estas células, quando ainda nos tumores primários, sofrerem alterações fenotípicas que permitem a penetração nos vasos sanguíneos (LI et al. 2013). TEM parece ter implicação neste processo e constitui um fator limitante de todos os métodos imunológicos que usam EpCAM e CK como identificadores.

O *Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells; Rarecells, France* (ISET™) constitui-se de um método direto de enriquecimento das células epiteliais por filtração. Baseia-se na observação de que a maioria dos leucócitos do sangue periférico (linfócitos e neutrófilos) são as menores células do corpo, com um tamanho que varia de 8 a 11 μm . Desta forma, estas células podem ser eliminadas por filtração do sangue através de uma membrana de policarbonato com poros calibrados de 8 μm . A simplicidade do método evita a perda de células raras em múltiplos passos de isolamento. Após isoladas, as CTCs podem ser avaliadas por Giemsa, hematoxilina-eosina, ou caracterizadas por imunocitoquímica, FISH (Fluorescence in situ hybridization), TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl

transferase dUTP nick end labeling) ou microdissecadas para análise molecular (PATERLINI-BRECHOT e BENALI 2007).

1.3 APLICAÇÃO CLÍNICA

Não somente em câncer de mama, próstata e colorretal, mas a presença de CTCs tem sido objeto de estudo em várias publicações também em câncer de pulmão não pequenas células. MARRINUCCI et al. (2009) relataram o caso de uma paciente não-fumante diagnosticada em estágio III de CPNPC (carcinoma de pulmão não pequenas células). Ela apresentou recorrência dois anos após tratamento. Decorridos dois anos da terapia para recidiva, 67 CTCs/10 mL foram identificadas em seu sangue periférico por um protocolo de imunofluorescência e coloração com Wright-Giemsa. Pela comparação da citomorfologia das CTCs com as células isoladas do tumor primário foi possível observar que as CTCs tinham morfologia similar às últimas. Isto demonstra que células de aparência similar às da massa do tumor primário podem ser encontradas na circulação sanguínea num tempo relativamente tardio da evolução da doença metastática.

Um estudo realizado na Inglaterra por KREBS et al. (2011) com 101 pacientes com CPNPC sem tratamento prévio, estádios III e IV antes e após a administração de um ciclo de quimioterapia padrão, investigou a capacidade das CTCs de indicar resposta à terapia. As CTCs foram avaliadas pelo *CellSearch™ System* e seu número foi maior nos pacientes em estágio IV (n= 60) em comparação com aqueles em estágio IIIB (n= 27)

e IIIA (n= 14), onde nenhuma CTC foi detectada (n= 14). A sobrevida livre de progressão foi de 6,8 *versus* 2,4 meses ($p < 0,001$) e a global foi de 8,1 *versus* 4,3 meses ($p < 0,001$) para pacientes com menos do que 5 CTCs/7,5 mL comparados com aqueles com 5 ou mais CTCs/mL antes da quimioterapia. Na análise multivariada, o número de CTCs foi o fator preditor de sobrevida global mais forte (Risco Relativo (RR)= 7,92; IC95%: 2,85-22,01; $p < 0,001$) e a estimativa de risco aumentou na segunda amostra de CTC colhida após o primeiro ciclo de quimioterapia (RR= 15,65; IC95%: 3,63-67,53; $p < 0,001$).

HOFMAN et al. (2011a) avaliaram a possibilidade de detecção de CTCs pela técnica de ISET em pacientes candidatos à ressecção cirúrgica e correlacionaram com achados anátomo-patológicos e desfecho clínico. Para isso, foram analisados o sangue de 208 pacientes com diagnóstico CPNPC de diversas histologias, antes da cirurgia e também, amostras de sangue de 39 voluntários saudáveis. Desses, 44% encontravam-se em estágio I, 25% em estágio II, 28% estágio III e 6% estágio IV. Foram detectadas CTCs em 37% dos pacientes e não houve detecção em indivíduos saudáveis. Não houve correlação entre presença de CTCs e os diferentes estádios, mas contagens iguais ou superiores a 50 CTCs/10 mL estiveram relacionadas a piores sobrevida global ($P=0,002$) e sobrevida livre de progressão ($P=0,001$) comparados às contagens inferiores a 50 CTCs/10 mL.

Uma metanálise por MA et al. (2012) de 27 estudos publicados com pacientes portadores de câncer de pulmão de diversas histologias e estádios avaliou impacto da presença de CTCs antes ou após tratamento na

sobrevida livre de progressão e sobrevida global. A presença de CTCs pré-tratamento esteve associada com pior sobrevida global e livre de progressão com um risco relativo de 2,61 (95%IC 1.82-3.74) e 2,37 (95%IC 1.41-3.99), respectivamente. No caso das CTCs estarem presentes após o tratamento, também houve impacto negativo tanto em sobrevida global (RR 4.19 95%IC 2.92-6.0) quanto livre de progressão (RR 4,97 95%IC 3.05-8.11).

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

HOFMAN et al. (2011b) avaliaram 210 pacientes consecutivos com CPNPC antes de serem submetidos a cirurgia radical. O sangue periférico desses pacientes foi coletado e analisado quanto a presença de CTCs tanto pelo método ISET quando CellSearch™. Foram identificadas CTCs em 50% dos pacientes pelo método ISET e em 39% dos pacientes pelo método imunomagnético. A presença de CTCs tanto pelo método ISET quanto pelo CellSearch™ correlacionou-se com pior SLD ($p < 0,0001$)

Pelo nosso grupo, foi publicado relato de caso de paciente com CPNPC metastático, submetida a coleta de CTCs pelo método imunomagnético (Miltenyi) e ISET. Apesar de franca progressão clínica e

radiológica; pelo método imunomagnético, a paciente evoluiu com queda de CTCs, ao passo que ISET confirmou aumento progressivo nos níveis de CTCs (CHINEN et al. 2013).

Embora ainda não aprovado pelo FDA, o ISET já passou por validações técnicas (VONA et al. 2000, KREBS et al. 2012) e clínica (HOFMAN et al. 2011a e b)

Em nosso projeto, usamos o método ISET para isolar e identificar as CTCs, a fim de correlacionar seus níveis com desfecho clínico (sobrevida livre de progressão e resposta clínica ao tratamento) em pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão de células não pequenas metastático que iriam iniciar nova linha de tratamento sistêmico (quimioterapia ou terapia-alvo com inibidores tirosino-quinase).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Detectar CTCs no sangue periférico de pacientes com câncer de pulmão não pequenas células metastático pelo método ISET, avaliando o seu papel preditivo e prognóstico.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- ✓ Correlacionar níveis de CTCs individual com sobrevida global e livre de progressão em cada momento do tratamento;
- ✓ Verificar variação dos níveis de CTCs individual (cinética) ao longo do tratamento e correlacionar com sobrevida global e livre de progressão;
- ✓ Correlacionar os níveis de CTCs individual após quimioterapia, com exames de imagem, conforme critérios do RECIST 1.1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Esse foi um estudo prospectivo realizado por meio de coleta de sangue (sangue total) de pacientes consecutivos com câncer de pulmão não pequenas células metastático ao diagnóstico, ou que apresentaram recidiva após tratamento da doença localizada.

Participaram do estudo apenas os pacientes que leram e assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa deste Hospital (**Registro CEP nº 1367/10**) (**Anexo 1**). A identificação dos pacientes foi feita por códigos para preservar sua confidencialidade.

O sangue dos pacientes foi coletado em três tempos, seguindo rotina de avaliação de resposta radiológica do Departamento de Oncologia Clínica: antes do início de um tratamento sistêmico (*baseline* ou CTC1), 8 semanas (primeiro *follow-up* ou CTC2) e após 16 semanas após o início do tratamento (segundo *follow-up* ou CTC3). Todos os participantes tiveram 8 mL de sangue coletados a cada visita programada, conforme previsto no desenho do estudo.

3.2 CRITÉRIOS GERAIS DE INCLUSÃO

Foram incluídos nesse estudo pacientes que preenchessem os seguintes critérios:

- ✓ Idade igual ou superior a 18 anos;
- ✓ Assinatura do TCLE;
- ✓ Diagnóstico histológico de câncer de pulmão não pequenas células metastático;
- ✓ Pacientes que iniciaram pela primeira vez quimioterapia para doença metastática, ou iniciaram nova linha de quimioterapia após progressão ao esquema vigente;
- ✓ Extensão da doença determinada por exame físico e por imagem;
- ✓ Doença mensurável pelos critérios RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) versão 1.1

3.3 CRITÉRIOS GERAIS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos desse estudo pacientes que apresentaram as seguintes características:

- ✓ Pacientes que tivessem realizado cirurgia ou procedimento cirúrgico nos últimos quatro dias;
- ✓ Pacientes com história prévia de outro carcinoma nos últimos dois anos, exceto câncer de pele não melanoma ou carcinoma do colo uterino não invasivo.

3.4 PACIENTES

Após consulta no Departamento de Oncologia Clínica, os pacientes considerados elegíveis pelos médicos assistentes, foram encaminhados para coleta de sangue e assinatura do TCLE numa sala de pós-consulta, desse mesmo departamento. O sangue dos pacientes só foi colhido por uma enfermeira após assinatura do TCLE, confirmação do diagnóstico histológico de CPNPC e presença de doença à distância (seja ao diagnóstico ou que tenham assim evoluído após tratamento da doença localizada). Nos casos em que a confirmação necessitasse de intervenção cirúrgica de qualquer espécie, foram aguardados 4 dias após a cirurgia/biópsia para a coleta de sangue (PATCHMANN 2005) para evitar que as CTCs fossem confundidas com células epiteliais que poderiam porventura ter-se desprendido do órgão operado e atingido a circulação sanguínea (PATERLINI-BRECHOT e BENALI 2007). Se o paciente tivesse sido submetido à radioterapia, o sangue era coletado após 15 dias do término deste tratamento.

Para o acompanhamento dos pacientes, informações clínico-patológicas (idade, sexo, estadiamento T, N e M, doença metastática ao diagnóstico ou recidivada, data do diagnóstico, histologia, sítios de metástases, datas e exames de imagem realizados, resposta radiológica, data da progressão e óbito e motivo) e dados do tratamento realizado (linha de tratamento, quimioterapia isolada ou combinada e drogas escolhidas, uso de anticorpo monoclonal ou TKI, intervalo dos ciclos e quantidade de ciclos realizados) foram anotados numa ficha específica.

No momento da inclusão, pacientes considerados metastáticos eram submetidos a exames de imagem que serviriam de base para avaliação do primeiro tratamento sistêmico (primeira linha), ou para avaliação de um novo tratamento (quando paciente já havia sido submetido a algum tratamento sistêmico e, após definida progressão a esse tratamento, iniciaria nova linha de quimioterapia). A avaliação de resposta radiológica foi considerada padrão-ouro para definir eficácia da quimioterapia. Pacientes foram reestadiados e acompanhados através de PETCT (tomografia por emissão de pósitrons), RNM (ressonância nuclear magnética), TC (tomografia computadorizada) ou CO (cintilografia óssea) das lesões consideradas alvo. Após 8 semanas de tratamento, o paciente era submetido a novos exames de imagem para avaliação de resposta e esses eram comparados aos exames iniciais (resposta 1). Conforme critérios preconizado pelo RECIST 1.1 (EISENHAUER et al. 2009), pacientes com progressão de doença eram aqueles cuja lesão-alvo apresentava crescimento superior a 30% ou evoluíam com aparecimento de novas lesões neoplásicas. Aqueles cuja avaliação não preenchia tais critérios eram considerados respondedores clínicos. Conforme houvesse resposta clínica, era dada continuidade ao mesmo tratamento e no caso de progressão, o tratamento vigente era interrompido. Após 16 semanas do início do tratamento, novos exames de imagem eram realizados e comparados com os exames iniciais, conforme os critérios do RECIST 1.1 (resposta 2). Mudança ou não de conduta também era tomada conforme tal comparação pelo médico assistente.

Com relação à conduta clínica, nada foi alterado após os resultados dos exames de CTCs, uma vez que se trata de estudo experimental.

3.5 AMOSTRAS DE SANGUE

3.5.1 Isolamento, purificação e leitura de CTCs pelo ISET

Amostras de sangue (8,0 mL) foram coletadas em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente sob homogeneização e processadas dentro de 4 horas da coleta. As amostras eram, então, diluídas a 1:10 em tampão de lise de eritrócitos (ISET Buffer™) e após 10 minutos de incubação, filtradas pela técnica de ISET. Após filtragem, as membranas eram lavadas com PBS, removidas do ISET Block™, secas ao ar livre *overnight* e estocadas a -20°C até o momento da análise.

