

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS E
microRNAs RELACIONADOS À TRANSIÇÃO
EPITÉLIO-MESÊNQUIMA EM CÉLULAS TUMORAIS
CIRCULANTES PROVENIENTES DE PACIENTES COM
CARCINOMA DE PÂNCREAS**

JOSÉ GABRIEL RODRÍGUEZ TARAZONA

**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. Fabio Albuquerque Marchi

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Rodríguez Tarazona, José Gabriel

Avaliação da expressão de proteínas e microRNAs relacionados à transição epitélio-mesênquima em células tumorais circulantes provenientes de pacientes com carcinoma de pâncreas / José Gabriel

Rodríguez Tarazona - São Paulo 2020.

120p.

Disertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores: 1. Células Neoplásicas Circulantes/Neoplastic Cells, Circulating 2. Neoplasias Pancreáticas/Pancreatic Neoplasms. 3. Transição Epitelial-Mesenquimal/Epithelial-Mesenchymal Transition 4. Biomarcadores/Biomarkers. 5. Biópsia Líquida/Liquid Biopsy. 6. MicroRNAs/MicroRNAs.

*“En algún lugar, algo increíble aguarda
para ser descubierto”
(Dr. Carl Edward Sagan)*

APOIO FINANCEIRO: Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Programa de Estudantes-Convênio e Pós-Graduação - PEC-PG - Mestrado - processo 190144/2017-3.

DEDICATÓRIA

Dedico o trabalho à minha mãe Isabel e ao seu esforço e entrega comigo na sua vida, ao meu pai Gabriel, que embora não esteja de corpo presente, sempre está no meu coração. As lembranças e todos seus conselhos ficaram em mim e desde o início deste caminho está como minha motivação. Dedico este trabalho também à minha tia Marina que sempre me dá sua compreensão e carinho em todo o que eu faço, ao meu padrinho Alberto que apesar dos anos continua me salvando nos problemas, a minha irmã e minhas sobrinhas, pela companhia na solidão, e à família e amigos que torcem para que tudo dê certo. Dedico também este trabalho para as famílias dos meus amigos que me adotaram aqui no Brasil, tive novas mães e irmãos que brindaram seu tempo, carinho e ternura comigo e me fizeram sentir como na minha própria casa, abriram seus corações e portas para um total desconhecido. Vivi felizes momentos, conheci surpreendentes lugares e pessoas maravilhosas que compartilharam comigo, grande aprendizado para a vida, muitíssimo obrigado sempre. Aos amigos de várias viagens no Brasil, Bianca, Sra. Regina, Sr. Zé, Lucas, Emne, Sra. Luiza, Thaís, Sra. Ramize, Sr. Ali, Jofer, Oscar, Sr. Rogerio, Sra. Maria José, Jorge, Daniela, Ângela, Pedro, Julia, Carol, Nathália, Sara, obrigado pela grata companhia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Dra. Ludmilla Thome Domingos Chinen, pela oportunidade, pelo tempo, disposição, paciência, capacidade, perseverança, entrega na pesquisa e mil coisas que aprendi dela, excelente pessoa e mãe do meu amigo brasileiro Dudu, só gratidão sempre.

Aos pacientes que conseguiram aportar uma parte importante deles para o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu co-orientador Fabio Albuquerque Marchi, pelo ensino, aporte no trabalho e disposição.

À Dra. Claudia Malheiros Coutinho Camillo, pela importantíssima colaboração, oportunidade, certeza e aporte neste trabalho. À Katia Klug Oliveira, pela dedicação, aporte, paciência, aprendizado e entrega nos experimentos.

Aos colegas do laboratório, para Bianca pela grande amizade, pela ajuda antes de me conhecer, as ideias e sinceridade, “tamo juntos” sempre, Emne pela amizade, atenção, tempo, carinho, seu grande aporte neste trabalho e paciência, Pedro Henrique pelo tempo, discussões de CTCs e companheirismo, grande apoio. Ederson pelos conselhos, sua música, cafés e tranquilidade em importantes momentos. Anna Paula pela alegria e seu sentido especial de percepção do mundo, Daniela pela tranquilidade e perseverança que me transmitia, Jacque pela alegria, ao Virgílio, Victor Hugo, Lais, Vanessa, Alexcia, obrigado pela colaboração.

Ao A.C. Camargo Cancer Center e ao Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE), pela infraestrutura, disponibilização de equipamentos laboratoriais e acesso aos dados necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em oncologia, à biblioteca e escritório de projetos, pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Departamento de Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center, ao Dr. Victor Hugo Fonseca e à enfermeira de pesquisa Lais Durant, pelo recrutamento dos pacientes e aporte na pesquisa.

À minha família e aos meus amigos do Brasil e da Colômbia que estiveram nessa solidão de estar longe de casa.

Ao CNPq e seu programa PEC-PG para estrangeiros de países em desenvolvimento, pelo auxílio financeiro, este é um importante programa de parceria com países que precisam educar os profissionais para que exista o futuro nestes lugares, importante apoio e altruísmo do governo do Brasil para o mundo.

Aos pesquisadores professores do A.C.Camargo Cancer Center que aportam nos conhecimentos dos estudantes e nos meus diretamente, importante labor.

Aos membros da banca de qualificação, que deram importantes sugestões para o desenvolvimento e escrita deste trabalho.

