

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPITELIAL (EGFR) EM CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES DE PACIENTES COM SARCOMAS

ALEXCIA CAMILA BRAUN

**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. Celso Abdon de Lopes
Mello**

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Braun, Alexcia Camila

Deteccção de células tumorais circulantes em pacientes com sarcomas / Alexcia Camila Braun – São Paulo, 2017.
47p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores: 1. Sarcoma/Sarcoma. 2. Neoplasias de Tecidos Moles/Soft Tissue Neoplasms. 3. Células Neoplásicas Circulantes/Neoplastic Cells, Circulating.

“Eu sou uma daquelas que pensam que a ciência tem uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: ele também é uma criança colocada diante de fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas”.

Marie Curie

“Quando os ventos de mudança sopram, umas pessoas levantam barreiras, outras constroem moinhos de vento”.

Érico Veríssimo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Lídia Braun e Rodrigo Petry pela confiança depositada e por todo apoio e incentivo na busca dos meus sonhos.

A minha irmã Gabriela Petry, por ser a razão para que eu queira dar o melhor de mim a cada dia.

*Não há forma justa de retribuir tudo o que vocês sempre me deram e
significam para mim.*

Dedico a vocês a concretização desse sonho!

AGRADECIMENTOS

À todos os antigos, atuais e futuros pacientes oncológicos que acreditam na ciência, obrigada pela chance de aprendizado e realização desse estudo - essa pesquisa é por vocês.

À minha orientadora Dra. Ludmilla Chinen, exemplo de dedicação e mulher cientista, meu mais sincero obrigada pela oportunidade de aprendizado. Agradeço imensamente pela formação profissional que me proporcionou e por todo o meu crescimento ao longo desses dois anos.

Ao meu co-orientador Dr. Celso Mello, agradeço imensamente as oportunidades de conversas e pela disponibilidade e estímulo nas minhas buscas.

Às minhas colegas de laboratório Emne, Vanessa, Marcilei, Ana Cláudia, Mônica, Bianca, Camila e Graziela, obrigada pelos debates, pela ajuda nos momentos necessários, pelos cafés, chocolates e coleguismo.

Aos colegas da Oncologia Clínica, em especial, Dr. Marcelo Corassa e Dr. Virgílio Sousa.

Ao Dr. Marcello Fanelli e Dra. Patrizia Paterlini-Brechót pelas imensas contribuições para a concretização desta pesquisa.

Aos demais colegas do A.C.Camargo Cancer Center e do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino.

À equipe da Pós-graduação e Biblioteca pelo suporte o qual necessitei.

Aos meus pais e irmã, por estarem sempre ao meu lado apoiando todas minhas escolhas e decisões.

À minha família e amigos que mesmo longe vibram com minhas conquistas e realizações.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa pesquisa.

Muito obrigada!

RESUMO

Braun AC. **Análise da expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) em células tumorais circulantes de pacientes com sarcomas.** São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A presença de Células Tumorais Circulantes (CTCs) e/ou Microêmbolos Tumorais Circulantes (MTCs) no sangue de pacientes com sarcoma pode ser um marcador precoce de invasão tumoral, pois sabe-se que as CTCs circulam no sangue durante meses ou anos antes do desenvolvimento de metástases. Além das CTCs e CTMs, o EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*), também pode contribuir com a invasão de células malignas, pois desencadeia a proliferação celular, migração e motilidade. Quando superexpresso, o EGFR é geralmente relacionado a pior prognóstico, doença avançada e baixa taxa de sobrevivência dos pacientes. **Objetivos:** Isolar e quantificar CTCs, além de identificar a expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) associado com invasão e resistência à quimioterapia nestas células. **Metodologia:** Estudo prospectivo, realizado por meio da coleta de sangue total de pacientes com diferentes tipos de sarcomas. Os pacientes foram submetidos a uma coleta de sangue total (8ml). As amostras de sangue foram processadas e filtradas no sistema ISET (*Rarecells, France*) para o isolamento e quantificação das CTCs. Posteriormente, foi realizada imunocitoquímica (ICQ) dupla marcação para avaliação protéica. Foram avaliadas as proteínas EGFR e CD45. **Resultados:** Foram analisados 18 pacientes com idade média de 49 anos (18-77). O número mediano de CTCs foi de 2,0 CTCs/mL (0-11 CTCs / mL), 27,7% dos pacientes tiveram CTMs detectados na circulação e em 83,3% foi observada a expressão da proteína EGFR. A Sobrevida Livre de Progressão (SLP) em pacientes EGFR positivo em comparação com EGFR negativo em CTCs foi 2.2 meses x NA (não alcançado) ($p = 0.117$) A SLP de pacientes

de primeira linha com EGFR + nas CTCs foi 2.2 meses *versus* NA ($p = 0.156$). **Conclusão:** Este é o primeiro estudo a demonstrar a expressão da proteína EGFR em CTCs de pacientes com sarcomas. Embora não tenhamos encontrado significância estatística nos resultados, nossos achados abrem novas possibilidades para uma pesquisa futura. O próximo passo é caracterizar as CTCs em uma coorte maior de pacientes para entender melhor o papel do EGFR na promoção de metástases tumorais em sarcoma.

SUMMARY

Braun AC. **[Analysis of epithelial growth factor receptor (EGFR) expression in circulating tumor cells of patients with sarcomas]**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The presence of Circulating Tumor Cells (CTCs) and/or Circulating Tumor Microemboli (CTM) in the blood of patients with sarcoma may be an early marker of tumor invasion, because it is known that the CTCs circulate in the blood for months or years before the development of metastases. In addition to CTCs and CTMs, EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) may also contribute to the invasion of malignant cells, as it triggers cell proliferation, migration and motility. When overexpressed, EGFR is usually related to poor prognosis, advanced disease, and poor patient survival. **Objectives:** to isolate and quantify CTCs, in addition to identify the expression of epithelial growth factor receptor (EGFR) associated with invasion and resistance to chemotherapy in these cells. **Methodology:** This was a prospective study, to be carried out by collection of whole blood from patients with different types of sarcomas. The patients had approximately 8mL of blood collected. The blood samples were processed and filtered on ISET system for the isolation and quantification of CTCs. Later, we performed immunocytochemistry (ICQ) double staining for protein assessment. EGFR and CD45 proteins were evaluated. **Results:** we analyzed 18 patients with median age of 49 years (18-77). The median CTCs number was 2.0 CTCs/mL (0-11 CTCs/mL) and CTM were found in 27.7% of patients. The positivity for EGFR in CTCs was observed in 83.3% of the patients. Progression-free survival (PFS) of positive EGFR staining compared to negative EGFR in CTCs was 2.2 months x NR (not reached) ($p = 0.117$). The PFS of first line patients with EGFR + CTCs was 2.2 months versus NR, for EGFR- CTCs ($p = 0.156$). **Conclusions:** this is the first study to demonstrate the expression of EGFR protein in CTCs from sarcoma. Although we did not find statistical significance in our results,