Para contagem das CTCs, as membranas de ISET eram cortadas e submetidas à imunocitoquímica com anticorpo anti-CD45 (1:100; clone 2B11 + PD7/26, Dako™), um marcador de superfície de leucócitos para diferenciá-los das CTCs. A reação era realizada conforme previamente descrito por CHINEN et al. (2013). Após montagem, as lâminas eram examinadas através de microscópio óptico comum. As CTCs foram caracterizadas de acordo com os seguintes critérios: negatividade para CD45, tamanho nuclear igual ou maior que 16 µm, irregularidade do contorno nuclear e hipercromasia, presença de citoplasma visível, alta proporção núcleo-citoplasma (>0,8). Quando faltava qualquer dos critérios descritos, as células

eram classificadas como atípicas (KREBS et al. 2012). Os resultados eram dados em número de CTCs em 8 mL de sangue. As fotos das CTCs filtradas e identificadas encontram-se na Figura 1.

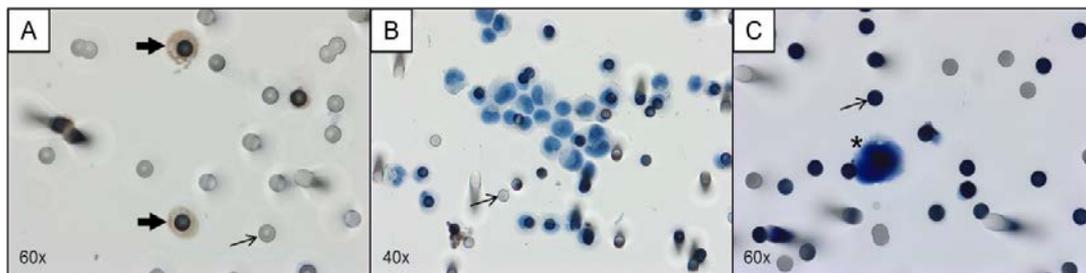


Figura 1 - Ilustração dos achados nas células, após o processo de filtração no ISET®. **A)** Imunocitoquímica com CD45 em leucócitos, contracoloração com DAB, com aumento de 60x. **B)** Controle positivo, sangue de paciente sadio acrescido de células da linhagem A549 (adenocarcinoma de pulmão), com aumento de 40x. **C)** Célula tumoral circulante (CTC), com aumento de 60x. O asterisco mostra uma CTC, setas espessas mostram leucócitos e setas finas mostram os poros calibrados de 8 μ m da membrana do ISET®. Todas as fotomicrografias foram tiradas no microscópio de campo claro BX61 – Olympus, Tóquio, Japão, acoplado à câmera digital SC100 – Olympus, Tóquio, Japão.

Foram usados como controle negativo para as amostras de CTCs, sangue de indivíduos sadios coletados no banco de sangue do A.C. Camargo Cancer Center e como controle positivo, este mesmo sangue *spiked* com células tumorais de pulmão mantidas em cultura. (células de linhagem de carcinoma de pulmão A549)

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita uma análise descritiva das variáveis clínico-patológicas e de tratamento para cada grupo.

Para avaliar diferenças entre os grupos, o método do Qui-Quadrado foi usado para variáveis categóricas. Para se estimar as curvas de sobrevividas global e livre de progressão foi usado o método de Kaplan-Meier e a diferença entre as curvas foi calculada pelo método do log-rank. Para comparação entre níveis de CTCs e exames de imagem foi realizado o teste de Mann-Whitney. Toda análise estatística foi feita usando-se o programa SPSS para Windows, versão 15. Os valores de p foram considerados significativos quando $\leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PACIENTES

De 6 de julho de 2012 a 11 de outubro de 2013, foram incluídos 32 pacientes, dos quais 17 eram homens (53,1%) e 15 eram mulheres (46,9%). A mediana de idade foi de 65 anos (37 a 81 anos). 23 pacientes (71,87%) apresentaram diagnóstico de câncer de pulmão não pequenas células metastáticos ao diagnóstico e 9 pacientes (28,13%) apresentaram recidiva após terem sido tratados para doença localizada. A histologia adenocarcinoma compreendeu a maioria dos pacientes (81,25%) e o restante foi composto por pacientes portadores de carcinoma espinocelular (12,5%) e carcinoma indiferenciado (6,25%).

Em 22 pacientes (68,75%) o tratamento foi iniciado em primeira linha, segunda linha em 7 pacientes (21,87%), terceira linha em dois pacientes (6,25%), quarta linha em um paciente (3,13%).

Na maior parte dos pacientes (62,5%), o tratamento baseou-se em esquemas quimioterápicos contendo platina (cisplatina ou carboplatina), sendo que em 6 (18,75%), foi associado anticorpo monoclonal (bevacizumabe, anticorpo anti-VEGF). Em 8 pacientes (25%), o tratamento realizado consistiu em inibidor de tirosina-quinase (erlotinibe ou gefitinibe) e em 4 pacientes (12,5%), a escolha foi de monoquimioterapia com gencitabina ou docetaxel. A Tabela 1 descreve os dados clínico-patológicos.

Tabela 1 - Características clínico-patológicas dos pacientes

Característica		N	%
Sexo	Masculino	17	53,1%
	Feminino	15	46,9%
Idade	< 67	16	50%
	≥ 67	16	50%
Tipo Histológico	Adenocarcinoma	26	81,25%
	Carcinoma Espinocelular	4	12,5%
	Carcinoma Indiferenciado	2	6,25%
Linha de tratamento	Primeira	22	68,75%
	Segunda	7	21,87%
	Terceira	2	6,25%
	Quarta	1	3,13%
Tratamento	Combinação com Platina Com Bevacizumabe	6	18,75%
	Combinação com Platina Sem Bevacizumabe	14	43,75%
	Inibidor Tirosino-Quinase	8	25%
	Mono QT	4	12,5%

O seguimento mediano dos pacientes foi de 11,94 meses (0,1 a 33,59 meses).

5.2 CONTAGEM DE CTCs

5.2.1 Interpretação dos resultados obtidos nas coletas de CTCs e definição de ponto de corte

Como não há ponto de corte pré-estabelecido para definir qualitativamente cada contagem de CTCs nos diferentes momentos, foi calculada a mediana dos valores obtidos de todos os pacientes nos momentos CTC1, CTC2 e CTC3 e estas foram consideradas como os pontos de corte. O valor de mediana obtidos nos três momentos foi de 16

CTCs/8mL. Na segunda e terceira coletas, foram registradas também as avaliações de resposta por imagem de cada paciente. Foram calculadas a sensibilidade e especificidade das medianas dos segundo e terceiro momentos conforme tabela e fórmula descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Cálculos de sensibilidade e especificidade por meio do método padrão (imagem) versus valores de mediana nas CTCs 1, 2 e 3

	Progressão (imagem)	Não progressão (imagem)
Contagem CTC \geq mediana	A	B
Contagem CTC $<$ mediana	C	D
TOTAL	A+C	B+D

$$\text{Sensibilidade} = A/A+C$$

$$\text{Especificidade} = B/B+D$$

Os valores calculados de sensibilidade e especificidade com mediana de 16 CTCs/mL no momento CTC2 foi de 85% e 57%, respectivamente. No momento CTC3, com mediana também de 16 CTCs/8mL, a sensibilidade calculada foi de 75% e especificidade de 38,4%.

Com o intuito de avaliar os pontos de corte obtidos, foi montada também uma curva ROC conforme os valores das coletas de CTCs e resposta radiológica. A curva ROC gerou pontos de corte para os momentos CTC2 e CTC3, com valores de sensibilidade e especificidade em cada momento. No momento CTC2, o ponto de corte estabelecido pela curva

ROC foi de 20 CTCs/8mL, com sensibilidade de 71% e especificidade de 50%. Para o momento CTC3, o ponto de corte estabelecido pela curva ROC foi de 28 CTCs/8mL, com sensibilidade de 75% e especificidade de 38,5%. Esses valores de sensibilidade e especificidade obtidos pela curva ROC foram comparados com os valores de sensibilidade e especificidade quando o ponto de corte considerado foi a mediana de cada momento, conforme ilustra a Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de sensibilidade e especificidade segundo curva ROC e mediana de contagem de CTCs (segundo e terceiro momentos)

	ROC CTC2	Mediana CTC2	ROC CTC3	Mediana CTC3
Sensibilidade	71%	85%	75%	75%
Especificidade	50%	57%	38,5%	38,4%

Como a sensibilidade obtida pelo ponto de corte da mediana foi superior a obtida pela curva ROC no momento CTC2, foram consideradas as medianas dos momentos CTC1, CTC2 e CTC3 como pontos de corte.

5.2.2 Modificação dos níveis de CTCs ao longo do tratamento: avaliação da cinética nos momentos CTC1 *versus* CTC2 e CTC1 *versus* CTC3

Tendo estabelecido como ponto de corte a mediana de contagem de CTCs em cada momento, foi considerado que aqueles pacientes com níveis de CTCs abaixo da mediana pertenciam ao grupo favorável, ao passo que aqueles com níveis iguais ou superiores a mediana, ao grupo desfavorável.

Com intuito de avaliar não somente de forma pontual cada coleta de CTC, mas também a variação de suas contagens ao longo do tratamento, e possível correlação com resposta radiológica e sobrevida, foram comparadas as contagens de CTCs nos momentos inicial *versus* primeiro *follow-up* e inicial *versus* segundo *follow-up*. Nessa comparação, foi identificado se os níveis absolutos de CTCs de cada paciente haviam diminuído, aumentado ou permanecido indetectáveis. Para correlação com SLD e SG, os pacientes com níveis sempre indetectáveis ou decrescentes com o tratamento foram incluídos no mesmo grupo e aqueles com níveis crescentes, em grupo distinto.

Dos 32 pacientes incluídos, apenas 21 realizaram as três coletas previstas. A mediana de contagem de CTCs nos três momentos foi de 16 CTCs/8mL de sangue. No primeiro momento (*baseline* ou CTC1), a variação de contagem foi de 0 a 214 CTCs/8mL; no segundo (primeiro *follow-up* ou CTC2) foi de 0 a 164; e no terceiro, (segundo *follow-up* ou CTC3) foi de 0 a 180 CTCs/8mL. O valor absoluto de CTCs para cada paciente, bem como as características clínico-patológicas encontram-se descritos no Quadro 2

Quadro 2 - Características de cada paciente quanto ao tipo histológico, estágio T, N e M, contagem de CTCs nos momentos 1, 2 e 3, sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG).

	T	N	M	Histologia	Quimioterapia	CTC1 (CTCs/8ml)	Data coleta CTC1	CTC2 (CTCs/8ml)	Data coleta CTC2	CTC3 (CTCs/8ml)	Data coleta CTC3	SLP (em meses)	SG
C1	4	2	1	adenocarcinoma	Carbo+taxol+ bevacizumabe	0	06.03.13	0	17.04.13	55	19.06.13	7,23	24,33
C2	4	3	1	CEC	Cisplatina+Gemcitabina	0	27.06.13	45	29.08.13			2,60	4,20
C3	2	3	1	adenocarcinoma	Docetaxel	3	29.08.13	5	29.10.13			4,40	9,93
C4	2	2	1	adenocarcinoma	Carbo+Taxol	0	20.03.13	15	21.05.13	38	22.07.13	3,47	6,47
C5	4	0	1	adenocarcinoma	Erlotinibe	150	10.07.13	25	09.09.13			2,60	60,50
C6	2	0	1	adenocarcinoma	Carbo+Pemetrexede	0	18.02.13	4	01.04.13	0	17.06.13	11,23	27,70
C7	4	2	1	adenocarcinoma	Carbo+Taxol	150	06.06.13	24	01.08.13	63	30.09.13	8,60	16,07
C8	3	1	1	adenocarcinoma	Cisplatina+ Pemetrexede	214	06.09.12	14	24.10.12	5	06.12.12	7,43	35,53
C9	3	2	1	adenocarcinoma	Carbo+Pemetrexede	28	08.10.12			180	09.01.13	2,10	6,43
C10	4	2	1	adenocarcinoma	Carbo+Taxol	24	28.02.13	0	03.04.13			2,00	3,10
C11	3	2	1	adenocarcinoma	Carbo+taxol+ bevacizumabe	15	29.04.13	45	26.06.13	88	28.08.13	14,00	56,80
C12	3	2	1	carcinoma indiferenciado	Carbo+Taxol	3	05.09.12	110	30.10.12	5	05.12.12	2,17	6,37
C13	4	0	1	carcinoma indiferenciado	Carbo+Gemcitabina	10	21.05.13					6,00	25,73
C14	4	2	1	CEC	gefitinibe	21	20.03.13	51	29.04.13	0	24.06.13	2,97	32,10
C15	4	3	1	adenocarcinoma	Carbo+Pemetrexede	96	06.07.12					Sem progressão	1,83
C16	4	0	1	adenocarcinoma	Docetaxel	15	21.08.13	68	30.12.13			7,53	66,90
C17	3	2	1	adenocarcinoma	Carbo+Taxol+ bevacizumabe	0	18.02.13	20	01.04.13	0	24.06.13	7,13	31,20
C18	4	0	1	carcinoma indiferenciado	Erlotinibe	35	09.08.12	13	27.09.12			Sem progressão	38,40
C19	2	0	1	adenocarcinoma	Docetaxel	106	01.06.13	45	29.07.13	83	27.09.13	5,23	70,50