RESUMO

Rodríguez Tarazona JG. **Avaliação da expressão de proteínas e microRNAs relacionados à transição epitélio-mesênquima em células tumorais circulantes provenientes de pacientes com carcinoma de pâncreas**. São Paulo; 2020. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

O adenocarcinoma ductal do pâncreas é a quarta causa associada a câncer mais comum de morte no mundo ocidental. A presença de células tumorais circulantes (CTCs) no sangue pode ser considerada como um potencial fator prognóstico. Assim, o estudo de componentes que contribuem para sua formação de metástases tem se mostrado promissor. CTCs representam, em tempo real, a progressão tumoral, permitindo o monitoramento da eficácia terapêutica. O presente projeto teve por objetivo detectar CTCs presentes no sangue periférico de pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas, avaliar a expressão de proteínas relacionadas à transição epitélio-mesênquima (TEM) tais como a mesotelina, vimentina, Metaloproteinase de Matriz 2 (MMP2) e o Receptor Beta do Fator de Crescimento Transformador I (TGFβ-RI) e correlacionar com a resposta ao tratamento e sobrevida livre de progressão. Ainda, tentamos correlacionar os níveis de CTCs e expressão dos miRNAs destas células com sobrevidas livre de progressão (SLP) e global (SG). Foram analisadas amostras de sangue de 9 pacientes com adenocarcinoma de pâncreas (10 ml de sangue periférico) antes do início do tratamento e após 60 e 120 dias. As CTCs foram detectadas pelo sistema ISET (Rarecells, France) e depois caracterizadas por imunocitoquímica. Para análise de miRNAs das CTCs, foram colhidos em paralelo, leucócitos periféricos dos mesmos pacientes e de indivíduos saudáveis, como controle. Para essa análise, utilizamos apenas o material da coleta *baseline*. A extração do material foi realizada com um kit comercial (Qiagen) e a avaliação da expressão dos microRNAs com *TaqMan Low Density Array* (TLDA) em *pool*. As análises das proteínas envolvidas na TEM na coleta *baseline*, indicam que as CTCs expressavam predominantemente MMP2 (77,77%), seguida de TGFβ-RI (44,44%), vimentina (33,33%) e

mesotelina (22,22%). No primeiro grupo de acompanhamento de 5 pacientes, as CTCs expressaram MMP2 e vimentina (80%), TGF β -RI (60%) e mesotelina (20%). Comparadas ao grupo de 8 pacientes do segundo seguimento, as CTCs expressaram MMP2 (50%), vimentina (25%) e TGF-RI (12,5%). Constatamos que 3/9 pacientes no presente estudo progrediram (33,33%). Em dois pacientes, foram encontrados microêmbolos tumorais circulantes (MTC) e ambos apresentaram Trombose Venosa Periférica (TVP), mostrando que talvez haja uma correlação entre MTC e TVP. Encontramos dois microRNAs altamente expressos nas CTCs dos pacientes aqui avaliados, ambos envolvidos na estimulação do processo de TEM: hsa-miR-203a-3p e hsa-324-5p. Não houve diferença estatisticamente significativa no número de casos com presença de proteína ou correlação com outros fatores, embora a MMP2 tenha sido altamente expressa nas três coletas, seguida por TGF β -RI e vimentina. Também não encontramos qualquer correlação entre as variáveis analisadas e SLP e SG. Neste trabalho foi possível encontrar CTCs em todos os 9 pacientes com câncer de pâncreas. Devido ao baixo número de pacientes incluídos e curto tempo de *follow-up*, não conseguimos ver correlação entre níveis de CTCs e expressão de proteínas e SLP e SG, mas continuaremos acompanhando os pacientes. Encontramos correlação entre presença de MTC e TEP. E conforme esperávamos, encontramos microRNAs relacionados à TEM altamente expressos em CTCs de pacientes com câncer de pâncreas.

Descritores: Células Neoplásicas Circulantes. Neoplasias Pancreáticas. Transição Epitelial-Mesenquimal. Biomarcadores. Biópsia Líquida. MicroRNAs.

SUMMARY

Rodríguez Tarazona JG. **[Evaluation of the expression of proteins and microRNAs related to the epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells from patients with pancreatic carcinoma]**. São Paulo; 2020. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Ductal adenocarcinoma of the pancreas is the fourth most common cancer-associated cause of death in the Western world. The presence of circulating tumor cells (CTCs) in the blood can be considered as a potential prognostic factor. Thus, the study of components that contribute to metastases formation has shown to be promising. CTCs represent, in real time, tumor progression, allowing monitoring of therapeutic efficacy. The aim of this project was to detect CTCs present in the peripheral blood of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma, to evaluate the expression of proteins related to the epithelial-mesenchymal transition (TEM) such as mesothelin, vimentin, Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) and Transforming Growth Factor Beta Receptor I (TGF β -RI) and correlate with response to treatment, progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). Still, we tried to correlate the levels of CTCs and expression of miRNAs of these cells with progression-free and global survival. Blood samples from 9 patients with pancreatic adenocarcinoma (10 ml of peripheral blood) were analyzed before the start of treatment and after 60 and 120 days. CTCs were detected by the ISET system (Rarecells, France) and then characterized by immunocytochemistry. For analysis of the CTCs miRNAs, peripheral leukocytes from the same patients and healthy individuals were collected in parallel as a control. For this analysis, we used only the material from the baseline collection. The extraction of the material was made with a commercial kit (Qiagen) and the evaluation of the expression of the microRNAs with TaqMan Low Density Array (TLDA) in pool. The analysis of proteins involved in TEM in the baseline collection, indicates that CTCs expressed predominantly MMP2 (77.77%), TGF β -RI (44.44%), vimentin