our findings should open up an area for future research. The next step is to characterize CTCs in a larger cohort of patients to better understand the role of EGFR in promoting tumor metastasis in sarcoma.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CSV	<i>Cell-Surface Vimentin</i>
CTC	Células Tumorais Circulantes
EGFR	<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ICQ	Imunocitoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISET	<i>Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells</i>
LMS	Leiomiossarcomas
LP	Lipossarcomas
MMP2	<i>Matrix Metalloproteinase-2</i>
MTC	Microêmbolos Tumorais Circulantes
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RMS	Rabdomiossarcomas
SG	Sobrevida Global
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
SO	Sarcomas Ósseos
SPI	Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados
SPM	Sarcomas de Partes Moles
SS	Sarcomas Sinoviais
TEM	Transição Epitélio-Mesênquima
TGFβRI	<i>Transforming Growth Factor-β Receptor Type 1</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Sarcomas	1
1.2	Células Tumorais Circulantes.....	6
1.3	Transição Epitélio-Mesênquima	7
1.4	Microêmbolos Tumorais Circulantes	8
1.5	Células Tumorais Circulantes e Sarcomas.....	9
1.6	Receptor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR).....	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Primário	14
2.2	Objetivos Secundários	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Critérios Gerais de Inclusão	15
3.2	Critérios Gerais de Exclusão	16
3.3	Isolamento e Purificação de CTCs	16
3.4	Imunocitoquímica nas Membranas ISET	16
4	ARTIGO SUBMETIDO	19
5	CONCLUSÃO	37
6	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38

ANEXO

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

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1 INTRODUÇÃO

1.1 SARCOMAS

Os sarcomas possuem diferentes padrões morfológicos da linhagem mesenquimal e compõem um grupo heterogêneo de mais de 70 neoplasias primárias malignas (JO e DOYLE 2016; DANCOSOK et al. 2017).

São capazes de diferenciar-se a partir de diversos tipos celulares, como tecido conjuntivo, cartilaginoso, ósseo, sistemas sanguíneo e linfático (DUCIMETIERE et al. 2011). Além disso, são raros e potencialmente fatais, representando um desafio diagnóstico e terapêutico, uma vez que apresentam um padrão de crescimento expansivo, recidiva local e metástases (FLETCHER et al. 2002; NAKAYAMA et al. 2007).

São classificados em sarcomas de partes moles (SPM) e sarcomas ósseos (SO) e juntos representam cerca de 1% de todas neoplasias em adultos e 15% em crianças, possuindo uma maior frequência na fase adulta. Em pacientes diagnosticados com estágio avançado, considera-se uma sobrevida global (SG) de 20-25% em dois anos (JEMAL et al. 2010; DEMETRI et al. 2010; HOWLADER et al. 2014). Em 2008, os SPM compreenderam 87% dos sarcomas diagnosticados enquanto os SO compreenderam 13% (HOWLADER et al. 2014).

Devido à sua raridade e dificuldade de diagnóstico, o acúmulo de um número suficiente de casos para análise estatística é inevitavelmente

prejudicado; por este motivo os dados sobre a incidência dos sarcomas não são divulgados no Brasil. Nos EUA estimou-se a ocorrência de 2.600 novos casos de SO e 10.500 novos casos de SPM no ano de 2011 (DEMETRI et al. 2010; DEMICCO e LAZAR 2011).

Foram estimados 12.310 novos casos de SPM nos EUA com cerca 4.990 mortes no ano de 2016 (HOWLADER et al. 2014). De acordo com dados epidemiológicos coletados entre 1973 e 2008, a incidência de STS é mais frequente em afro-americanos, seguidos por caucasianos e asiáticos (BURNINGHAM et al. 2012). A razão para as disparidades nas incidências raciais ainda não é clara. No Canadá, representam 1% de todas as mortes relacionadas ao câncer e cerca de 19-21% das mortes relacionadas ao câncer em crianças e adolescentes (DANCSOK et al. 2017).

Alguns SPM localizam-se nas extremidades, seguidos em ordem de frequência pela cavidade abdominal, retroperitônio, parede do tronco e cabeça e pescoço (LATORRE e FRANCO 1999). Abrangem desde tumores localmente invasivos até altamente agressivos e sua progressão é rápida e torna-se letal na maioria dos casos. Grande parte dos pacientes morre em decorrência da doença, principalmente por metástase pulmonar (LEHNHARDT et al. 2009), apresentando uma sobrevida estimada de cinco anos em torno de 50% dos casos (CLARK et al. 2005).

No grupo dos SPM estão inclusos os leiomiossarcomas (LMS), sarcomas pleomórficos indiferenciados (SPI) e sinoviais (SS), lipossarcomas (LP) e rabdomiossarcomas (RMS). O primeiro é uma neoplasia que representa de 10% a 15% dos sarcomas de partes moles (YANG et al. 2009)

e sua disseminação ocorre principalmente por via hematogênica (PENNACCHIOLI et al. 2012). São mais comuns em pacientes de meia-idade e idosos, sendo raramente observados em crianças. Os LMS podem desenvolver-se em qualquer parte do corpo, assim como em tecidos viscerais (próstata, bexiga urinária e útero) (GUILLOU e AURIAS 2010). A maioria desses tumores é detectada na região da cavidade abdominal, retroperitônio e mediastino (50% a 65%), sendo que estes estão associados a um pior prognóstico e a uma sobrevida reduzida (70% a 90% dos pacientes) (MIETTINEN e FERSCH 2006). A localização dos LMS também tem sido associada ao comportamento clínico destes tumores. Os localizados na derme possuem um melhor prognóstico quando comparados aos localizados em regiões mais profundas, os quais apresentam maior taxa de mortalidade associada ao aumento de metástases (YANG et al. 2009; GUILLOU e AURIAS 2010).