C20	1	2	1	adenocarcinoma	Erlotinibe	15	17.10.12	20	28.11.12	13	24.01.13	2,67	61,53
C21	4	x	1	adenocarcinoma	Carbo+Pemetrexede	7	05.09.13					Sem progressão	21,13
C22	2	2	1	adenocarcinoma	Carbo+taxol+ bevacizumabe	20	22.08.12	11	24.10.12	17	12.12.12	17,00	25,70
C23	2	2	1	adenocarcinoma	Carbo+taxol+ bevacizumabe	44	03.04.13	0	28.05.13	3	28.07.13	15,57	26,60
C24	4	3	1	adenocarcinoma	Erlotinibe	10	06.06.13	18	12.08.13	20	11.10.13	24,17	25,33
C25	x	2	1	adenocarcinoma	Carbo+Pemetrexede	0	16.08.12	0	17.10.12	54	06.12.12	24,93	37,03
C26	4	0	1	adenocarcinoma	Erlotinibe	33	10.05.13	58	04.07.13	13	28.08.13	20,30	38,63
C27	4	2	1	adenocarcinoma	Carbo+Pemetrexede	15	07.03.13	5	10.04.13	0	07.06.13	3,73	26,30
C28	2	0	1	adenocarcinoma	Erlotinibe	96	04.03.13	55	17.04.13	38	10.06.13	10,77	42,83
C29	1	2	1	CEC	Cisplatina+gemcitabina	0	02.05.13	25	02.07.13	40	31.08.13	2,03	7,00
C30	2	2	1	adenocarcinoma	Carbo+taxol+ bevacizumabe	15	22.03.13	3	27.05.13	0	23.07.13	Sem progressão	27,90
C31	3	0	1	adenocarcinoma	gefitinibe	15	17.12.12	164	18.01.13			1,17	10,03
C32	3	0	1	adenocarcinoma	Gemcitabina	150	16.08.12					2,47	22,13

5.3 CTCS E CORRELAÇÃO COM SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO E GLOBAL

Para avaliação de sobrevida livre de progressão e global em função do número de CTCs no momento inicial (CTC1) foram considerados todos os 32 pacientes, dos quais se colheu amostras na totalidade. O valor do ponto de corte estabelecido foi a mediana dessa coleta (16 CTCs/8mL de sangue). A sobrevida livre de progressão mediana nesse momento foi de 5,92 meses para aqueles pacientes cuja contagem esteve abaixo da mediana (1,34 a 10,5 meses) e 5,16 meses para aqueles cuja contagem esteve maior ou igual a mediana (0 a 12,75 meses). Essa diferença não atingiu significância estatística ($p=0,703$)(Figura 2).

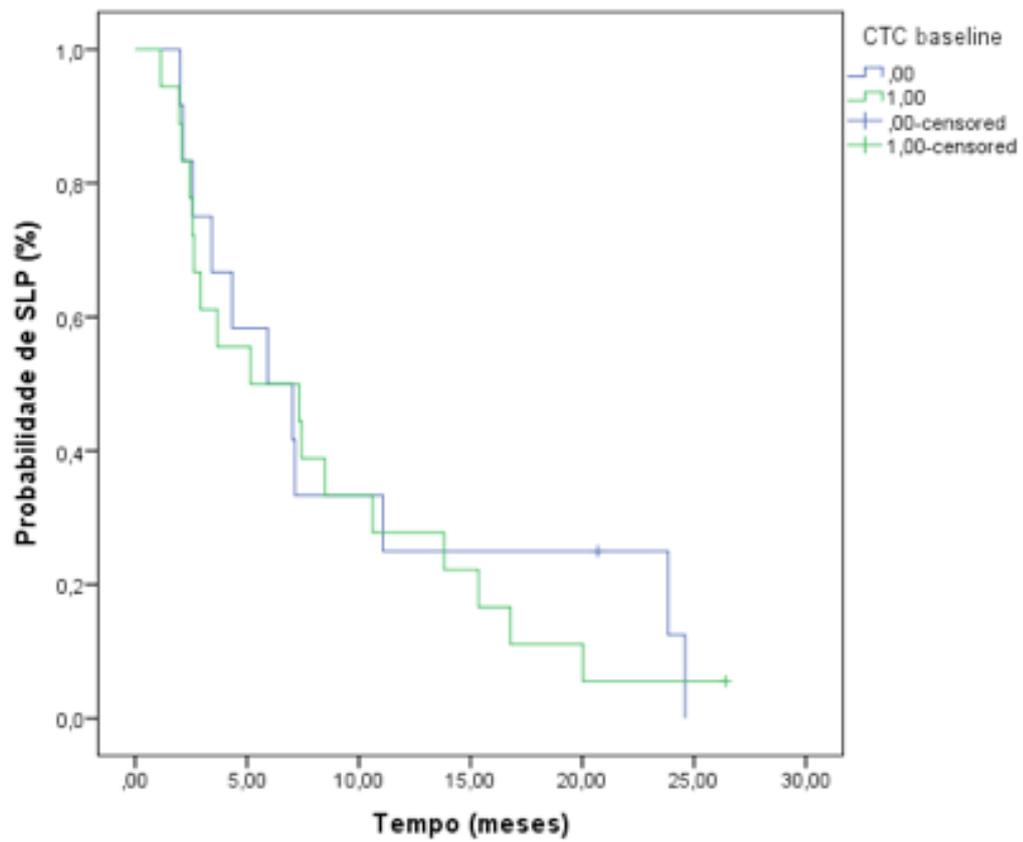


Figura 2 - Sobrevida Livre de Progressão segundo mediana de contagem de CTC1. A curva azul representa a curva de SLP dos pacientes com CTC1 abaixo da mediana e a curva verde, dos pacientes com CTC1 \geq mediana (16 CTCs/8mL de sangue)

A mediana de sobrevida global em função do número de CTCs no momento inicial (CTC1) foi de 16,31 meses (não atingida) para pacientes com níveis de CTC abaixo da mediana e de 30,95 meses (8 a 53,9 meses) para níveis iguais ou superiores a mediana. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,889$)(Figura 3).

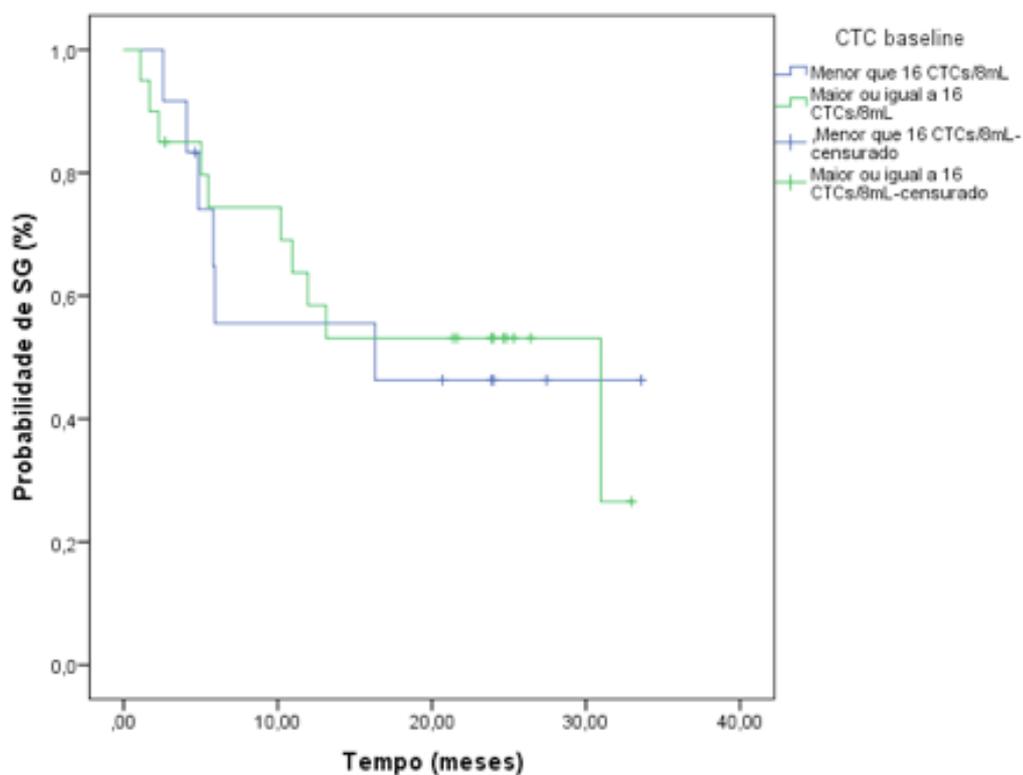


Figura 3 - Sobrevida Global segundo mediana de contagem de CTC1. A curva azul representa a curva de SG dos pacientes com CTC1 abaixo da mediana e a curva verde, dos pacientes com CTC1 \geq mediana (16 CTCs/8mL de sangue)

A mediana de sobrevida livre de progressão em função do número de CTCs no primeiro seguimento (CTC2 ou primeiro *follow-up*) foi de 11,08 meses (0 a 22,61 meses) para os pacientes com níveis abaixo da mediana e 5,16 meses (0 a 10,69 meses) para os pacientes com níveis iguais ou superiores a mediana. Apesar da diferença numérica, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,083$), o que pode ser atribuído ao número pequeno de indivíduos com amostras coletadas neste tempo. A nítida diferença entre as curvas é evidenciada pela Figura 4. Da mesma forma, esse padrão se manteve nas curvas de sobrevida global (Figura 5), cuja sobrevida global mediana não foi atingida naqueles com níveis abaixo da mediana e sendo de 30,95 meses (7,13 a 54,77 meses) naqueles com níveis iguais ou superiores a mediana, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre as curvas dos pacientes com níveis abaixo e acima ou igual à mediana ($p=0,45$).

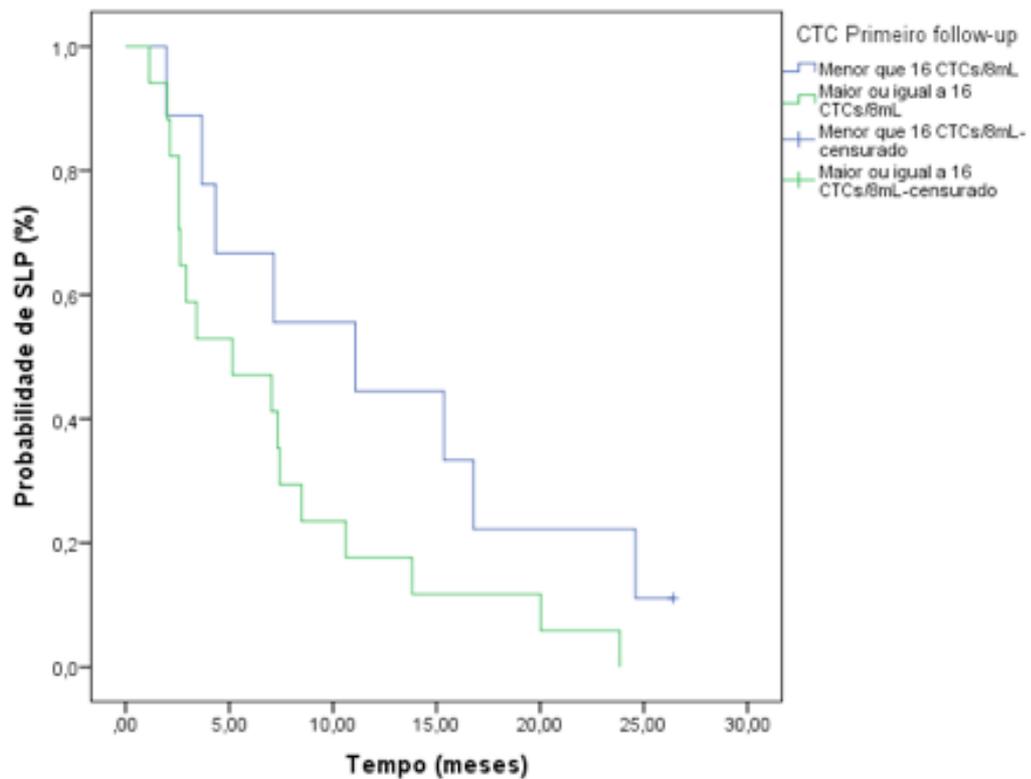


Figura 4 – Sobrevida Livre de Progressão segundo mediana de contagem de CTC2 (primeiro *follow-up*). A curva azul representa a curva de SLP dos pacientes com CTC2 abaixo da mediana e a curva verde, dos pacientes com CTC2 \geq mediana (16 CTCs/8mL de sangue)