(33.33%) and mesothelin (22.22%). In the first follow-up group of 5 patients, CTCs expressed MMP2 in (80%), vimentin and TGF β -RI in (60%) and mesothelin (20%). Compared to the group of 8 patients in the second follow-up, CTCs expressed MMP2 in (50%), vimentin (25%) and TGF-RI in (12.5%). We found that 3/9 patients in the present study progressed (33.33%). In two patients, circulating tumor microemboli (CTM) were found and both had Peripheral Venous Thrombosis (PVT), showing that there may be a correlation between CTM and PVT. We found two microRNAs highly expressed in the CTCs of the patients evaluated here, both involved in the stimulation of the TEM process: hsa-miR-203a-3p and hsa-324-5p. There was no statistically significant difference in the number of cases with protein or correlation with other factors, although MMP2 was highly expressed in the three collections, followed by TGF β -R1 and vimentin. We also found no correlation between the variables analyzed and PFS and OS. In this work, it was possible to find CTCs in all 9 pancreatic cancer patients. Due to the low number of patients included and short follow-up time, we were unable to see a correlation between CTC levels and protein expression and PFS and OS, but we will continue to monitor the patients. Here, we found a correlation between the presence of CTM and PVT. As we expected, we found TEM-related microRNAs highly expressed in CTCs of patients with pancreatic cancer.

Key-words: Neoplastic Cells, Circulating. Pancreatic Neoplasms. Epithelial-Mesenchymal Transition. Biomarkers. Liquid Biopsy. MicroRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenvolvimento embrionário do pâncreas	5
Figura 2	Anatomia do pâncreas	6
Figura 3	Vias de sinalização no câncer de pâncreas e quimioprevenção.....	17
Figura 4	Avaliação inicial do paciente com câncer de pâncreas	19
Figura 5	Avaliação terapêutica do paciente com câncer de pâncreas localizado	20
Figura 6	Avaliação terapêutica do paciente com câncer de pâncreas metastático.....	20
Figura 7	Biópsia Líquida.....	25
Figura 8	Tipos de migração das CTCs	29
Figura 9	Metaloproteinase de matriz 2.....	45
Figura 10	TGF β -RI	50
Figura 11	Vimentina	54
Figura 12	Mesotelina.....	56
Figura 13	Esquema do processo de filtração pelo ISET.....	63
Figura 14	Fluxograma de descrição cronológica das coletas.....	76

Figura 15	Fluxograma da classificação dos pacientes	77
Figura 16	Distribuição das CTCs na progressão na coleta baseline	78
Figura 17	Mediana de CTCs/ml nas 3 coletas	83
Figura 18	Níveis de CTCs nas 3 coletas classificando os pacientes metastáticos e não metastáticos.....	84
Figura 19	Níveis medianos de CTCs nas 3 coletas classificando os pacientes metastáticos e não metastáticos	84
Figura 20	Fotomicrografias de Células Hela com marcação positiva para Mesotelina DAB+	85
Figura 21	Distribuição das CTCs na expressão proteica de MMP2 na coleta <i>baseline</i>	86
Figura 22	Distribuição das CTCs na expressão proteica de TGFβ-R1 na coleta <i>baseline</i>	86
Figura 23	Distribuição das CTCs na expressão proteica de vimentina na coleta <i>baseline</i>	87
Figura 24	Distribuição das CTCs na expressão protéica de mesotelina na coleta <i>baseline</i>	87
Figura 25	Distribuição das CTCs na expressão protéica de vimentina na coleta de primeiro seguimento	88
Figura 26	Porcentagem de pacientes com CTCs que expressam as proteínas envolvidas no estudo em cada momento de coleta...	90

Figura 27	Fotomicrografias de Células Tumorais Circulantes (CTCs) isoladas do sangue de pacientes com câncer de pâncreas	95
Figura 28	Porcentagem de pacientes que expressaram MMP2, vimentina, TGFB e mesotelina nas 22 coletas	95
Figura 29	Curva de amplificação dos testes com o microRNA endogeno U6B	96
Figura 30	Curva de amplificação da placa TLDA.....	96
Figura 31	Representação dos 10 melhores miRNAs selecionados com expressão diminuída nas CTCs em comparação com leucócitos periféricos de pacientes com carcinoma de pâncreas	97
Figura 32	Representação dos 10 melhores miRNAs selecionados com expressão aumentada nas CTCs em comparação com leucócitos periféricos de pacientes com carcinoma de pâncreas	98
Figura 33	A expressão aumentada do miRNA hsa-miR-203a-3p está associada a pior sobrevida em pacientes com câncer de pâncreas com estagio inicial da doença após análise com dados do TCGA	100
Figura 34	A expressão diminuída do miRNA hsa-miR-324-5p está associada a pior sobrevida em pacientes com câncer de pâncreas com estagio inicial da doença após análise com dados do TCGA	100

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Fatores de risco modificáveis no câncer de pâncreas	10
Quadro 2	Principais tipos de câncer pancreático	12
Quadro 3	Interação das CTCs com células do sistema imune e seus efeitos	30
Quadro 4	Descrição detalhada dos anticorpos testados nas CTCs.....	64
Quadro 5	Reagentes e quantidades necessárias para a reação de síntese de cDNA específico	67
Quadro 6	Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de síntese de cDNA específico.....	68
Quadro 7	Reagentes e quantidades necessárias para a reação de qRTPCR	69
Quadro 8	Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de qRTPCR.....	69
Quadro 9	Reagentes e quantidades necessárias para a reação de transcriptase reversa	70
Quadro 10	Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de transcriptase reversa	71
Quadro 11	Reagentes e quantidades necessárias para a reação de préamplificação do cDNA	71