Os sarcomas pleomórficos indiferenciados (SPI) são tumores raros que possuem grande heterogeneidade histológica e seu comportamento clínico é agressivo, tendo desenvolvimento frequente de metástases e recidivas locais (FLETCHER 2006). É prevalente na sexta e sétima décadas de vida e afeta homens e mulheres. Os sítios anatômicos mais acometidos são as extremidades inferiores, superiores e o retroperitônio. São observadas metástases em 5% dos pacientes no momento do diagnóstico (NASCIMENTO e RAUT 2008). Os pacientes com este tumor apresentam uma sobrevida estimada de cinco anos em aproximadamente 50 a 60% dos casos (FLETCHER et al. 2002). Além disso, o aumento do tumor está

associado com menor intervalo livre de metástase, diminuindo significativamente a sobrevida do paciente.

Os sarcomas sinoviais (SS) são tumores raros e compreendem cerca de 5 a 10% dos sarcomas de partes moles. São mais comuns em extremidades, embora possam originar-se em qualquer parte do corpo. Acometem principalmente jovens e apresentam-se como uma massa dolorosa de crescimento lento próxima a uma grande articulação (WEISS e GOLDBUM 2001).

Em contrapartida, o lipossarcoma (LP) é um dos tumores malignos de partes moles mais comuns na vida adulta e é derivado dos adipócitos. Acomete igualmente ambos os sexos por volta da quarta década de vida. Seu crescimento é lento e torna-se sintomático quando assume grandes dimensões (MASE et al. 2002).

O rabdomiossarcoma (RMS) é um subtipo histológico com origem na musculatura esquelética e é o tipo mais comum de SPM em crianças, representando cerca de 50% destes tumores (ANDERSON et al. 1990). Em adultos, sua incidência é inferior a 10% de todos SPM (CALLANDER et al. 1991). A região da cabeça e pescoço possui a maior quantidade de subsítios tumorais de rabdomiossarcoma, incluindo a órbita, os sítos parameníngeos (nasofaringe, cavidade nasal, seios paranasais, osso temporal, fossa pterigopalatina e fossa infratemporal) e os sítos não-parameníngeos. Os tumores que invadem a órbita são os que possuem o melhor prognóstico (WURM et al. 2005).

Em média, mais de 50% dos pacientes com sarcoma de alto grau apresentam recaída tumoral sistêmica e recidiva à distância é a principal causa de morte (Sarcoma Meta-Analysis Collaboration [SMAC] 1997). Atualmente, o controle local feito com cirurgia e radioterapia garante baixas taxas de recidiva local e mortalidade desta recidiva.

EDGE et al. (2010), demonstraram que pacientes com tumores de alto grau apresentam uma melhor resposta inicial a quimioterapia em relação aos pacientes com tumores de baixo grau histológico. A cirurgia associada a quimioterapia e/ou a radioterapia continua a ser a modalidade terapêutica mais utilizada em SPM (GANJOO e JACOBS 2010; NIELSEN e WEST 2010).

Como controle local a radioterapia é utilizada, reduzindo assim a recorrência local. A quimioterapia é utilizada no controle sistêmico dos SPM e inclui o tratamento paliativo em tumores avançados, redução do tamanho para facilitar a ressecção do tumor primário e metástases pulmonares. Além disso, a quimioterapia também é utilizada como tratamento adjuvante ou neoadjuvante em tumores de alto grau (AGUIAR JUNIOR et al. 2009; ERIKSSON 2010).

Durante décadas, a doxorrubicina isolada ou em combinação com ifosfamida, foi utilizada como tratamento em sarcomas avançados de tecidos moles (STS), apresentando melhores taxas de resposta global (completa ou parcial) em casos de doença metastática (20% a 30%). No entanto, o tratamento quimioterápico traz benefícios limitados e geralmente não

melhora o tempo de progressão tumoral ou a sobrevida dos pacientes (VERWEIJ e BAKER 2010; JUDSON et al. 2014).

1.2 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

O estudo das células tumorais circulantes (CTCs) pode resultar em melhor entendimento da biologia da doença e ser uma ferramenta na pesquisa de novos alvos terapêuticos para o tratamento do câncer. A presença de CTCs pode ser um marcador precoce de invasão tumoral. Além disso, sabe-se que estas células circulam no sangue por meses ou anos antes do desenvolvimento de metástases (PATERLINI-BRECHOT e BENALI 2007; KLEIN 2009; RHIM et al. 2012) e assim, podem ajudar a identificar pacientes no estágio intermediário entre a doença localizada e a metastática, que no momento não são identificados, nem tratados ou tratados de forma não personalizada.

ASHWORTH (1869) realizou o primeiro registro sobre essas células enquanto realizava uma necropsia, ele notou que na veia safena de um paciente haviam células parecidas com as encontradas em um tumor na parede anterior do seu tórax e abdômen. Somente em 2004, nos Estados Unidos, um estudo publicado por CRISTOFANILLI et al. (2004) demonstrou uma metodologia capaz de detectar CTCs, e por meio deste estudo foi demonstrado que estas células de fato aparecem somente em pacientes com câncer.

Dez anos após a primeira demonstração de uma metodologia capaz de detectar CTCs, o sistema utilizado por CRISTOFANILLI et al. (2004) e diversos outros grupos pelo mundo começou a ser questionado (RAIMONDI et al. 2014; BEIJE et al. 2015). A metodologia *CellSearch*® que se destina à enumeração de CTCs de origem epitelial (CD45-, EpCam + e Citoqueratinas 8 18+ e / ou 19+) e é a única aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Contudo, vem sendo contestada pelo fato de liberar diversos resultados falsos positivos e negativos, pois falha em sua seleção negativa de células brancas do sangue, que muitas vezes não expressam CD45 e por não detectar células tumorais em transição epitélio-mesênquima (TEM) (RAIMONDI et al. 2014; BEIJE et al. 2015).