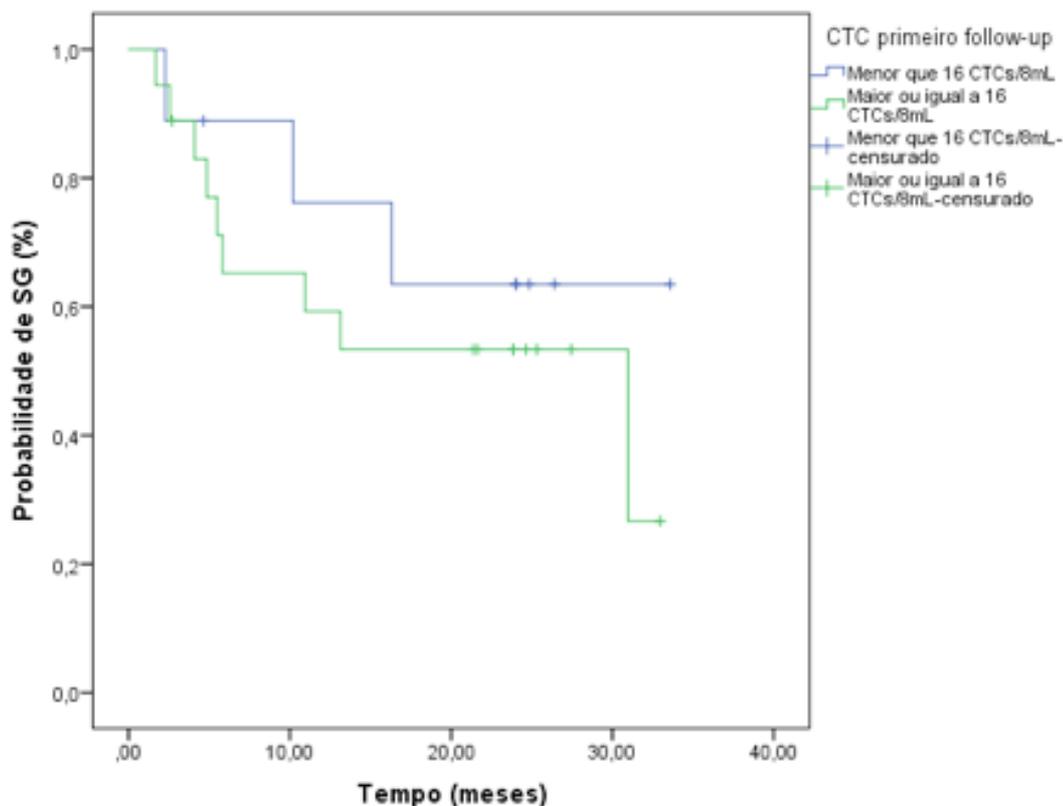


Figura 5 – Sobrevida Global segundo mediana de contagem de CTC2 (primeiro *follow-up*). A curva azul representa a curva de SG dos pacientes com CTC2 abaixo da mediana e a curva verde, dos pacientes com CTC2 \geq mediana (16 CTCs/8mL de sangue)

No segundo seguimento (CTC3 ou segundo *follow-up*), a mediana de sobrevida livre de progressão foi de 7,03 meses (1,97 a 12,1 meses) para níveis abaixo da mediana e de 8,48 meses (2,07 a 14,89 meses) para níveis iguais ou superiores a ela, sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,952$)(Figura 6). Em relação à sobrevida global, a mediana foi de 16,31 meses para níveis abaixo da mediana (não atingida) e de 30,95 meses para

níveis iguais ou superiores a ela (5,08 a 56,82 meses). Nesse caso, também não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,918$) (Figura 7).

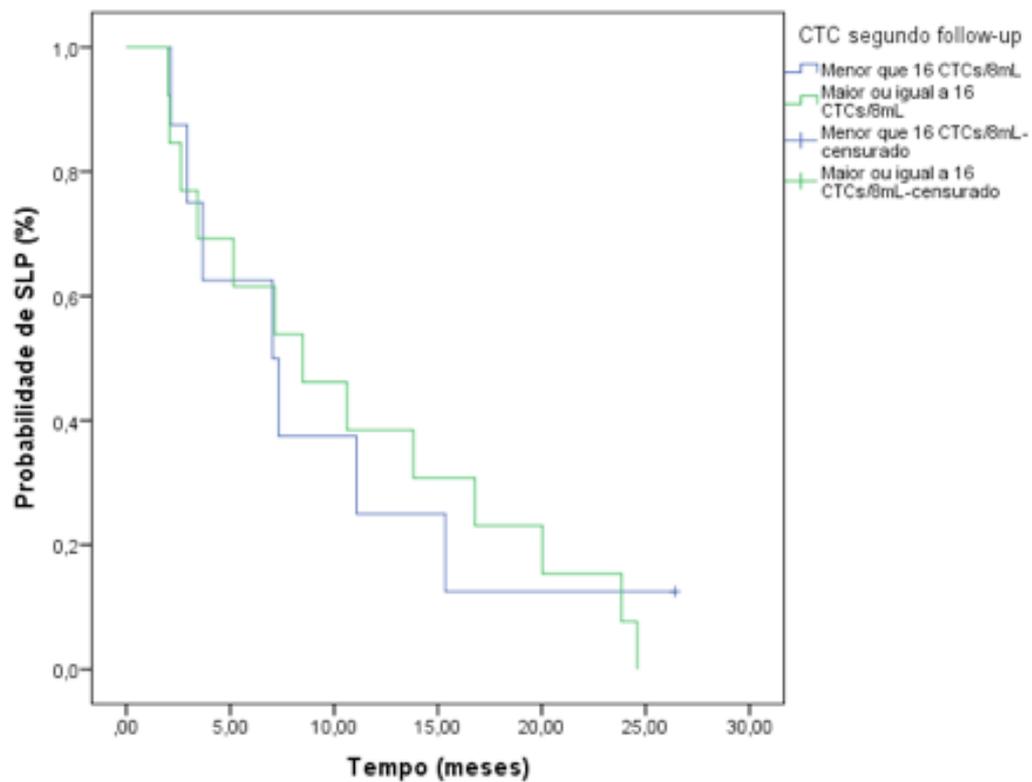


Figura 6 – Sobrevida Livre de Progressão segundo mediana de contagem de CTC3 (segundo *follow-up*). A curva azul representa a curva de SLP dos pacientes com CTC3 abaixo da mediana e a curva verde, dos pacientes com CTC3 \geq mediana (16 CTCs/8mL de sangue)

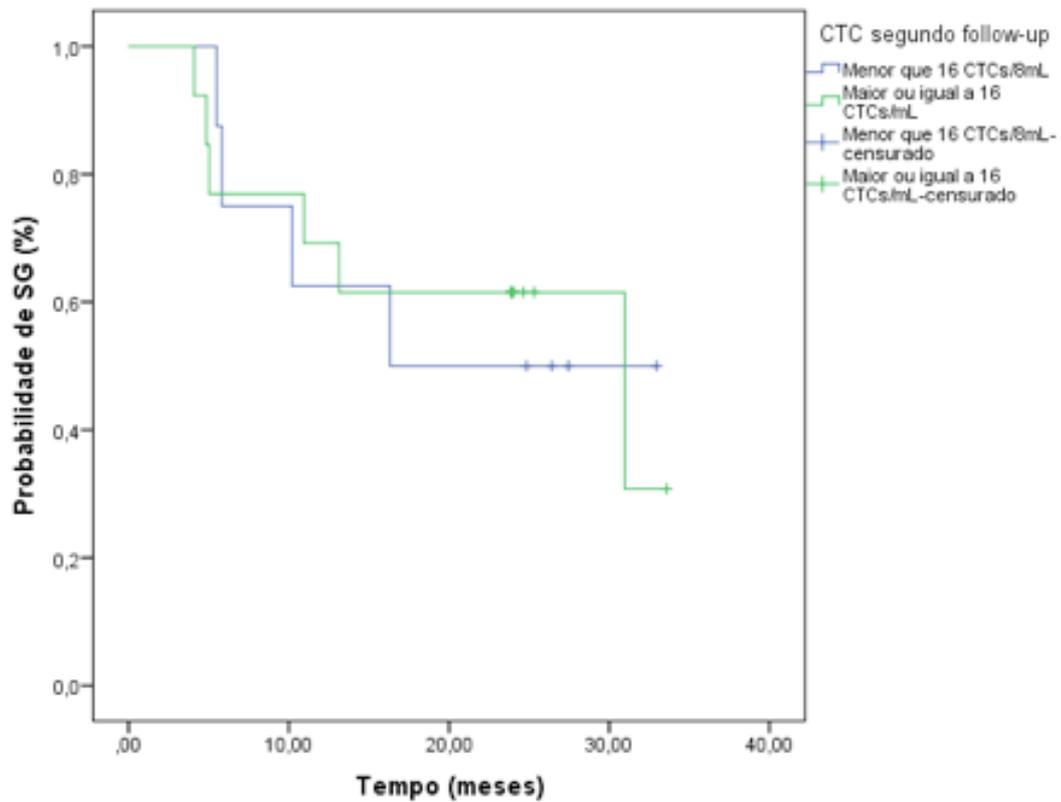


Figura 7 – Sobrevida Global segundo mediana de contagem de CTC3 (segundo *follow-up*). A curva azul representa a curva de SG dos pacientes com CTC3 abaixo da mediana e a curva verde, dos pacientes com CTC3 \geq mediana (16 CTCs/8mL de sangue)

5.4 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS MEDIANA DE IDADE, SEXO, ESTÁDIO T E ESTÁDIO N AGRUPADO E NÚMEROS DE SÍTIOS METASTÁTICOS NA CONTAGEM DE CTCs NOS MOMENTOS 1, 2 E 3

Foi feita análise de possível impacto das variáveis clínicas mediana de idade, sexo, estádios T e N agrupados e número de sítios metastáticos e contagem com níveis de CTCs nos três momentos, através do teste de Qui-Quadrado.

Conforme se pode visualizar no Quadro 3, não houve associação estatisticamente significativa entre a contagem de CTCs no momento 1 e variáveis clínicas. Houve uma tendência a menores níveis de CTCs no sexo masculino ($p=0,055$).

Quadro 3 - Associação entre níveis de CTCs no momento baseline e variáveis clínicas sexo, mediana de idade, tipo histológico, estadio T agrupado, estadio N agrupado e número de sítios metastáticos

	Sexo	Mediana Idade	Tipo Histológico	T1 e 2 X T3 e 4	N0 e N1 X N2 e N3	Número de sítios Metastáticos
CTC1 (valor de p)	P=0,055	P=0,144	P=0,219	P=0,717	P=0,135	P=0,706

No momento CTC2, não houve associação estatisticamente significativa entre contagem de CTCs e variáveis clínicas sexo, mediana de idade, tipo histológico, estádio T e N agrupados e número de sítios metastáticos (Quadro 4). Houve uma tendência a menores contagens de

CTCs em estádios N (N0 e N1) mais iniciais ($p=0,083$) e maiores contagens em estádios T mais avançados (T3 e T4)($p=0,093$).