Quadro 12	Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de pré-amplificação do cDNA total	72
Quadro 13	Reagentes e quantidades necessárias para a amplificação do cDNA total através da placa TLDA.....	72
Quadro 14	Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de amplificação do cDNA total através da placa TLDA	73
Tabela 1	Características clínicas e patológicas dos pacientes do estudo (n= 9)	80
Tabela 2	Dados dos biomarcadores do estudo, taxa de detecção de CTCs, marcadores em CTCs em todos os momentos do estudo (n= 9)	81
Tabela 3	Caraterísticas clínicas e de expressão proteica dos pacientes envolvidos no estudo	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
CE	Células endoteliais
CPLA	Câncer pancreático localmente avançado
CPRE	Colangiopancreatografia endoscópica retrógrada
CPRM	Colangiopancreatografia por ressonância magnética
CTCs	Células Tumorais Circulantes
MTC	Microêmbolo tumoral circulante
DTCs	Células tumorais disseminadas
eCTCs	CTCs epiteliais
GI	Gastrointestinal
IPMN	Neoplasia mucinosa papilar intraductal pancreática
ISET	Isolation by size of tumor cells
mCTCs	CTCs epiteliais/mesenquimais
MEC	Matriz Extracelular
miRNAs	microRNAs
MMP	Metaloproteinases de matriz
MSLN	Mesotelina
NLR	Razão neutrófilos/linfócitos
NMPI	Neoplasia Mucínica Papilar Intraductal
PanINs	Neoplasias intraepiteliais pancreáticas
PLR	Razão plaqueta/linfócito
PNETs	Tumores endócrinos do pâncreas
PC	Câncer de pâncreas
PDAC	Adenocarcinoma ductal de pâncreas
qRT-PCR	Reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real
SG	Sobrevivência global
SLP	Sobrevida livre de progressão
TC	Tomografia computadorizada multislice com contraste
TEM	Transição epitélio-mesênquima

TGF-β	Fator de crescimento transformador- β
TILs	Linfócitos infiltrantes de tumor
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TLDA	Taqman® low density array

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Pâncreas.....	4
1.2	Carcinoma de Pâncreas	8
1.2.1	Fatores de risco	8
1.2.2	Tipos de câncer pancreático.....	10
1.2.3	Apresentação clínica do câncer pancreático	12
1.2.4	Etiologia do câncer de pâncreas	14
1.2.5	Diagnóstico do câncer pancreático.....	15
1.2.6	Tratamento do câncer de pâncreas.....	17
1.2.6.1	Tratamento adjuvante	17
1.2.6.2	Tratamento neoadjuvante	18
1.3	Adenocarcinoma Ductal de Pâncreas	21
1.4	Biópsia.....	22
1.5	Biópsia Líquida	24
1.6	Células Tumorais Circulantes.....	25
1.7	Microembolo Tumoral Circulante.....	27
1.8	Biologia das CTCs.....	27
1.8.1	Intravasação e interação de CTCs no sangue.....	29
1.9	Análises de CTCs.....	31
1.10	Enriquecimento e Identificação de CTCs	32
1.11	ISSET® Isolamento por Tamanho De Células Tumorais.....	35
1.12	Células Tumorais Circulantes em Carcinoma de Pâncreas.....	36
1.13	Relação Neutrófilo Linfócito.....	39
1.14	Relação Plaqueta Linfócito	40
1.15	Transição Epitélio-Mesênquima no Desenvolvimento da Doença.....	42
1.16	Metaloproteinase 2 de Matriz (MMP2).....	43
1.17	Fator de Crescimento Transformador Beta Receptor 1 (TGFβ-RI)....	46
1.18	Vimentina.....	50
1.19	Mesotelina	54

1.20	MicroRNAs	56
2	OBJETIVOS	59
2.1	Objetivo geral	59
2.2	Objetivos específicos	59
3	METODOLOGIA	60
3.1	Desenho do Estudo	60
3.2	Crêterios de Inclusão	61
3.3	Crêterios de Exclusão	61
3.4	Amostras de Sangue	61
3.5	Isolamento de CTCs e Marcadores	62
3.5.1	Protocolo para filtração de sangue no ISET	62
3.6	Imunocitoquímica	64
3.6.1	Protocolo de Imunocitoquímica	65
3.7	Contagem de Plaquetas, Neutr�f�los e Linfócitos	66
3.8	Extração de RNA das CTCs	66
3.9	Análise da Concentração dos RNAs	66
3.10	Avaliação da Expressão dos miRNAs	67
3.10.1	Síntese do cDNA específico	67
3.10.2	Reações de qRT-PCR	68
3.11	Avaliação do Perfil de microRNAs	70
3.11.1	Síntese do cDNA	70
3.11.2	Pr�-amplificação do cDNA	71
3.11.3	Amplificação dos microRNAs - TAQMAN� LOW Density Array (TLDA)	72
3.12	Análises dos microRNAs	74
3.13	Análises Estatísticas	74
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1	Coletas de Amostras	76
4.2	Características Clínico-Patológicas	77

4.3	Expressão Proteica nas CTCs.....	85
4.4	Expressão dos microRNAs.....	96
5	CONCLUSÕES	105
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

ANEXO

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

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

1 INTRODUÇÃO

Fundamentalmente, o adenocarcinoma ductal de pâncreas é o quarto tipo de câncer mais comum no mundo ocidental (LEWIS et al. 2016).