1.3 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA

A TEM é um processo pelo o qual as CTCs podem passar para invadir na corrente sanguínea. Este fenômeno ocorre através do desenvolvimento de fenótipo mesenquimal em substituição ao fenótipo epitelial, para que haja locomoção e diferenciação celular (KSIAZKIEWICZ et al. 2012). A perda dos marcadores epiteliais e a aquisição de características de células mesenquimais permite que as células tumorais aumentem sua mobilidade e sua capacidade de invasão para aderir e desenvolver metástases em sítios distantes (THIERY 2002; STEEG 2003). As células que passam pela transição epitélio-mesênquima possuem uma expressão baixa ou nula de EpCAM, uma glicoproteína transmembrana que

está envolvida na sinalização células, migração, proliferação e diferenciação que é expressa exclusivamente em epitélios e neoplasias de origem epitelial, o que faz com que muitas sejam perdidas em metodologias baseadas em capturas por marcadores epiteliais. Além disso, muitas dessas metodologias não são capazes de capturar os microêmbolos tumorais circulantes (MTCs) (KÖNIGSBERG et al. 2011; GORGES et al. 2012).

1.4 MICROÊMBOLOS TUMORAIS CIRCULANTES (MTC)

O escape das CTCs pode ocorrer por sua habilidade de formar grupos de micro tumores ou microêmbolos tumorais circulantes (MTCs), que atingem locais distantes dos de origem. Já foi demonstrado que a formação de MTCs de 5-10 CTCs ocultas escapa do sistema imune, promovendo recrutamento de fatores pró-angiogênicos a partir do microambiente local e expressão de novos marcadores de superfície (MUKAI 2005).

Desta forma, os MTCs desempenham um papel importante na cascata metastática, uma vez que podem resistir à morte celular na circulação sanguínea, além de serem responsáveis por atingirem mais focos de micrometástases quando comparados com CTCs isoladas (CHEN et al. 2016).

Associando-se a estruturas como leucócitos, fibroblastos, células endoteliais ou plaquetas, os MTCs adicionam proteção contra agentes externos e outras células relacionadas ao sistema imunológico na circulação sanguínea, adquirindo assim, uma característica mais agressiva (KREBS et

al. 2014). Além disso, os MTCs fornecem uma vantagem de adesão célula-célula na corrente sanguínea e ativam a sinalização anti-apoptótica e proteção contra *anoikis* (HOU et al. 2012). *Anoikis* é uma forma de morte celular programada que ocorre em células dependentes de ancoragem. Quando as células separam-se da matriz extracelular, há uma perda de interações células-matriz normais, e elas podem sofrer *anoikis*. No entanto, as células tumorais metastáticas podem escapar da *anoikis* e invadir outros órgãos (FRISCH e SCREATON, 2001). Assim, os MTCs, por serem estruturas heterogêneas, além de possuírem interações e proteção contra agentes externos, podem proteger as células tumorais deste processo de *anoikis*.

Muitos estudos têm focado no papel dos MTCs, e alguns já foram publicados envolvendo diversos tumores, relacionando a presença de MTCs (câncer de cólon, próstata, rim e pulmão) com pior SLP (BRANDT et al. 1996; MOLNAR et al. 2001; KATS-UGURLU et al. 2009; HOU et al. 2012; KREBS et al. 2012).

1.5 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES E SARCOMAS

Apesar de evidências clínicas mostrando que CTCs podem estar presentes no sangue de pacientes com sarcoma, poucos estudos têm trabalhado com este tema. A maior parte dos trabalhos publicados detectou as CTCs provenientes desses tumores por Reação em Cadeia da

Polimerase (PCR) ou por métodos baseados em anticorpos de proteínas da superfície celular, incluindo a citometria de fluxo (CHANG et al. 2015).

Pensando na dificuldade de verificar a presença e relevância de quaisquer CTCs de origem mesenquimal ou em processo de Transição Epitélio-Mesênquima (TEM), SATELLI et al. (2017), estudaram recentemente a utilidade da Vimentina da Superfície Celular (CSV) como um marcador para detectar CTCs de sarcoma, mama, câncer de cólon e próstata (SATELLI et al. 2017), demonstrando assim, que em comparação com o *CellSearch* o método baseado na expressão de CSV apresentou maior sensibilidade e especificidade. Contudo, apesar de estabelecerem um primeiro marcador de CTCs universal e específico para sarcomas, várias linhagens celulares de controle utilizadas não foram imunorreativas para esse marcador, incluindo HUVEC, HFOB e PBMC (SATELLI et al. 2014), o que limita seu uso.

GALLEGO et al. (2006) utilizaram a quantificação relativa do RNAm tumoral presente em uma série de amostras de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) de 16 pacientes com rabdomiossarcoma e demonstraram através de RT-PCR, que a detecção da doença circulante e micro metastática produz resultados altamente reprodutíveis e que pacientes com positividade nas amostras de SP após o tratamento mostram uma sobrevida mais baixa do que os pacientes sem doença microcirculatória.

Outros pesquisadores utilizaram metodologias baseadas em (RT) – PCR (*Reverse Transcription*-PCR) para detectar CTCs no sangue periférico e/ou medula óssea de pacientes com sarcomas, aproveitando as

translocações de genes específicos detectados em Sarcoma de Ewing, sarcoma alveolar e de expressões genéticas associadas aos sarcomas (PETER et al. 1995; KELLY et al. 1996; GATTENLOEHNER et al. 1999; THOMSON et al. 1999; SCHLEIERMACHER et al. 2003; AVIGAD et al. 2004; GALLEGO et al. 2006; HOSHINO et al. 2009; DUBOIS et al. 2010). Apesar de todos eles apresentarem resultados relevantes envolvendo CTCs e sarcomas, as abordagens possuem várias limitações envolvendo a sensibilidade e especificidade dos métodos, além de não permitirem a caracterização morfológica das CTCs e nem o estudo de expressão protéica e potencial de invasão.

Nossa equipe demonstrou o uso de uma tecnologia independente de marcação para identificação de CTCs provenientes de pacientes com sarcoma metastático ou localmente avançado (CHINEN et al. 2014). O sangue dos pacientes estudados foi filtrado no sistema ISET, que utiliza método de filtração direta sem o uso de anticorpos, explorando assim, o tamanho das células tumorais, que é maior em comparação aos leucócitos. A filtração foi realizada através de uma membrana de polycarbonato com poros cilíndricos de 8 μm de diâmetro, que isola as CTCs das demais células.