Quadro 4 - Associação entre níveis de CTCs no momento 1o *follow-up* e variáveis clínicas sexo, mediana de idade, tipo histológico, estadio T agrupado, estadio N agrupado e número de sítios metastáticos

	Sexo	Mediana Idade	Tipo Histológico	T1 e 2 X T3 e 4	N0 e N1 X N2 e N3	Número de sítios Metastáticos
CTC2 (valor de p)	P=0,411	P=0,586	P=0,216	P=0,093	P=0,083	P=0,386

No momento CTC3 (2º *follow-up*), não houve associação estatisticamente significativa entre a contagem de CTCs e as variáveis clínicas sexo, mediana de idade, tipo histológico, estágio T e N agrupados e número de sítios metastáticos (Quadro 5)

Quadro 5 - Associação entre níveis de CTCs no momento 2o *follow-up* e variáveis clínicas sexo, mediana de idade, tipo histológico, estadio T agrupado, estadio N agrupado e número de sítios metastáticos

	Sexo	Mediana Idade	Tipo Histológico	T1 e 2 X T3 e 4	N0 e N1 X N2 e N3	Número de sítios Metastáticos
CTC3 (valor de p)	P=0,104	P=0,284	P=0,383	P=0,582	P=0,920	P=0,864

5.5 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA CONTAGEM DE CTCs E CORRELAÇÃO COM SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO

Nesse trabalho também foi avaliada variação das contagens de CTCs nos momentos inicial *versus* CTC2 e inicial *versus* CTC3 quanto a possível correlação com sobrevida livre de progressão.

Na avaliação CTC1 (*baseline*) *versus* CTC2 (primeiro *follow-up*), a sobrevida livre de progressão mediana foi de 8,48 meses (2,59 a 14,37 meses) para os pacientes cujos níveis de CTCs apresentaram queda ou mantiveram-se indetectáveis, *versus* 3,42 meses (0,82 a 6,01 meses) para os pacientes cujos níveis aumentaram. Essa diferença entre os grupos não atingiu significância estatística ($p=0,171$) e é ilustrada nas curvas da Figura 8.

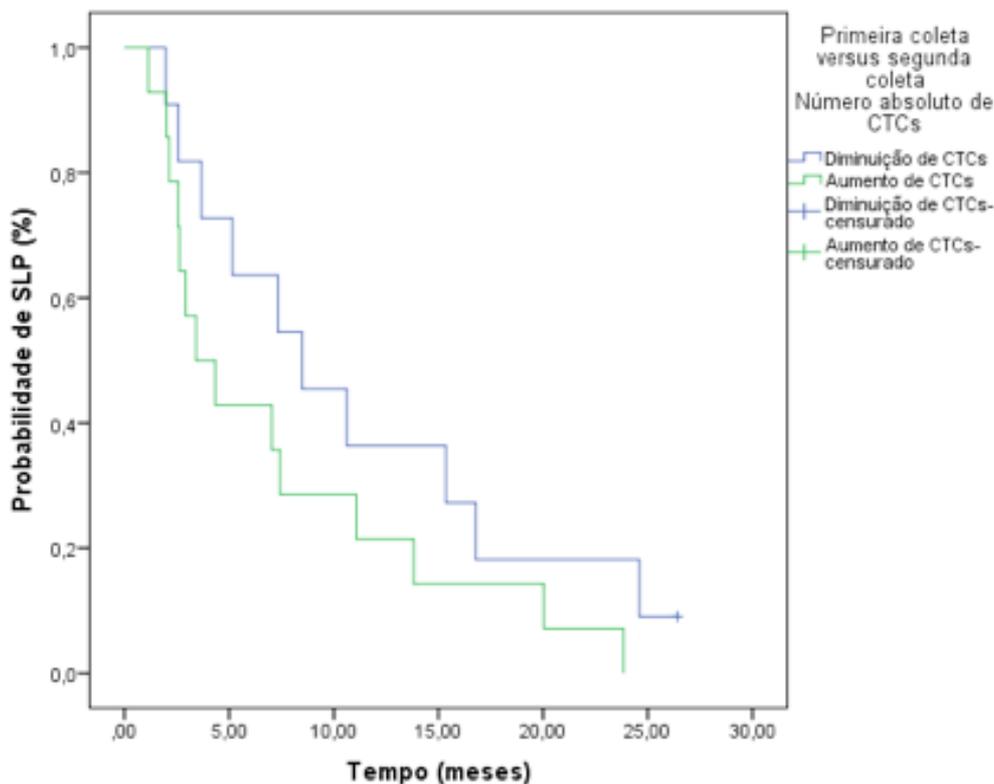


Figura 8- Sobrevida Livre Progressão segundo cinética das CTCs no momento CTC1 versus CTC2. A curva azul representa a curva de SLP dos pacientes que evoluíram com diminuição dos níveis de CTCs, ou que mantiveram-se indetectáveis e a curva verde, dos pacientes com aumento de CTCs

Quando se comparou CTC1 (*baseline*) versus CTC3 (segundo *follow-up*), a sobrevida livre de progressão mediana dos pacientes com níveis decrescentes de CTCs ou sempre indetectável foi de 8,48 meses (4,61 a 12,35 meses) versus 3,42 meses (0 a 10,4 meses) dos pacientes com aumento dos níveis. Essa diferença não atingiu significância estatística ($p=0,649$) (Figura 9).

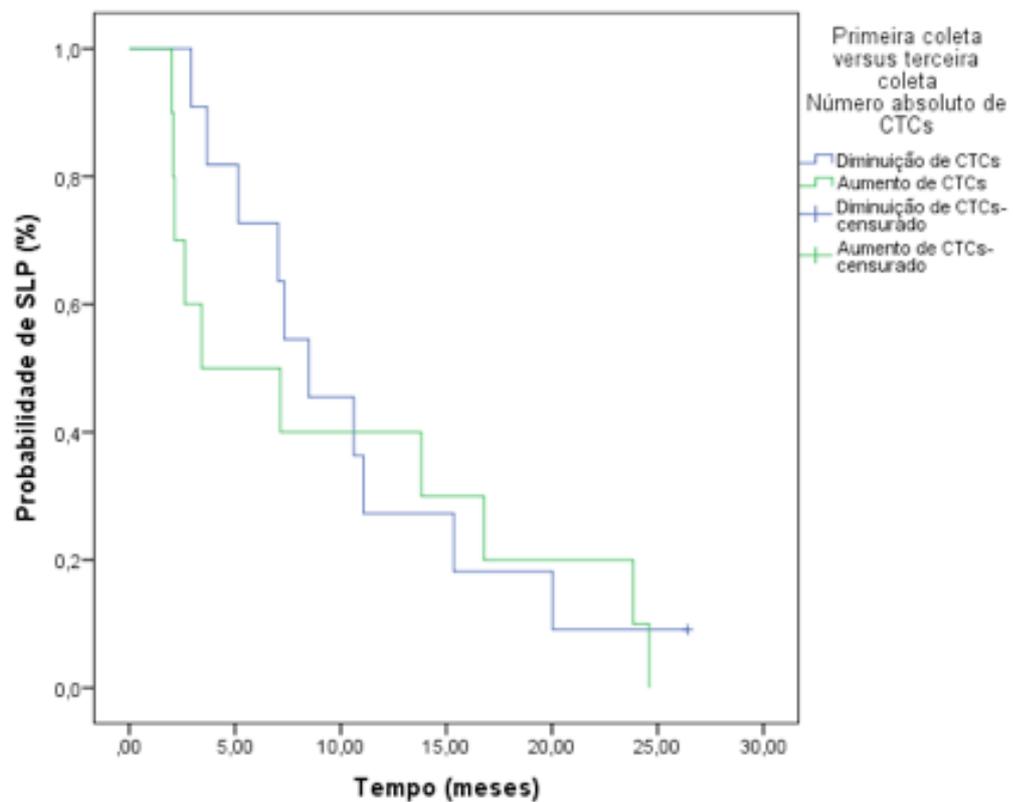


Figura 9- Sobrevida Livre de Progressão segundo cinética das CTCs no momento CTC1 versus CTC3. A curva azul representa a curva de SLP dos pacientes que evoluíram com diminuição dos níveis de CTCs, ou que mantiveram-se indetectáveis e a curva verde, dos pacientes com aumento de CTCs

5.6 AVALIAÇÃO DE CONTAGEM DE CTCs NOS MOMENTOS 1, 2 E 3 E CINÉTICA NOS MOMENTOS CTC1 *VERSUS* CTC2 E CTC1 *VERSUS* CTC3 NA SUBPOPULAÇÃO DE PACIENTES SUBMETIDOS A *DOUBLET* DE PLATINA

Aventou-se também a possibilidade de que uma avaliação com amostra mais homogênea de pacientes pudesse resultar em dados mais fidedignos, já que na população que foi objeto de estudo foram incluídos pacientes de primeira a quarta linha de tratamento. Para isso, foram analisados apenas os pacientes submetidos a esquemas de quimioterapia duplos, em que uma das drogas obrigatoriamente seria derivada de platina (cisplatina ou carboplatina) ou *doublet* de platina. Essa subpopulação continha 20 pacientes (Quadro 2).

Na comparação *baseline versus* CTC2, houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes cinéticas quanto a sobrevida livre de progressão ($p=0,047$). Pacientes que evoluíram com queda na contagem de CTCs ou que mantiveram-na indetectável, a sobrevida livre de progressão observada foi de 8,48 meses (0 a 19,61 meses), comparado com 3,42 meses (1,22 a 5,61 meses) dos pacientes que evoluíram com aumento. (Figura 10).

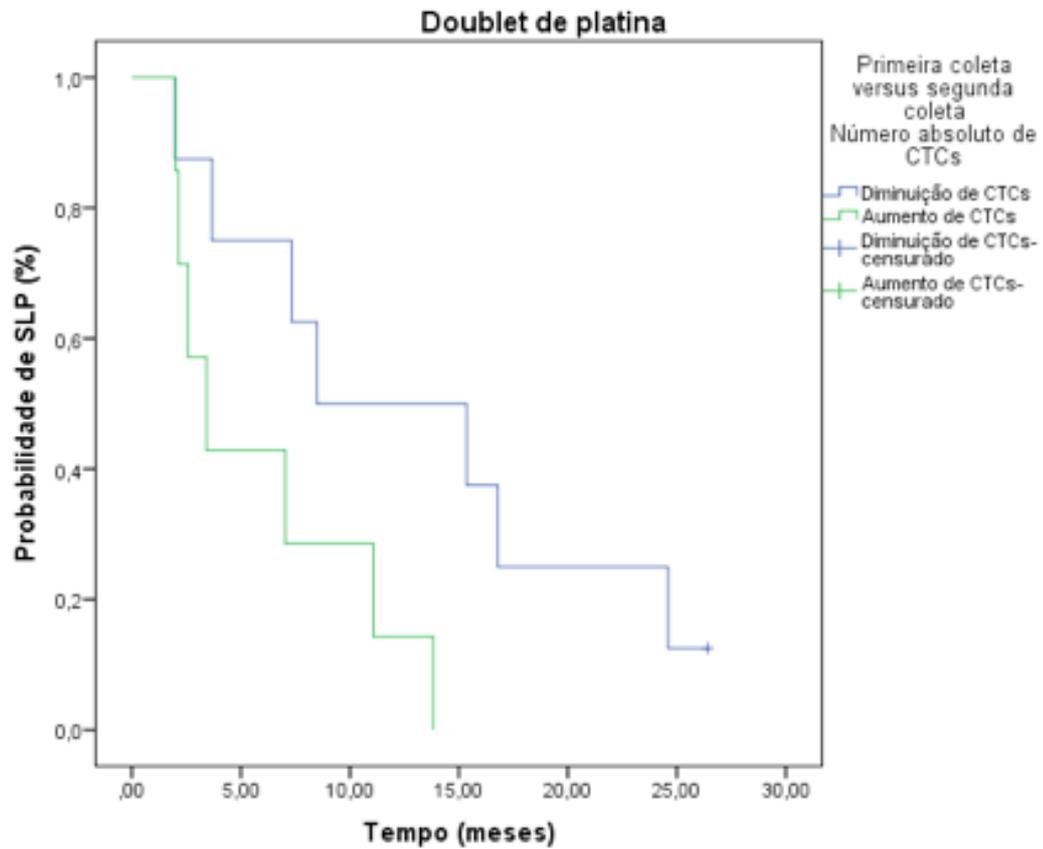


Figura 10 - Sobrevida Livre de progressão segundo cinética de CTCs nos momentos CTC1 versus CTC2 na subpopulação submetida a *doublet* de platina. A curva azul representa a SLP dos pacientes com queda ou cujos níveis de CTCs mantiveram-se indetectáveis. A curva verde representa SLP dos pacientes com aumento dos níveis de CTCs

Na comparação CTC1 *versus* CTC3 quanto a sobrevida livre de progressão, não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes cinéticas ($p=0,477$). A SLP foi de 8,48 meses (5,53 a 11,49 meses) para os pacientes com queda dos níveis ou sempre indetectável *versus* 3,42 meses (0 a 10,35 meses) para aqueles com aumento (Figura 11).