Atualmente, o câncer de pâncreas é classificado como o 14º câncer mais comum e a 7ª maior causa de mortalidade por câncer no mundo. As estimativas da Globocan revelaram que haverá 458918 diagnósticos e 432242 mortes por câncer de pâncreas em todo o mundo em 2018. Além disso, as taxas de incidência variam significativamente entre países, certamente, a maior incidência padronizada por idade é observada na Europa e América do Norte e a mais baixa na África e no Sul da Ásia Central. Portanto, há uma tendência geral de taxas de incidência mais altas nos países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento (MCGUIGAN et al. 2018). No Brasil, o câncer de pâncreas responde ao 2% de todos os tipos de câncer e 4% do total das mortes pela doença. Embora não está nos dez principais cânceres do Brasil, é a oitava causa de morte por câncer, devido que a maioria dos pacientes tem diagnóstico na fase localmente avançada ou metastática da enfermidade. Apesar disso, o câncer de pâncreas tem a 13ª posição em incidência por tipo de câncer divulgado pelo Instituto Nacional de Câncer / Ministério da Saúde (SOLDAN 2017). No entanto, o subtipo histológico mais comum e também mais agressivo do câncer de pâncreas é o adenocarcinoma ductal, que representa 85-90% de todas as neoplasias pancreáticas (ÅKERBERG et al. 2017).

Por outro lado, os fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de câncer de pâncreas incluem o tabagismo, obesidade, diabetes tipo I, pancreatite crônica, hepatite B e infecção por *Helicobacter pylori* (LEWIS et al. 2016). Outros grupos de alto risco incluem: pacientes com ≥ 2 parentes de primeiro grau com história de câncer de pâncreas; aqueles com mutação no gene BRCA2 ou com outras síndromes familiares conhecidas associadas ao câncer de pâncreas, por exemplo, pancreatite hereditária, câncer colorretal hereditário, Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers, melanoma familiar; ou aqueles com uma lesão pré-maligna, como a Neoplasia Mucínica Papilar Intraductal (NMPI) (LEWIS et al. 2016).

Sem dúvida, a ressecção cirúrgica continua como a única modalidade de tratamento com potencial de cura; no entanto, apenas 15-20% dos pacientes com câncer pancreático diagnosticado com a doença são operáveis. Mas o nível de recorrências após a cirurgia ainda é alto, considerando tanto recorrências locais quanto sistêmicas. O tratamento adjuvante é usado para melhorar perspectivas de sobrevivência, podendo utilizar quimioterapia sistêmica, radiação e/ou modalidades combinadas. No entanto, ainda há controvérsias quanto ao tratamento de escolha (BLASZAK et al. 2017).

Em resumo, três abordagens clínicas diferentes podem ser descritas ao diagnóstico: (I) uma ou mais metástases à distância que requerem quimioterapia sistêmica neoadjuvante; (II) tumor ressecável que pode ser tratado por cirurgia seguida de quimioterapia adjuvante e (III) câncer pancreático localmente avançado (CPLA) que não é ressecável no

diagnóstico devido à invasão local de grandes eixos arteriais (tronco celíaco e/ou artéria mesentérica superior), mas sem metástases distantes detectáveis. A sobrevivência global média (SG) é geralmente maior em CPLA (9-12 meses) em relação ao câncer de pâncreas metastático (6-8 meses). Foi relatado que aproximadamente 30% dos pacientes com CPLA morrem de progressão do tumor localmente avançando e aproximadamente 70% morrem de doença metastática generalizada (BIDARD et al. 2013).

Embora as opções terapêuticas para gerenciar CPLA sejam controversas, esquematicamente, aconselha-se utilizar radiação como terapia principal concentrando-se na massa tumoral primária. O uso de quimioterapia de indução seguida de quimiorradiação de consolidação para pacientes sem evidência de progressão distante é uma estratégia terapêutica promissora, e o teste internacional de fase III - LAP 07 foi projetado para avaliar prospectivamente sua relevância (BIDARD et al. 2013).

Atualmente, o câncer de pâncreas (PC) tem uma taxa de mortalidade de quase 98% em todo o mundo e a sobrevida global em pacientes com PC está entre as piores nos tumores sólidos (XIE et al. 2016).

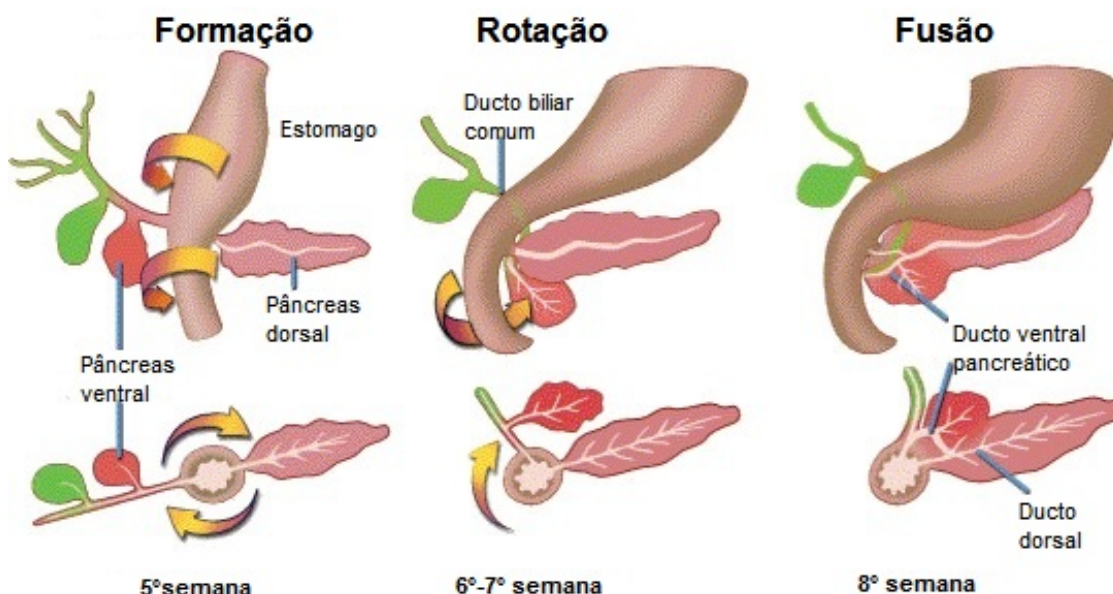
Em síntese, no cenário atual de acompanhamento e tratamento do câncer, onde a personalização do tratamento poderia contribuir para um melhor prognóstico destes pacientes, a utilização de biomarcadores que possibilitem análises com finalidades diagnósticas, prognósticas e preditivas torna-se necessária.