Por meio desse estudo (CHINEN et al. 2014), nosso grupo demonstrou que todos os pacientes incluídos apresentaram CTCs, e os níveis variaram de 2 a 48 CTCs em 8 mL de sangue. Nosso grupo foi o primeiro a demonstrar que o ISET (*Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells; Rarecells*, França), uma tecnologia desenvolvida inicialmente para

detectar CTCs de pacientes com carcinomas, e baseada em filtração, é capaz de detectar CTCs no sangue de pacientes com sarcoma.

A detecção primária de CTCs e de marcadores presentes nestas células pode ajudar a identificar pacientes em necessidade de terapias sistêmicas adicionais para prevenir a recaída metastática e até mesmo a identificar novos alvos terapêuticos.

1.6 RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPITELIAL (EGFR)

Além das CTCs, outros fatores também podem influenciar no aparecimento de tumores e metástases, como os receptores da família EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*), que desencadeiam a proliferação celular, migração, motilidade e invasão de células malignas. O EGFR é superexpresso em muitos tumores e geralmente está relacionado a pior prognóstico, doença avançada e baixa taxa de sobrevivência dos pacientes (ADJEI e ROWINSKY 2003; HYNES e LANE 2005).

Em situações normais, o EGFR encontra-se expresso em vários tipos de tecidos durante o desenvolvimento do organismo e existem estudos que revelam que esta família de genes é crucial para o desenvolvimento embrionário (SIBILIA et al. 2007).

A família de receptores ErbB compreende 4 receptores transmembrana distintos: o EGFR (também conhecido como ErbB1 / HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). Estes receptores são

amplamente expressos em tecidos humanos e animais, notadamente em células de origem epitelial (SCHECHTER et al. 1984).

Os membros da família ErbB são muitas vezes amplificados ou mutados em muitas formas de câncer, tornando-os importantes alvos terapêuticos (SERRANO et al. 2017). Muitas neoplasias, particularmente carcinomas, apresentam expressão anormal, aumentada ou constitucional desta proteína (NICHOLSON et al. 2001). Em muitos casos, a ativação anômala do EGFR, mediada por alterações gênicas ou por estimulação autócrina, parece ser um fator importante na carcinogênese, bem como uma alteração essencial para o comportamento mais agressivo da neoplasia (SALOMON et al. 1995).

NICHOLSON et al. (2001) demonstraram o valor prognóstico deste marcador para diversos tumores, como cabeça e pescoço, esôfago, colo de útero e bexiga, em uma metanálise com 200 estudos. Em 70% dos trabalhos, o aumento da expressão de EGFR foi associado a menores sobrevidas global e livre de doença. Por outro lado, em tumores gástricos, mamários, endometriais e colorretais, o EGFR apresentou valor prognóstico moderado e relacionou-se com menor sobrevida em 52% dos estudos (NICHOLSON et al. 2001).

Em câncer de pulmão (incluindo adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas), o EGFR encontrou-se expresso em 63% dos casos, mais frequentemente em carcinomas de células escamosas, associado a mau prognóstico (ISAKSSON et al. 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Detectar células tumorais circulantes e microembolos tumorais circulantes no sangue periférico de pacientes com sarcomas classificados como alto grau com intuito de isolar e quantificar essas células.

2.1 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- ✓ Identificar a expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) nas CTCs e CTMs;
- ✓ Avaliar se existe correlação ou associação dos números de CTCs e da frequência de expressão da proteína EGFR com resistência à quimioterapia com a sobrevida livre de progressão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto “Detecção de Células Tumorais Circulantes em Pacientes com Sarcoma” foi submetido ao CEP desta instituição e aprovado (nº 2081/15). Foi um estudo prospectivo realizado por meio da coleta de sangue total de pacientes com sarcoma. Participaram da pesquisa apenas os indivíduos que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todo o procedimento de identificação foi realizado por códigos, preservando a confidencialidade do paciente.

Foram coletados aproximadamente 8mL de sangue de cada paciente (para contagem e filtração no equipamento ISET), além disso, utilizamos como controle negativo o sangue de indivíduos saudáveis e como controle positivo, este mesmo sangue acrescido de células tumorais mantidas em cultura.

3.1 CRITÉRIOS GERAIS DE INCLUSÃO

Foram incluídos nesse estudo os pacientes que preencheram os seguintes critérios:

- Idade igual ou superior a 18 anos;
- Que apresentaram sarcomas dos tipos: leiomiossarcoma, sarcoma pleomórfico, sarcoma sinovial, lipossarcoma e rabdomiossarcoma.
- Extensão da doença determinada por exame físico e por imagem;

- Doença mensurável pelos critérios RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*).

3.2 CRITÉRIOS GERAIS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos desse estudo pacientes que apresentaram as seguintes características:

- Pacientes que realizaram terapia prévia nas últimas três semanas;
- Pacientes com história prévia de outros tumores nos últimos dois anos.

3.3 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE CTCS

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de EDTA (8 mL) e foram processadas dentro de 4 horas. O sangue foi diluído 1:10 em tampão de lise de eritrócitos e filtrado no sistema ISET. Após a filtragem, as membranas foram lavadas com PBS, secas à temperatura ambiente, protegidas da luz e estocadas a -20°C até o momento da análise.

3.4 IMUNOCITOQUÍMICA NAS MEMBRANAS DE ISET

Para a realização da imunocitoquímica e para análise de expressão proteica, os *spots* das membranas foram cortados e colocados em placas de 24 poços. Cada *spot* foi hidratado com *Tris Buffered Saline* (TBS) por 20

minutos. As células foram permeabilizadas com TBS 0.2% Triton X-100 por 5 min à temperatura ambiente. Após uma nova lavagem com TBS, as membranas foram incubadas por 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, com uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio, e lavadas novamente com TBS. Em seguida o primeiro anticorpo primário (EGFR) a ser pesquisado foi aplicado aos *spots* e incubado por uma hora. Para o controle negativo, o anticorpo primário foi omitido. A revelação foi feita com *Dual long system* HRP (Dako™) e pelo cromógeno Diaminobenzidina 3,3' (DAB) (Dako™). Após a utilização do DAB, realizamos uma incubação de uma hora com o segundo anticorpo primário (CD45), seguida por outra incubação de 20 minutos com o *Rabbit/Mouse* (LINK) (Kit Envision™ G/2 System/AP). Após lavagem com TBS, o *spot* foi incubado por 30 minutos com *AP Enzyme (Enhancer)*. O segundo anticorpo foi revelado por *Permanent Red*.