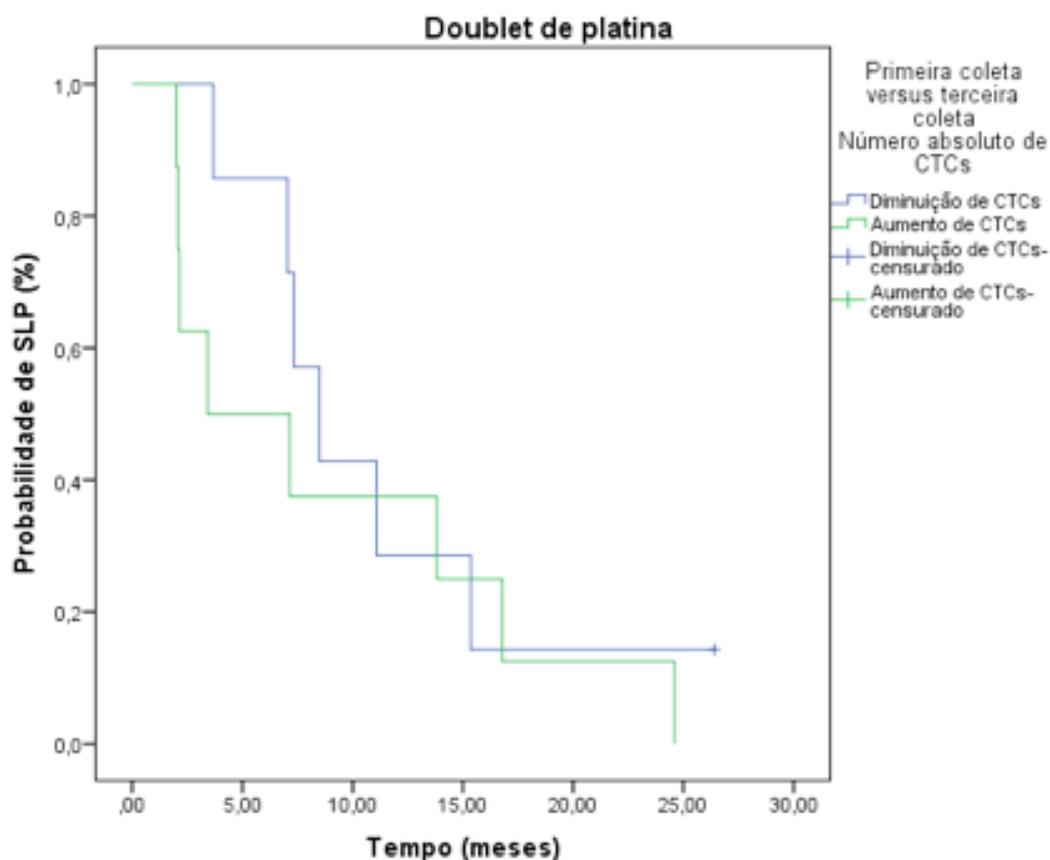


Figura 11 - Sobrevida Livre de progressão segundo cinética de CTCs nos momentos CTC1 *versus* CTC3 na subpopulação submetida a *doublet* de platina. A curva azul representa a SLP dos pacientes com queda ou cujos níveis de CTCs mantiveram-se indetectáveis. A curva verde representa SLP dos pacientes com aumento dos níveis de CTCs

5.7 CORRELAÇÃO DE CONTAGEM DE CTCs COM AVALIAÇÃO DE RESPOSTA RADIOLÓGICA

Foram avaliadas as contagens de CTCs nos momentos 2 e 3 com avaliação de resposta radiológica conforme critérios RECIST 1.1. As datas de coletas de CTCs em cada momento, data da realização das imagens nos momentos *baseline* (imagem 1), cerca de 8 semanas após imagem 1 (imagem 2) e 16 semanas após *baseline* (imagem 3), bem como primeira avaliação de resposta (resposta 1) e segunda avaliação de resposta (resposta 2) de cada paciente estão dispostas no Quadro 6. A avaliação de resposta radiológica, conforme critérios de RECIST 1.1 poderiam ser doença estável (DE), progressão de doença (DP), resposta parcial (RP) ou resposta completa (RC).

O teste estatístico realizado foi de Mann-Whitney. Não houve relação estatisticamente significativa entre níveis de CTC2 e resposta 1 ($p=0,179$), nem dos níveis de CTC3 e resposta 2 ($p=0,635$)

Quadro 6 - Coleta de CTCs nos momentos 1, 2 e 3 e avaliação de resposta radiológica de cada paciente

	Data CTC1	CTC1 (CTCs/ 8mL)	Data CTC2	CTC2 (CTCs/8mL)	Data CTC3	CTC3 (CTCs/8mL)	Imagem 1	Imagem 2	Imagem 3	Resposta 1	Resposta 2
C1	06/03/2013	0	17/04/2013	0	19/06/2013	55	01/02/2013	02/05/2013	04/07/2013	DE	DE
C2	27/06/2013	0	29/08/2013	45			09/05/2013	26/08/2013		DE	
C3	29/08/2013	3	28/10/2013	5			31/07/2013	15/10/2013	08/01/2014	DE	DP
C4	20/03/2013	0	21/05/2013	15	22/07/2013	38	13/02/2013	01/05/2013	10/06/2013	DE	DP
C5	10/07/2013	150	09/09/2013	25			17/06/2013	26/09/2013		DP	
C6	18/02/2013	0	01/04/2013	4	17/06/2013	0	15/02/2013	16/04/2013	03/09/2013	DE	DE
C7	06/06/2013	150	01/08/2013	24	30/09/2013	63	26/02/2013	20/08/2013	01/02/2014	DE	DP
C8	06/09/2012	214	24/10/2012	14	06/12/2012	5	24/08/2012	24/10/2012	24/01/2013	DE	DE
C9	08/10/2012	28				180	19/09/2012	31/10/2012		DE	
C10	28/02/2013	24	03/04/2013	0			01/02/2013	29/04/2013		DP	
C11	29/04/2013	15	26/06/2013	45	28/08/2013	88	24/04/2013	10/07/2013	12/09/2013	DE	DE
C12	05/09/2012	3	30/10/2012	110	05/12/2012	5	05/09/2012	09/11/2012		DP	
C13	21/05/2013	10					25/04/2013	19/09/2013		DE	
C14	20/03/2013	21	29/04/2013	51	24/06/2013	0	01/03/2013	17/06/2013		DP	
C15	06/07/2012	96					20/06/2012	04/08/2012		DE	
C16	21/08/2013	15	30/12/2013	68			28/06/2013	14/10/2013		DE	
C17	18/02/2013	0	01/04/2013	20	24/06/2013	0	21/11/2013	23/04/2013	24/06/2013	DE	DE
C18	09/08/2012	35	27/09/2012	13			16/08/2012				
C19	01/06/2013	106	29/07/2013	45	27/09/2013	83	16/06/2013	03/09/2013	05/11/2013	DE	DE
C20	17/10/2012	15	28/11/2012	20	24/01/2013	13	15/09/2012	05/01/2013		DP	
C21	05/09/2013	7					30/08/2013		17/12/2013		RP
C22	22/08/2012	20	24/10/2012	11	12/12/2012	17	10/07/2012	17/10/2012	19/12/2012	DE	DE
C23	03/04/2013	44	28/05/2013	0	26/07/2013	3	27/03/2013	02/07/2013	17/09/2013	RP	DE
C24	06/06/2013	10	12/08/2013	18	11/10/2013	20	06/05/2013	20/08/2013	18/09/2013	RP	RC
C25	16/08/2012	0	24/10/2012	0	06/12/2012	54	20/04/2012	11/10/2012	07/06/2013	DE	DE
C26	10/05/2013	33	04/07/2013	58	27/08/2013	13	19/04/2013	27/07/2013	22/10/2013	DE	DE
C27	07/03/2013	15	10/04/2013	5	07/06/2013	0	28/02/2013	28/05/2013	27/06/2013	DE	DP
C28	04/03/2013	96	17/04/2013	55	10/06/2013	38	19/02/2013	04/06/2013	10/09/2013	DE	DE
C29	02/05/2013	0	02/07/2013	25	31/08/2013	40	18/04/2013	02/07/2013	25/09/2013	DP	DP
C30	22/03/2013	15	27/05/2013	3	22/07/2013	0	27/02/2013	22/05/2013	23/07/2013	DE	RC
C31	17/12/2012	15	18/01/2013	164			26/10/2012	21/01/2013		DP	
C32	16/08/2012	150					23/07/2012	21/10/2012		DP	

DE= doença estável, DP= progressão de doença, RP= resposta parcial,RC= resposta completa

5.8 IMPACTO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS NA SOBREVIDA LIVRE E PROGRESSÃO E SOBREVIDA GLOBAL

Foi avaliado o impacto das variáveis clínicas sexo, mediana de idade, tipo histológico, estágio T (T1 e 2 *versus* T3 e 4) e N (N0 e 1 *versus* N2 e 3) na sobrevida livre de progressão e sobrevida global.

A SLP e SG conforme sexo, idade, estágio T e estágio N estão discriminados na Tabela 2 abaixo, sem significância estatística:

Quadro 7- Sobrevida Livre de Progressão e Sobrevida Global conforme variáveis clínicas sexo, mediana de idade e estadios agrupados T e N

	SEXO	MEDIANA IDADE	ESTADIO T AGRUPADO	ESTADIO N AGRUPADO
SLP (Valor de p)	Masculino	<65 anos	T1 e T2	N0 e N1
	5,92m	7,13m	5,16m	5,92m
	Feminino	≥65 anos	T3 e T4	N2 e N3
	3,68m (0,744)	3,68m (0,422)	5,92m (0,442)	4,34m (0,563)
SG (Valor de p)	Masculino	<65 anos	T1 e T2	N0 e N1
	não atingido	não atingido	30,95m	não atingido
	Feminino	≥65anos	T3 e T4	N2 e N3
	16,31m (0,62)	11,94m (0,142)	13,12m (0,688)	13,12m (0,534)

Quanto a variável tipo histológico, houve diferença estatisticamente significativa tanto em SLP quanto SG, conforme pode ser observado nas Figuras 12 e 13.

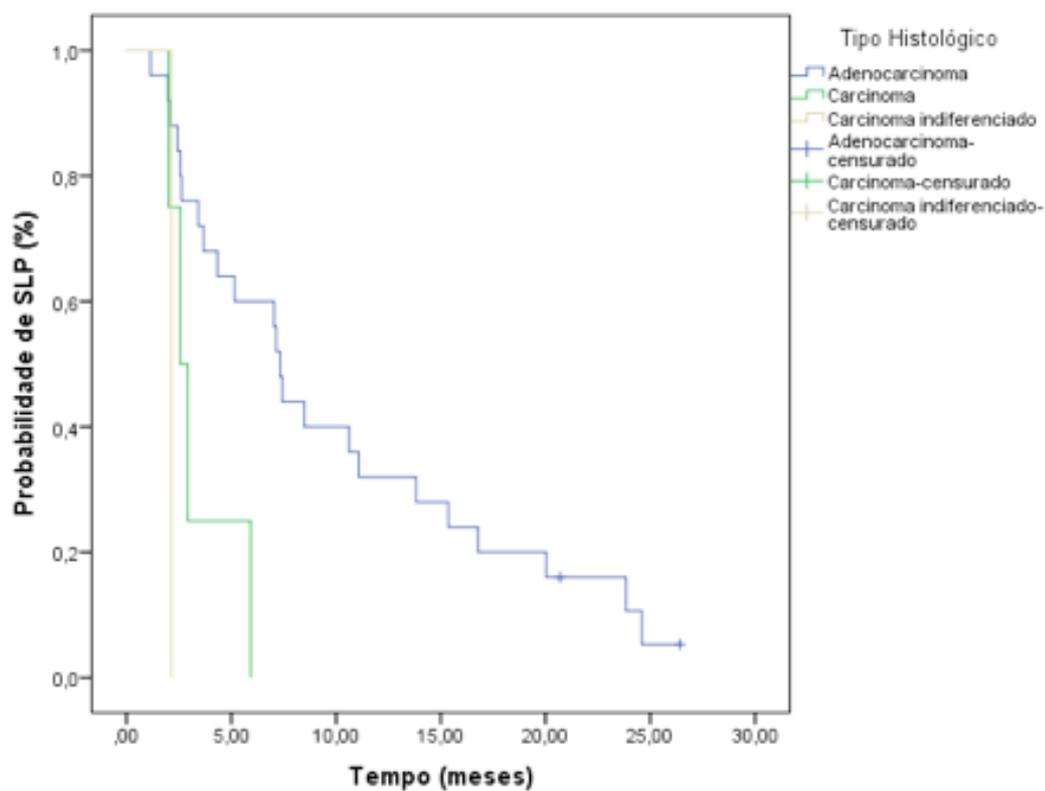


Figura 12 – Sobrevida Livre de Progressão segundo tipo histológico. A curva azul representa a curva de SLP dos pacientes com adenocarcinoma, a curva verde representa os pacientes com carcinoma espinocelular e a amarela, pacientes com carcinoma indiferenciado