1.1 O PÂNCREAS

Os sistemas digestivo e respiratório têm diferentes funções fisiológicas e são geralmente considerados e estudados como duas estruturas independentes. No entanto, apesar de separados no nascimento, ambos derivam de uma estrutura de desenvolvimento comum e transitória, o foregut, que é a parte anterior do trato gastrointestinal (GI). O trato GI é um sistema extremamente complexo, tridimensional, especializado e vital, derivado de uma estrutura simples em forma de tubo. O trato GI dos vertebrados inclui o sistema digestivo luminal e os derivados do trato GI (tireoide, pulmões, fígado e pâncreas) (FAURE e DE SANTA BARBARA 2011).

No início, o pâncreas aparece pela primeira vez aproximadamente às 5 semanas de gestação, como duas bolsas do revestimento endodérmico do duodeno, distais ao estômago em formação. As saídas são o pâncreas ventral e dorsal. O pâncreas dorsal cresce mais rapidamente que o pâncreas ventral. Além disso, o pâncreas ventral gira em direção ao pâncreas dorsal à medida que é "transportado" pelo ducto biliar comum. Finalmente, o pâncreas ventral e dorsal se une e os sistemas ductais se fundem, de modo que as secreções do pâncreas ventral entram no sistema ductal compartilhado do pâncreas ventral e do ducto biliar comum. No arranjo anatômico final, a cabeça do pâncreas se origina do pâncreas dorsal e do pâncreas ventral. A porção do pâncreas ventral é chamada de processo uncinado. O corpo e a cauda do pâncreas são originários do pâncreas dorsal

(PANDOL 2010).



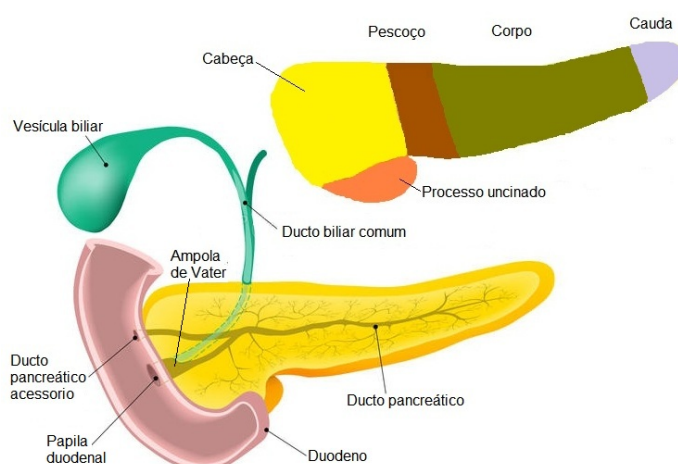
Fonte: adaptado de PANDOL (2010)

Figura 1 - Desenvolvimento embrionário do pâncreas. Durante a 3ª semana de desenvolvimento intra-uterino, já existe um primórdio hepático e um primórdio pancreático (dorsal) que surgem do intestino (de origem endodérmica). Durante a 5ª semana, a parte ventral e dorsal do pâncreas já é observada, estando o ventral sob o fígado e a formação dos ductos pancreáticos em ambas as porções. Posteriormente, inicia-se uma rotação antimesentérica (no sentido horário) pelo estômago, com o objetivo de deixar sua maior curvatura no lado esquerdo e localizar a porção ventral com a parte dorsal do estômago na 6ª semana. É no final da 6ª semana que o pâncreas já está totalmente formado.

Também, o pâncreas de um ser humano adulto tem um volume médio de 72 cm³ (parênquima 44 cm³, gordura 28 cm³), mede 12 a 20 cm de comprimento, 3 a 5 cm de altura e 1-3 cm de largura. A forma do pâncreas é alongada, macroscopicamente divide-se em quatro partes: a cabeça, pescoço, corpo e cauda. O pâncreas é um órgão retroperitoneal. A cabeça do pâncreas é cercada pelo duodeno, o pescoço está localizado próximo aos vasos mesentéricos superiores, o corpo fica atrás da parede posterior

do estômago e a cauda se estende até o hilo do baço. O pâncreas, ao contrário da maioria das glândulas do corpo humano, não possui uma cápsula fibrosa distinta (HENRY et al. 2019).