Para finalizar, o *spot* foi corado com hematoxilina. Com o anticorpo anti-CD45 foi realizada uma marcação nos leucócitos, excluindo a possibilidade de reação inespecífica e confirmando que as células marcadas pelo EGFR não são leucócitos. Para leitura, os *spots* foram corados com hematoxilina por 1 minuto, aderidos a lâmina com PBS e posteriormente estocados em temperatura entre -2°C e -8°C.

As CTCs e os CTMs foram caracterizados de acordo com os seguintes critérios: tamanho nuclear igual ou maior que 16µm, irregularidade do contorno nuclear, presença de citoplasma visível, alta proporção núcleo-citoplasma (> 0,8), de acordo com o descrito por KREBS et al. (2012).

Quando faltam qualquer um dos critérios descritos, as células são classificadas como atípicas. Os resultados são dados em número de CTCs por mL de sangue. As lâminas foram lidas em microscópio óptico *Research System Microscope BX61 – Olympus*, acoplado a uma câmera digital (SC100 – Olympus, Tóquio, Japão).

4 ARTIGO SUBMETIDO

Title: EGFR Expression in Circulating Tumor Cells from High-Grade Metastatic Sarcomas

Authors: Alexcia Camila Braun [1], Celso Abdon Lopes de Mello [2], Marcelo Corassa [2], Emne Ali Abdallah [1], Ana Cláudia Urvanegia [2], Vanessa Silva Alves [1], Bianca Troncarelli [1], Mônica Díaz [1], Ulisses Ribaldo Nicolau [2], Virgilio Souza e Silva [2], Vinicius Calsavara [1], Patrizia Paterlini-Brechót [3], Ludmilla Thomé Domingos Chinen [1].

Affiliation:

[1] International Research Center; A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP 01508 010, Brazil

[2] Department of Clinical Oncology, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP 01509 010, Brazil

[3] Faculté de Médecine Paris Descartes, Paris, 75006, France.

Short title: EGFR in CTCs from Sarcoma Patients

Corresponding author: Ludmilla Thomé Domingos Chinen, International Research Center; A. C. Camargo Cancer Center; Rua Taguá, 440 – São Paulo, 01508 010; phone: +55 (0)11 2189 2993; e-mail: ludmilla.chinen@cipe.accamargo.org.br

Article category: Research article

Conflict of interest: The authors have declared no conflicts of interest.

ABSTRACT

Introduction: Soft tissue Sarcomas (STS) are rare malignances, with high mortality rates. Half of patients develop metastasis. The presence of isolated Circulating Tumor Cells (CTCs) and Circulating Tumor Microemboli (CTM) in the blood may be early markers of tumor invasion. EGF family receptors can also influence this process. Objectives: to quantify CTCs and identify CTM as well as the EGFR protein expression in these cells and correlate with clinical outcome in metastatic STS. **Materials and methods:** Approximately 8mL of blood was prospectively collected from patients with different types of high grade STS, before the beginning of chemotherapy. The samples were processed and filtered by ISET (Rarecells, France) for the isolation and quantification of CTCs and CTMs. EGFR expression was analysed by immunocytochemistry (ICC) on CTCs/ CTMs. **Results:** we analyzed 18 patients with median age of 49 years (18-77). The median CTCs number was 2.0 CTCs/mL (0-11 CTCs/mL) and CTM were found in 27.7% of patients. The positivity for EGFR in CTCs was observed in 83.3% of the patients. Progression-free survival (PFS) of positive EGFR staining compared to negative EGFR in CTCs was 2.2 months x NR (not reached) ($p = 0.117$). The PFS of first line patients with EGFR + CTCs was 2.2 months versus NR, for EGFR- CTCs ($p = 0.156$). **Conclusions:** this is the first study to demonstrate the expression of EGFR protein in CTCs from sarcoma patients. Although our findings had not reach statistical significance, they could open an area for future investigation. The next step is to characterize CTCs in a larger cohort of patients to better understand the role of EGFR in promoting tumor metastasis in sarcoma.

Keywords: soft-tissue-sarcomas, circulating tumor cells, EGFR, circulating tumor microemboli.

5 CONCLUSÃO

Com a presente pesquisa, pudemos demonstrar que as CTCs e os MTCs estão presentes na circulação de pacientes com diferentes tipos de sarcomas (leiomiossarcoma, lipossarcoma, sarcoma sinovial, sarcoma pleomórfico e rabdmiossarcoma).

A expressão da proteína EGFR em CTCs de pacientes com tumor de origem mesenquimal (Sarcomas) foi elevada. Nossos achados abrem novos caminhos para pesquisas futuras na área, além de melhor entendimento da biologia desses tumores. Mais estudos e aumento do número amostral são necessários.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adjei AA, Rowinsky EK. Novel anticancer agents in clinical development. **Cancer Biol Ther** 2003; 2:S5-15.

Aguiar Junior S, Ferreira Fde O, Rossi BM, Santos EM, Salvajoli JV, Lopes A. Neoadjuvant chemoradiation therapy for soft tissue sarcomas of the extremities. **Clinics (Sao Paulo)** 2009; 64:1059-64.

Anderson GJ, Tom LWC, Womer RB, et al. Rhabdomyosarcoma of the head and neck in children. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1990; 116:428-31.

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

Avigad S, Cohen IJ, Zilberstein J, et al. The predictive potential of molecular detection in the nonmetastatic Ewing family of tumors. **Cancer** 2004; 100:1053-8.

Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:2445-59.

Beck AH, Lee CH, Witten DM, et al. Discovery of molecular subtypes in leiomyosarcoma through integrative molecular profiling. **Oncogene** 2010 29:845-54.