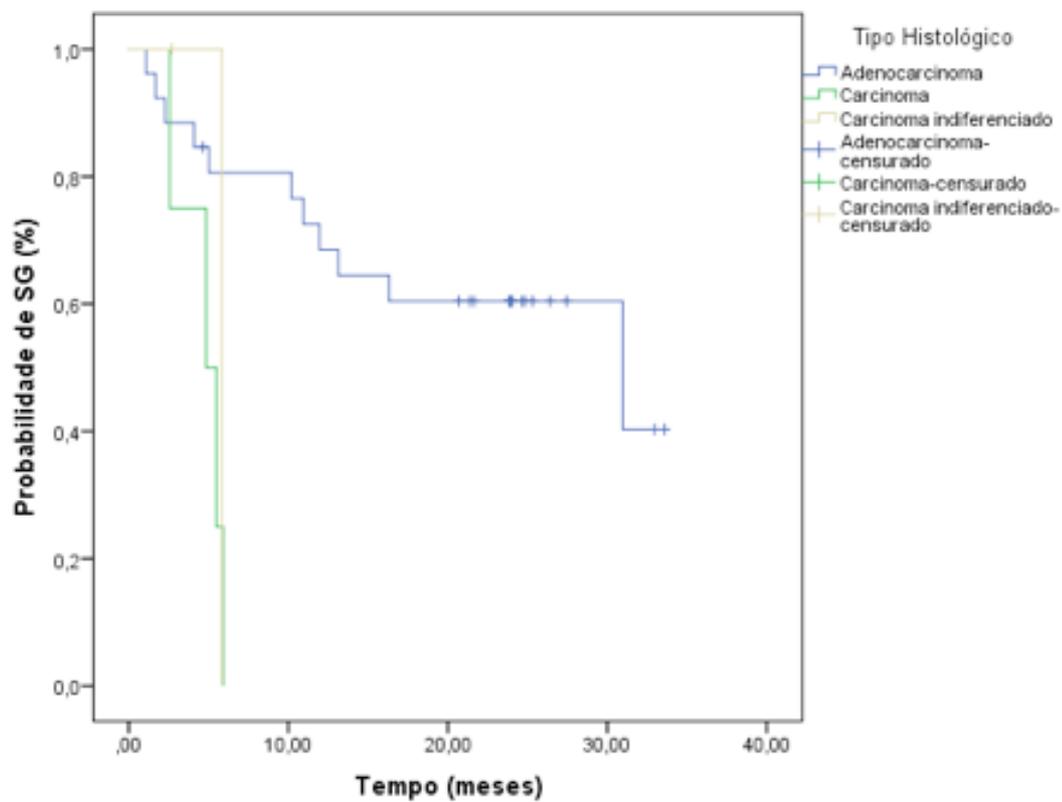


Figura 13 – Sobrevida Global segundo tipo histológico. A curva azul representa a curva de SG dos pacientes com adenocarcinoma, a curva verde representa os pacientes com carcinoma espinocelular e a amarela, pacientes com carcinoma indiferenciado

6 DISCUSSÃO

Câncer de pulmão não pequenas células é a neoplasia maligna mais comum no mundo, com incidência crescente nos últimos anos (JEMAL et al. 2010) e com a maior parte dos casos sendo diagnosticada em fase metastática (ETTINGER et al. 2012). A descoberta de novas drogas direcionadas para esse contexto recentemente alterou a curva de sobrevida global, de cerca de 8 meses (SCHILLER et al. 2002) a 12 meses (SANDLER et al. 2006) para cerca de 30 meses (MAEMONDO et al. 2010; ROSELL et al. 2012). As possibilidades de tratamento sistêmico da doença avançada atualmente abrangem quimioterapia convencional e terapia alvo (anticorpos monoclonais, inibidores de tirosino-quinase anti- EGFR e ALK e imunoterapias) (BRAHMER et al. 2015). Dentre os esquemas de quimioterapia convencional, existem os tratamentos duplos com platinas e taxanos ou antimetabólitos como pemetrexede e gencitabina, ou alcalóides da vinca, ou ainda, droga isolada com anti-metabólitos, taxanos ou alcalóides da vinca.

As terapias alvo para câncer de pulmão não pequenas células avançado evoluíram rapidamente na última década. Partiu-se dos estudos clínicos randomizados com bevacizumabe, anticorpo monoclonal anti- VEGF (SANDLER et al. 2006; RECK et al. 2009; CRINÒ et al. 2010), passando pela descoberta das drivers mutations e desenvolvimento de drogas inibidoras de tirosino-quinase anti-EGFR (*epidermal growth factor receptor*)

de primeira geração como gefitinibe e erlotinibe (MAEMONDO et al. 2010; ROSELL 2012), segunda geração como afatinibe (SEQUIST et al. 2013) e terceira geração como AZD9291 (JANNE et al. 2015; SEQUIST et al. 2015). Foram também introduzidas no arsenal contra o CPNPC os anti-ALK (anaplastic lymphoma kinase), anti-rearranjo ROS1 de primeira geração (SOLOMON et al. 2014; SHAW et al. 2014b) e segunda geração (SHAW et al. 2014a; GADGEEL et al. 2014). Na área da imunoterapia, resultados surpreendentes também têm sido observados com os checkpoint *inhibitors* anti-PD1 e anti-PDL1 (*programmed cell death-1* e *programmed cell death ligand-1*) principalmente pela possibilidade de resposta clínica a longo prazo (BRAHMER et al. 2012, 2015).

Infelizmente, até o momento, o avanço que se vê no campo do tratamento não é o mesmo que se vê no campo de desenvolvimento de biomarcadores, principalmente no que diz respeito à avaliação de resposta aos atuais tratamentos disponíveis. Desde a validação dos critérios de RECIST 1.1 em 2009 EISENHAUER et al. nada surgiu como melhor estratégia para avaliação de eficácia ao tratamento a que o paciente vem sendo submetido para CPNPC metastático. A conduta clínica padronizada ainda é aguardar pelo menos 8 semanas para que os exames de imagem evidenciem se está havendo ou não resposta clínica. Se não estiver havendo resposta, 8 semanas podem ser suficientes para rápida deterioração clínica, o que impossibilita tratamento com drogas subsequentes, das quais o paciente poderia beneficiar-se.

A necessidade de novos biomarcadores é urgente para melhor condução do tratamento pelo clínico. Neste sentido, o aparecimento de estudos com células tumorais circulantes (CTCs) no sangue periférico se mostraram bastante interessantes, por se tratar de técnica pouco invasiva, se mostrando promissora inclusive como forma de rastreamento para detecção de CPNPC em pacientes portadores de DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica). Recentemente, ILIE et al. (2014) avaliaram 245 pacientes com diagnóstico de DPOC, sendo 68,6% da amostra constituída por população controle tabagista e 31,4% por controle não tabagista. Foram coletadas amostras de sangue para coleta de CTCs pelo método ISET (Rarecells, France) e os pacientes portadores de DPOC foram submetidos também a tomografia computadorizada de tórax de baixa dosagem anual. Houve detecção de CTCs em 3% dos pacientes portadores de DPOC e em 100% desses, surgiram nódulo suspeito em CT de baixa dose, com follow-up mediano de 3,2 anos. Tais pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico, o qual revelou tratar-se de CPNPC em estágio precoce (IA).

Em doença avançada de mama, cólon e próstata, a detecção de CTCs mostrou correlação com prognóstico e resposta ao tratamento (BUDD et al. 2006; DE BONO et al. 2008; KREBS et al. 2011; MA et al. 2012; PARKINSON et al. 2012). A maioria dos estudos iniciais utilizou a técnica de CellSearch™ System (Johnson & Johnson), método imunomagnético, baseado na expressão de marcadores epiteliais. No entanto, estudos posteriores com técnica de ISET, método de filtração (o qual separa CTCs baseado no tamanho das células) se mostraram superiores ao *CellSearch*

em termos de melhor isolamento de CTCs. Isto se deu porque o ISET não exclui células que não expressam EpCAM e citoqueratinas (FARACE et al. 2011; HOFMAN et al. 2011b; KREBS et al. 2012), como as células que estão em transição epitélio-mesênquima (BARRIERE et al. 2012). Em nosso trabalho utilizamos o método ISET.

Voltando aos cânceres de mama, cólon e próstata metastáticos, a presença de CTCs identificou subgrupo de pacientes com maior risco de progressão de doença e pior sobrevida global, o que levou a aprovação do uso de coleta de CTCs para acompanhamento desses pacientes durante o tratamento sistêmico pelo FDA. Diferentemente para CPNPC metastático, os dados são mais escassos. KREBS et al. (2011) avaliaram presença de CTCs em 101 pacientes com CPNPC estadios III e IV antes da administração do primeiro ciclo de quimioterapia primeira linha. Pacientes que apresentaram contagem de CTCs abaixo de 5 CTCs/7,5 mL de sangue evoluíram com maior sobrevida livre de progressão (6,8 x 2,4 meses; $P < 0,001$) e global (8,1 x 4,3 meses; $p < 0,001$) comparados aos pacientes com níveis iguais ou acima desse ponto de corte. PUNNOOSE et al (2012) avaliaram presença de CTCs em 41 pacientes com CPNPC metastáticos que seriam submetidos a segunda ou terceira linha de tratamento sistêmico com pertuzumabe e erlotinibe. A presença de CTCs abaixo ou acima do ponto de corte de 5 CTCs/7,5 mL não esteve relacionada a sobrevida livre de progressão, mas níveis superiores a 5CTCs/7,5 mL estiveram relacionados a resposta radiológica conforme critérios de RECIST ($p=0,009$). MUINELO-ROMAY et al (2013) também avaliaram

presença de CTCs antes do início da quimioterapia de primeira linha de 43 pacientes com CPNPC e encontraram diferença estatisticamente significativa em sobrevida livre de progressão (7,6 x 4,1 meses; $p=0,034$) e global (10,7 x 4,6 meses; $p=0,008$) entre pacientes que apresentavam contagem abaixo e acima de 5CTCs/7,5 mL. JUAN et al (2014) coletaram amostras de sangue de 37 pacientes com CPNPC avançado antes do início de quimioterapia com docetaxel e gemcitabina. Não houve diferença quanto a sobrevida livre de progressão (9,4 x 4,3 meses; $p=0,35$) e sobrevida global (12,2 x 8,1 meses; $p=0,76$) entre os pacientes que apresentaram níveis abaixo de 2 CTCs/7,5 mL e iguais ou acima deste. Como pode-se observar, o melhor ponto de corte para separação prognóstica em CPNPC ainda não foi estabelecido.

Em nosso trabalho, foram coletadas amostras de sangue de 32 pacientes com diagnóstico de CPNPC metastático que iriam iniciar tratamento sistêmico pela primeira vez ou iniciar nova linha de quimioterapia após progressão de doença. Dos 32, apenas 21 coletaram as três amostras previstas por intercorrência clínica na maior parte, ou recusa. Foi considerado ponto de corte a mediana de CTCs colhidas em cada momento. No momento CTC1 (*baseline*), não encontramos diferença estatisticamente significativa em termos de sobrevida global ($p=0,889$) ou sobrevida livre de progressão ($p=0,703$) entre os pacientes que apresentavam contagem de CTCs igual ou superior à mediana, inclusive havendo contraditoriamente aparente maior sobrevida global para aqueles pacientes com níveis iguais ou superiores à mediana (30,95 meses) *versus* aqueles cuja contagem foi inferior à mediana (16,31 meses).