O ducto pancreático (ducto de Wirsung) se origina na cauda da glândula, atravessa todo o órgão e se conecta ao ducto biliar comum. Essa união é denominada ampola hepatopancreática (ampola de Vater) e está localizada na papila duodenal. Um ducto pancreático acessório patente (ducto de Santorini) pode estar presente em 41- 52,5% da população (HENRY et al. 2019).



Fonte: Adaptado de <https://pt.dreamstime.com/ilustração-stock-anatomia-do-pâncreas-etiquetado-image52624116>.

Figura 2 - Anatomia do pâncreas. O pâncreas se estende do duodeno ao baço, atrás do estômago. Sua porção mais à direita é chamada de cabeça e é conectada ao processo uncinado e ao corpo por um pescoço; o membro esquerdo (mais estreito) é conhecido como cauda, entrando em contato com o baço. Devido à sua localização, o pâncreas está em contato com um grande número de vasos sanguíneos e linfáticos, além de estruturas nervosas, não apenas por si só, mas também pelos órgãos que o cercam.

Ao mesmo tempo, o pâncreas é uma glândula complexa composta de partes endócrinas e exócrinas. As células exócrinas produtoras de enzimas que formam ácinos, que são de forma cônica e dispostas em torno de um lúmen central. Os lóbulos do pâncreas consistem nos ácinos, que são separados por tecido conjuntivo contendo capilares. Os ductos intercalados conectam os ácinos aos ductos intra-lobulares, que drenam para os ductos interlobulares. A parte proximal desse sistema de dutos é revestida com epitélio escamoso simples; a parte distal é revestida com epitélio cubóide simples. Os ductos interlobulares maiores e os ductos principais são revestidos com epitélio colunar e contêm células produtoras de muco (HENRY et al. 2019).

Certamente, o pâncreas consiste em duas partes integradas em uma estrutura anatômica. O componente exócrino do pâncreas secreta o suco pancreático (aproximadamente 1200 - 1500 ml por dia) que contém água, íons bicarbonato (determinando sua reação alcalina) e uma variedade de enzimas, incluindo tripsina e quimiotripsina (HENRY et al. 2019). A tripsina cliva e ativa as enzimas digestivas restantes. Mais de 40 mutações foram descobertas no tripsinogênio catiônico (PRSS1), o gene que codifica a tripsina. As mutações geralmente causam a ativação prematura do tripsinogênio em tripsina, produzindo uma condição caracterizada por episódios recorrentes de pancreatite, levando à insuficiência pancreática (FUSCO et al. 2019).

Inclusive, outras enzimas muito importantes que fazem parte do suco pancreático são as carboxipeptidases, elastase, lipase, fosfolipase A,

amilase, DNase e RNase. O suco pancreático é excretado no duodeno através do(s) ducto(s) pancreático(s) (HENRY et al. 2019).

Do mesmo modo, o componente endócrino consiste em cinco tipos de células que produzem pelo menos cinco tipos de hormônios: as células alfa secretam glucagon, as células beta secretam insulina, as células delta secretam somatostatina, as células PP (gama) secretam polipeptídeo pancreático e as células épsilon secretam grelina. Os hormônios secretados são transportados pela corrente sanguínea para os órgãos e tecidos destinados. Os pequenos aglomerados de células endócrinas foram descritos pela primeira vez por Langerhans (1869). Hoje, a parte endócrina do pâncreas costuma ser chamada de ilhotas de Langerhans. A maioria das ilhotas são esféricas; no entanto, elas também podem ser planas ou alongadas, também variam em diâmetro de 50 a 500 µm. O maior número de ilhotas pode ser encontrado no corpo e na cauda do pâncreas. Existem cerca de 1 milhão de ilhotas no pâncreas de um ser humano, o que representa 1 a 2% da massa do pâncreas (HENRY et al. 2019).

1.2 CARCINOMA DE PÂNCREAS

1.2.1 Fatores de risco

O câncer de pâncreas é tipicamente uma doença dos idosos. É extremamente raro que os pacientes sejam diagnosticados antes dos 30 anos, e 90% dos pacientes são diagnosticados com idade superior a 55 anos de idade, com a maioria em sua 7ª e 8ª década de vida. A incidência

mundial de câncer de pâncreas é maior nos homens do que nas mulheres (taxa padronizada por idade de 5,5 nos homens, em comparação com 4,0 nas mulheres). Também nos Estados Unidos é relatado um risco aumentado de 50% a 90% de câncer de pâncreas em afro-americanos em comparação com caucasianos, enquanto as taxas de incidência são mais baixas entre as ilhas do Pacífico e asiáticos-americanos (MCGUIGAN et al. 2018).

Ao mesmo tempo, o risco de desenvolver adenocarcinoma pancreático foi pesquisado em 12 grandes estudos prospectivos de coorte, onde foi observado um risco significativamente elevado entre aqueles que tinham alelos de grupos sanguíneos A ou B em comparação com aqueles com grupo sanguíneo O. É importante notar que um aumento do risco foi observado com a adição de cada alelo não O, com um grande aumento no risco observado para participantes com o tipo sanguíneo BB (WOLPIN et al. 2010).

Por isso, pesquisas sobre o papel da microbiota intestinal no câncer de pâncreas demonstram que níveis mais baixos de *Neisseria elongans* e *Streptococcus mitis* e níveis mais altos de *Porphyromonas gingivalis* e *Granulicatella adiacens* estão associados a um risco aumentado de câncer no pâncreas. Aliás, os pacientes com fatores de risco familiares têm um risco 9 vezes maior de desenvolver câncer de pâncreas do que aqueles sem histórico familiar, e isso aumenta para um risco 32 vezes maior se três ou mais parentes de primeiro grau tiverem sido diagnosticados anteriormente. No câncer pancreático familiar, o risco aumenta exponencialmente com o número de parentes de primeiro grau afetados e BRCA2 e PALB são as

mutações mais comumente implicadas (MCGUIGAN et al. 2018).