Beije N, Jager A, Sleijfer S. Circulating tumor cell enumeration by the CellSearch system: the clinician's guide to breast cancer treatment? **Cancer Treat Rev** 2015; 41:144-50.

Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochim Biophys Acta** 2005; 1755:37-69.

Brandt B, Junker R, Griwatz C, et al. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood. **Cancer Res** 1996; 56:4556-61.

Burningham Z, Hashibe M, Spector L, Schiffman JD. The epidemiology of sarcoma. **Clin Sarcoma Res** 2012; 2:14.

Chang_L, Asatrian G, Dry SM, James AW. Circulating tumor cells in sarcomas: a brief review. **Med Oncol** 2015; 32:430.

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

Ganjoo K, Jacobs C. Antiangiogenesis agents in the treatment of soft tissue sarcomas. **Cancer** 2010; 116:1177-83.

Callander TA, Weber RS, Janjan N, et al. Rhabdomyosarcoma of nose and paranasal sinuses in adults and children. **Otolaryngol Head Neck Surg** 1991; 117:1185-8.

Chen JY, Tsai WS, Shao HJ, et al. Sensitive and specific biomimetic lipid coated microfluidics to isolate viable circulating tumor cells and microemboli for cancer detection. **PLoS One** 2016; 11:e0149633.

Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM. Soft-tissue sarcomas in adults. **N Engl J Med** 2005; 353:701-11.

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.

Dancsok AR, Asleh-Aburaya K, Nielsen TO. Advances in sarcoma diagnostics and treatment. **Oncotarget** 2017; 84:7068-93.

Demetri GD, Antonia S, Benjamin RS, et al. National comprehensive cancer network soft tissue sarcoma panel soft tissue sarcoma. **J Natl Compr Cancer Netw** 2010; 8:630-74.

Demicco EG, Lazar AJ. Clinicopathologic considerations: how can we fine tune our approach to sarcoma? **Semin Oncol** 2011; 38:S3-18.

Dubois SG, Epling CL, Teague J, Matthay KK, Sinclair E. Flow cytometric detection of Ewing sarcoma cells in peripheral blood and bone marrow. **Pediatr Blood Cancer** 2010; 54:13-18.

Ducimetiere F, Lurkin A, Ranchère-Vince D, et al. Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. **PLoS One** 2011; 6:e20294.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. **AJCC cancer staging manual**. 7^a ed. New York: Springer-Verlag, 2010. Soft tissue sarcoma; p.291-8.

Eriksson M. Histology-driven chemotherapy of soft-tissue sarcoma. **Ann Oncol** 2010; 21:270-6.

Fletcher CDM, van den Berg E, Molenaar W. Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma/Undifferentiated high grade pleomorphic sarcoma. In: Fletcher

CDM, Unni KK, Mertens F, editors. **Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone**. Lyon: IARC Press; 2002. p.120-2. (IARC WHO Classification of Tumours).

Fletcher CDM. The evolving classification of soft tissue tumours: an update based on the new WHO classification. **Histopathology** 2006; 48:3-12.

Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. **Curr Opin Cell Biol** 2001; 13:555-62.

Gallego S, Llorca A, Roma J, Sabado C, Gros L, de Toledo JS. Detection of bone marrow micrometastasis and microcirculating disease in rhabdomyosarcoma by a real-time RT-PCR assay. **J Cancer Res Clin Oncol** 2006; 132:356-62.

Gattenloehner S, Dockhorn-Dworniczak B, Leuschner I, Vincent A, Müller-Hermelink HK, Marx A. A comparison of MyoD1 and fetal acetylcholine receptor expression in childhood tumors and normal tissues: implications for the molecular diagnosis of minimal disease in rhabdomyosarcomas. **J Mol Diagn** 1999; 1:23-31.

Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. **BMC Cancer** 2012; 12:178.

Guillou L, Aurias A. Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. **Virchows Arch** 2010; 456:201-17.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:341-54.

Hoshino M, Ogose A, Kawashima H et al. Molecular analyses of cell origin and detection of circulating tumor cells in the peripheral blood in alveolar soft part sarcoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2009; 190:75-80.

Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2012; 30:525-32.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M et al. **SEER Cancer Statistics Review 1975-2012**. Bethesda; based on November 2014. Available form: <URL:https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2012/> [2017 set 12]

Isaksson S, Bendahl PO, Salomonsson A, et al. Detecting EGFR alterations in clinical specimens-pitfalls and necessities. **Virchows Arch** 2013; 463:755-64.

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

Jo VY, Doyle LA. Refinements in Sarcoma Classification in the Current 2013 World Health Organization Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. **Surg Oncol Clin N Am** 2016; 254:621-43.

Judson I, Verweij J, Gelderblom H, et al. Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2014, 15:415-23.

Kats-Ugurlu_G, Roodink I, de Weijert M, et al. Circulating tumour tissue fragments in patients with pulmonary metastasis of clear cell renal cell carcinoma. **J Pathol** 2009; 219:287-93.

Kelly KM, Womer RB, Barr FG. Minimal disease detection in patients with alveolar rhabdomyosarcoma using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. **Cancer** 1996; 78:1320-7.

Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:302-12.

Königsberg R, Obermayr E, Bises G, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. **Acta Oncol** 2011; 50:700-10.

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

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

Ksiazkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-Mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. **Pathobiology** 2012; 79:195-208.

Latorre MRDO, Franco EL. Epidemiologia dos sarcomas. In: Lopes A, editor. **Sarcomas de partes moles**. Rio de Janeiro: Medsi; 1999. p.3-18.

Lehnhardt M, Daigeler A, Homann HH, et al. MFH revisited: outcome after surgical treatment of undifferentiated pleomorphic or not otherwise specified (NOS) sarcomas of the extremities: an analysis of 140 patients. **Langenbecks Arch Surg** 2009; 394:313-20.

Mase T, Kawawaki N, Narumiya C, Aoyama T, Kato S, Nagata Y. Primary liposarcoma of the mediastinum. **Jpn J Thorac Cardiovasc Surg** 2002; 50:252-5.

Massagué J. TGFbeta in cancer. **Cell** 2008; 134:215-30.

Miettinen M, Fersch JF. Evaluation of biological potential of smooth muscle tumours. **Histopathology** 2006. 48:97-105.

Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sréter L, Tulassay Z. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. **Clin Cancer Res** 2001; 7:4080-5.

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

Nakayama R, Nemoto T, Takahashi H, et al. Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: characterization and reclassification of malignant fibrous histiocytoma. **Mod Pathol** 2007; 20:749-59.

Nascimento AF, Raut CP. Diagnosis and management of pleomorphic sarcomas (So-Called “MFH”) in adults. **J Surg Oncol** 2008; 97:330-9.

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. **Eur J Cancer** 2001; 37:S9-15.

Nielsen TO, West RB. Translating gene expression into clinical care: sarcomas as a paradigm. **J Clin Oncol** 2010; 28:1796-805.

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

Pennacchioli E, Tosti G, Barberis M, et al. Sarcoma spreads primarily through the vascular system: are there biomarkers associated with vascular spread? **Clin Exp Metastasis** 2012; 29:757-73.

Peter M, Magdelenat H, Michon J et al. Sensitive detection of occult Ewing's cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Br J Cancer** 1995; 72:96-100.

Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Cortesi E, Gazzaniga P. Clinical utility of circulating tumor cell counting through CellSearch(®): the dilemma of a concept suspended in Limbo. **Onco Targets Ther** 2014; 7:619-25.

Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. **Cell** 2012; 148:349-61.

Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. **Cancer Res** 2003; 63:2705-15.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. **Crit Rev Oncol Hematol** 1995; 19:183-232.

Sarcoma Meta-analysis Collaboration (SMAC). Adjuvant chemotherapy for localised resectable soft-tissue sarcoma of adults: meta-analysis of individual data. Sarcoma Meta-analysis Collaboration. **Lancet** 1997; 350:1647-54.

Satelli A, Mitra A, Cutrera JJ, et al. Universal marker and detection tool for human sarcoma circulating tumor cells. **Cancer Res** 2014; 74:1645-50.

Satelli A, Batth I, Brownlee Z, et al. EMT circulating tumor cells detected by cell-surface vimentin are associated with prostate cancer progression. **Oncotarget** 2017; 8:49329-37.

Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al. The neu oncogene: an Erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. **Nature** 1984; 312:513-6.

Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, et al. Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized Ewing tumor. **J Clin Oncol** 2003; 21:85-91.

Serrano MJ, Alvarez-Cubero MJ, De Miguel Pérez D, et al. Significance of EGFR expression in circulating tumor cells. **Adv Exp Med Biol** 2017; 994:285-96.

Sibilia M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcmann M. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. **Differentiation** 2007; 75:770-87.

Singer S, Demetri GD, Baldini EH, Fletcher CD. Management of soft-tissue sarcomas: an overview and update. **Lancet Oncol** 2000; 1:75-85.

Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:55-63.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:442-54.

Thomson B, Hawkins D, Felgenhauer J, Radich J. RT-PCR evaluation of peripheral blood, bone marrow and peripheral blood stem cells in children and adolescents undergoing VACIME chemotherapy for Ewing's sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma. **Bone Marrow Transplant** 1999; 24:527-33.

Verweij J, Baker LH. Future treatment of soft tissue sarcomas will be driven by histological subtype and molecular aberrations. **Eur J Cancer** 2010; 46:863-8.

Weiss SW, Goldblum JR. **Enzinger and Weiss's soft tissue tumours**. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2001. Benign tumors and tumor like lesions of synovial tissue; p.766-83.

Wurm J, Constantinidis J, Grabenbauer GG, Iro H. Rhabdomyosarcomas of the nose and paranasal sinuses: treatment results in 15 cases. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2005; 133:42-50.

Yang J, Du X, Chen K, et al. Genetic aberrations in soft tissue leiomyosarcoma. **Cancer Lett** 2009; 275:1-8.

Ye Z, Zhao L, Li J, Chen W, Li X. miR-30d Blocked Transforming Growth Factor β 1-Induced epithelial-mesenchymal transition by targeting snail in ovarian cancer cells. **Int J Gynecol Cancer** 2015; 25:1574-81.

Zhang J, Tian XJ, Zhang H, et al. TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. **Sci Signal** 2014; 7:ra91.

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, 29 de setembro de 2015.

À

Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Aluna: Aluna: Alexcia Camila Braun (Mestrado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2081/15

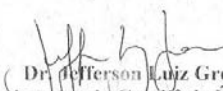
“Detecção de Células Tumorais Circulantes em Pacientes com Sarcomas.”

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 22/09/2015 após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 14/07/2015, aprovaram a realização do projeto (datado de agosto de 2015), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração Sobre o Plano de Recrutamento dos Participantes de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela Obtenção do TCLE;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE);
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE);
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 66 meses em relatório (modelo CEP).

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1



Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO ESTUDO: DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES EM PACIENTES COM SARCOMAS

Investigador Responsável: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

Nome do (a) participante da pesquisa: _____

RGH: _____

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

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

OBJETIVOS DO ESTUDO

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

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

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Ao concordar em participar deste estudo, você será submetido a duas coletas de sangue (aproximadamente 8 ml) nos seguintes momentos: antes do tratamento sistêmico e no final.

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

RISCOS

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

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

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

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

BENEFÍCIOS

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

MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES

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

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

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

CUSTOS

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

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

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

BASES DA PARTICIPAÇÃO

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

SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE

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

ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Você não terá nenhum tipo de remuneração ao aceitar participar deste estudo. A pesquisa não envolve nenhuma forma de compensação financeira aos participantes. Ao participar dessa pesquisa você não abre mão de nenhum dos seus direitos.

ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PACIENTE SUJEITO À PESQUISA

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

INFORMAÇÕES SOBRE NOMES, TELEFONES E ENDEREÇOS PARA CONTATOS

Esclarecimentos para questões sobre os direitos dos participantes na pesquisa e/ou danos relacionados à pesquisa, contatar a pesquisadora Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189 5000, ramal 2776). Se o pesquisador principal não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente- Hospital do Câncer- A.C. Camargo/ SP, cujo horário de funcionamento é de segunda a quinta-feira, das 07:00 às 18:00h e de sexta-feira das 07:00 às 16:00h (Telefone 2189-5020; endereço: Rua Professor Antônio Prudente 211- Liberdade- São Paulo, SP).

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

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

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

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

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

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

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

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

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

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

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