Poucos são os estudos que avaliaram detecção de CTCs ao longo de um determinado tratamento sistêmico, para avaliar resposta radiológica e desfecho clínico. Na publicação de MUINELO-ROMAY et al. (2013), houve diferença estatisticamente significativa em sobrevida livre de progressão (8,5 x 4,2 meses; $p=0,016$) antes do segundo ciclo de quimioterapia entre os pacientes que apresentavam queda de CTCs para menos que 2 CTCs/mL comparados para aqueles que mantinham níveis acima disso. Pacientes cujas contagens de CTCs se mantinham iguais ou superiores ao início após primeiro ciclo de quimioterapia apresentaram maiores taxas de progressão radiológica comparados aos pacientes cujas contagens diminuíram após primeiro ciclo. Em nossa avaliação, quando esses pacientes foram avaliados no segundo momento, (CTC2), após cerca de 8 semanas de tratamento, observamos nítida separação das curvas de sobrevida livre de progressão e global entre aqueles pacientes que apresentaram contagens de CTCs inferiores a mediana versus iguais ou acima dela (Figuras 4 e 5), apesar de também não termos encontrado diferença estatística ($p=0,083$ e $p=0,45$, respectivamente). Quando esses pacientes foram submetidos a nova coleta após 16 semanas do tratamento (CTC3), tanto a SLP quanto a SG não diferiram entre aqueles com níveis iguais ou acima versus abaixo da mediana, com aparente nova contradição com SG numericamente superior (30,95 meses) naqueles com níveis iguais ou acima da mediana, comparado com níveis abaixo (16,31 meses). Essas aparentes contradições poderiam ser explicadas pela população extremamente heterogênea incluída, com pacientes de primeira a quarta linha de tratamento sistêmico, cuja evolução

é sabidamente diferente. Por exemplo, em primeira linha de tratamento, existem estudos cuja SG atinge 12 a 19,3 meses (SANDLER et al. 2006, ROSELL et al. 2012) e SLP atinge 6,2 a 9,7 meses, ao passo que em segunda linha, a SG pode chegar ao patamar de 8,3 meses e a SLP, 2,9 meses (HANNA et al, 2004).

Além de avaliar o *cutoff* (mediana) de cada momento, analisamos também a cinética das CTCs, ou seja, variação dos níveis ao longo do tratamento. Houve uma tendência a maior SLP entre os pacientes que evoluíram com queda nos níveis de CTCs ou mantiveram-se indetectáveis, comparados aos pacientes com aumento desses níveis. Essa tendência foi observada tanto na cinética dos momentos CTC1 x CTC2 (8,48 meses X 3,42 meses; $p=0,171$) quanto CTC1 X CTC3 (8,48 meses x 3,42 meses; $p=0,649$). Quando essa mesma análise foi feita separando-se apenas o subgrupo submetido a *doublet* de platina, na tentativa de haver maior homogeneidade da amostra, atingiu-se a significância estatística. A SLP foi maior entre os pacientes com queda nas CTCs ou que mantiveram-se indetectáveis *versus* aumento nas CTCs ($p=0,047$) na cinética CTC1 x CTC2. Apesar de não estatisticamente significativa, a mesma tendência se manteve na cinética CTC1 x CTC3 na subpopulação submetida a *doublet* de platina (8,48 x 3,42 meses; $p=0,477$).

Quanto ao impacto das variáveis clínicas na SLP e SG, encontramos significância estatística para ambas as sobrevidas apenas para tipo histológico. Os pacientes com adenocarcinoma de pulmão apresentaram melhor desfecho em sobrevida comparado às demais histologias.

Em estudo realizado por PUNNOOSE et al. (2012) foram realizadas coletas de CTCs antes do início do tratamento e nos dias 14, 28 e 56 após o início deste. As avaliações de resposta foram feitas com PET-CT nos dias 14, 28 e 56 e CT do dia 56 após início do tratamento. Os pacientes que tiveram resposta parcial ou completa pelo PET-CT apresentaram maior queda de CTCs em relação ao início ($p=0,014$), assim como os pacientes com resposta parcial na CT no dia 56 ($p=0,019$). Em nosso estudo, não foi observada relação entre os níveis de CTCs nos momentos 2 ($p=0,179$) e 3 ($p=0,635$) com resposta radiológica.

Quanto à correlação entre CTCs e variáveis clínicas, MUINELO-ROMAY et al. (2013) encontraram maior positividade para CTCs na contagem inicial entre os pacientes N3 comparado com pacientes N0, N1 ou N2 (58,3% x 22,2%; $p=0,029$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre número de sítios de metástases (0 ou 1 versus 2 ou mais) e positividade para CTCs (22,2% x 58,3%; $p=0,12$). KREBS et al. (2011) também observaram maiores níveis de CTCs ≥ 2 CTCs/7,5 mL entre os pacientes com estágio mais avançado (IV) comparado com pacientes estádios IIIA e IIIB ($p=0,04$). Em nosso trabalho, não observamos relação entre mediana de idade e níveis de CTCs acima ou abaixo da mediana nos momentos *baseline*, primeiro *follow-up* e segundo *follow-up*. Essa associação também não foi observada para estágio T (T1 e 2 versus T3 e 4) e níveis de CTCs nos três momentos.

7 CONCLUSÃO

Concluindo, CTCs são detectáveis em alta porcentagem dos pacientes com CPNPC metastáticos.

Os níveis de CTCs abaixo da mediana apresentaram uma tendência a melhor SLP e SG, especialmente após 8 semanas do tratamento. Além das contagens isoladas em cada momento, pudemos observar que a cinética ao longo do tratamento foi um indício de melhor ou pior evolução clínica. Pacientes que diminuíram os níveis de CTCs ou mantiveram CTCs indetectáveis durante o tratamento apresentaram uma tendência a maior SLP, tanto após 8 semanas quanto 16 semanas do início do tratamento.

Neste trabalho, os níveis de CTCs não se correlacionaram com resposta radiológica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barriere G, Tartary M, Rigaud M, et al. Epithelial mesenchymal transition: a new insight into the detection of circulating tumor cells. **ISRN Oncol** 2012; 2012:382010

Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. **Breast Cancer Res** 2011; 13:228-38.

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. **N Engl J Med** 2012; 366:2455-65.

Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med** 2015; 373:123-35.

Brambilla E, Travis WD. Lung cancer. In: Stewart BW, Wild CP, editors. **World Cancer Report**. Lyon: World Health Organization: 2014.

Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al: Circulating tumor cells versus imaging: Predicting overall survival in metastatic breast cancer. **Clin Cancer Res** 2006; 12:6403-9.

Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. **Science** 2011; 331:1559-64.

Chinen LTD, de Carvalho FM, Rocha BM, et al. Cytokeratin-based CTC counting unrelated to clinical follow up. **J Thorac Dis** 2013; 5:593-99.

Coello MC, Luketich JD, Litle VR, Godfrey TE. Prognostic significance of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. **Clin Lung Cancer** 2004; 5:214-5.

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.

Crinò L, Dansin E, Garrido P, et al. Safety and efficacy of first-line bevacizumab-based therapy in advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (SAiL, MO19390): a phase 4 study. **Lancet Oncol** 2010; 11:733-40.

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

Danila DC, Heller G, Gignac GA, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2007; 13:7053-8.

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

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts JE, et al. New response criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1). **Eur J Cancer** 2009; 45:228-47.

Ettinger DS, Akerley W, Borghaei AC, et al. Non-small cell lung cancer. **J Natl Compr Cancer Netw** 2012; 10:1236-71.

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

[FDA] Foods and Drugs Administration. **The cellsearch™epithelial cell kit**. 2004. <URL:http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf3/k031588.pdf> [2015 jan 12]

Fraumeni JF, Wertelecki W, Blattner WA, Jensen RD, Leventhal BG. Varied manifestations of a familial lymphoproliferative disorder. **Am J Med** 1975; 59:145-51.

Gadgeel SM, Gandhi L, Riely GJ, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. **Lancet Oncol** 2014; 15:1119-28.

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.

Groen HJM, Sietsma H, Vincent A, et al. Randomized, placebo-controlled phase III study of docetaxel plus carboplatin with celecoxib and cyclooxygenase-2 expression as a biomarker for patients with advanced non-small-cell lung cancer: the NVALT-4 study. **J Clin Oncol** 2011; 29:4320-6.

Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. **J Clin Oncol** 2004; 22:1589-97.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

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.

Hochster HS, Hart LL, Ramanathan RK, et al. Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the TREE Study. **J Clin Oncol** 2008; 26:3523-29.

Hofman V, Ilie MI, Long E, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. **Int J Cancer** 2011a; 129:1651-60.

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** 2011b; 17:827-35.

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al. **SEER cancer statistics review: 1975-2009.** 2011. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/> [2015 jan 12]

Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, et al. "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **PLoS One** 2014; 9:e111597.

Janne PA, Yang JC, Kim DW, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2015; 372:1689-99.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:277-300.

Juan O, Vidal J, Gisbert R, Muñoz J, Maciá S, Gómez-Codina J. Prognostic significance of circulating tumor cells in advanced non-small cell lung cancer patients treated with docetaxel and gemcitabine. **Clin Transl Oncol** 2014; 16:637-43.

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.

Langer CJ, Socinski MA, Patel JD, Sandler AB, Schiller JH, Leon L, Hazard SJ, Ramalingam SS. Isolating the role of bevacizumab in elderly patients with previously untreated nonsquamous non-small cell lung cancer: secondary analyses of the ECOG 4599 and PointBreak Trials. **Am J Clin Oncol** 2015 Jan 24

Li Y-M, Xu S-C, 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.

Lianidou ES, Mavroudis D, Pantel K. Advances in circulating tumor cell (ATCC): from basic research to clinical practice. **Breast Cancer Res** 2013; 15:319-21.

Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. **Lancet Oncol** 2013; 14:1262-3.

Ma XL, Xiao ZL, Liu L, Liu XX, Nie W, Li P, Chen NY, Wei YQ. Meta-analysis of circulating tumor cells as a prognostic marker in lung cancer. **Asian Pac J Cancer Prev** 2012; 13:1137-44.

Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with mutated EGFR. **N Engl J Med** 2010; 362:2380-8.

Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. **N Engl J Med** 2008; 359:366-77.

Marrinucci D, Bethel K, Luttgen M, et al. Circulating tumor cells from well-differentiated lung adenocarcinoma retain cytomorphologic of primary tumor type. **Arch Pathol Lab Med** 2009; 133:1468-71.

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

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Muinelo-Romay L, Vieito M, Abalo A, et al. Evaluation of circulating tumor cells and related events as prognostic factors and surrogate biomarkers in advanced nsclc patients receiving first-line systemic treatment. **Cancers (Basel)** 2014; 6:153-65.

Muller V, Riethdorf S, Rack B, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System™ and Adna Test Breast™ in metastatic breast cancer patients: the DETECT study. **Breast Cancer Res** 2012; 14:R118.

Omenn GS, Merchant J, Boatman E, et al. Contribution of environmental fibers to respiratory cancer. **Environ Health Perspect** 1986; 70:51-6.

Pailler E, Adam J, Barthélémy A, et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2013; 31:2273-81.

Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:760-74.

Parkinson DR, Dracapoli N, Petty BG, et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. **J Transl Med** 2012; 10:138.

Patchmann K. Longtime recirculating tumor cells in breast cancer patients. **Clin Cancer Res** 2005; 11:5657-8.

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

Paterlini-Bréchot P. Circulating Tumor Cells: Who is the Killer? **Cancer Microenviron** 2014; 7:161-76.

Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. **Clin Cancer Res** 2012; 18:2391-401.

Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, et al. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. **J Clin Oncol** 2009; 27:1227-34.

Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the cell search system. **Clin Cancer Res** 2007; 13:920-8.

Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2012; 13:239-46.

Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel carboplatin alone or with bevacizumab for Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:2542-50.

Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2002; 346:92-8.

Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. **J Clin Oncol** 2013; 31:3327-34.

Sequist LV, Soria JC, Goldman JW, et al. Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2015; 372:1700-9.

Shaw AT, Kim DW, Mehra R, et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2014a; 370:1189-97.

Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2014b; 371:1963-71.

Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 2003; 120:1351-83.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. **CA Cancer J Clin** 2015; 65:5-29.

Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. **N Engl J Med** 2014; 371:2167-77.

Straif K. The burden of occupational cancer. **Occup Environ Med** 2008; 65:787-8.

Thorsteinsson M, Jess P. The clinical significance of circulating tumor cells in non-metastatic colorectal cancer- a review. **Eur J Surg Oncol** 2011; 37:459-65.

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

Woodcock TM, Blumenreich MS, Richman SP, et al. Combination chemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum and vinblastine in advanced non-small cell lung cancer. **J Clin Oncol** 1983; 1:247-50.

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



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 11 de dezembro de 2013.

A
Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen.

Aluna: Milena Shizue Tariki (Mestrado).

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

“Detecção de células tumorais circulantes em câncer de pulmão não pequenas células metastático e sua correlação com 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 10/12/2013, **tomaram conhecimento** dos 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 da aluna *Milena Shizue Tariki*.
- Projeto de Mestrado, datado de 14 de Novembro de 2013.

Atenciosamente,

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