Desta maneira, o risco de câncer de pâncreas é duas vezes maior em pacientes com diabetes tipo 1 em comparação com aqueles sem essa condição (STEVENS et al. 2007), também demonstrou-se o risco aumentado de câncer de pâncreas em pacientes com diabetes tipo 2 (HUXLEY et al. 2005).

Quadro 1 - Fatores de risco modificáveis no câncer de pâncreas.

Fatores	Direção da associação	Força da associação	Resultados notáveis relacionados
Fumo	Positiva	Forte associação; 74% de risco aumentado em fumantes atuais; Risco aumentado em 20% em ex-fumantes	Dose responsiva; o risco permanece 10-20 anos após a cessação do tabagismo
Álcool	Misto entre nenhuma associação e positiva	Vários; Risco aumentado de 15% a 43% na metanálise	Dose responsiva; dependente do sexo; Aumento do risco em bebedores de bebidas destiladas; ligação com pancreatite crônica, que é um fator de risco para câncer de pâncreas
Obesidade	Positiva	10% de risco aumentado para cada 5 unidades de índice de massa corporal	Ligação com diabetes, associada ao aumento do risco de câncer de pâncreas
Fatores alimentares	Variável	Associação positiva não significativa para carne vermelha; Risco aumentado de 17% associado a 50 g/d de consumo de carne processada em comparação com 20 g/d	Não é possível obter consenso geral e é necessária mais pesquisa
<i>Helicobacter pylori</i>	Positiva	Risco aumentado em 45%	Viés significativo de publicação e pequenos números incluídos, portanto, são necessários mais estudos

Fonte: Adaptado de MCGUIGAN et al. (2018)

1.2.2 Tipos de câncer pancreático

Está comprovado que o noventa e cinco por cento dos cânceres pancreáticos originam-se da porção exócrina da glândula. Um mecanismo

proposto para o desenvolvimento de adenocarcinoma pancreático invasivo é uma progressão gradual através de lesões precursoras não invasivas, geneticamente e histologicamente bem definidas, chamadas neoplasias intraepiteliais pancreáticas (PanINs), que são lesões microscópicas em ductos pancreáticos pequenos. Outro precursor dos carcinomas pancreáticos invasivos é a neoplasia mucinosa papilar intraductal pancreática (IPMN). As IPMNs pertencem ao grupo cada vez mais diagnosticado e tratado de tumores císticos. Eles progridem de um tumor intraductal benigno através de graus crescentes de displasia para adenocarcinoma invasivo e, portanto, fornecem modelos de progressão pancreática neoplásica. Outros tipos de tumor no pâncreas são tumores endócrinos e uma variedade de tumores pancreáticos raros, como carcinoma de células acinare (GRÜTZMANN 2014).

Inicialmente, os tumores endócrinos do pâncreas (PNETs) originam-se das células das ilhotas, que por sua vez surgem de células da crista neural ou endoderme embrionária do *foregut*. Histologicamente, os PNETs parecem semelhantes aos tumores carcinoides do trato gastrointestinal. A gastrina é sintetizada nas células G, encontrada predominantemente no antro gástrico e em menor número na mucosa duodenal. A liberação de gastrina é controlada por estímulos químicos, neurais, mecânicos, pela proteína ingerida, distensão gástrica. A hipersecreção ácida e a hipergastrinemia podem ser encontradas em muitas condições. Apesar de vários avanços no entendimento dos gastrinomas, a célula de origem permanece incerta. Os gastrinomas pancreáticos são mais pleomórficos,

com arranjos celulares mais heterogêneos. Embora as células G não estejam normalmente presentes no pâncreas adulto, foi proposto que células-tronco multipotentes endócrino-programadas e diferenciadas em relação às células G são responsáveis por gastrinomas pancreáticos (FUSCO et al. 2019).

Embora os gastrinomas tendam a crescer lentamente, 60% a 90% deles terão biologia agressiva. O fígado é o local mais comum de metástase, com 70% a 80% dos pacientes diagnosticados com metástase hepática no momento do diagnóstico. A metástase hepática é considerada o preditor mais importante para a sobrevida em longo prazo, pois esses pacientes tendem a ter um prognóstico pior (FUSCO et al. 2019).

Quadro 2 - Principais tipos de câncer pancreático

Cânceres Pancreáticos Exócrinos	Cânceres Pancreáticos Neuroendócrinos
Adenocarcinoma ductal pancreático	Insulinoma
Neoplasia mucinosa papilar intraductal	Gastrinoma
Cistoadenocarcinoma mucinoso	Glucagonoma
Carcinoma adenoescamoso	Somatostatina
Tumor sólido pseudopapilar	VIPoma (Vasoactive intestinal peptide releasing tumor)

Fonte: Adaptado de GRÜTZMANN (2014)

1.2.3 Apresentação clínica do câncer pancreático

A maioria dos casos de câncer de pâncreas é diagnosticada por dor abdominal inespecífica ou icterícia ou ambos (GRÜTZMANN 2014).

Estudos comparando a incidência de sintomas precoces de câncer de pâncreas sugerem a associação de 12 sintomas de alarme: perda de peso,

dor abdominal, náusea e vômito, inchaço, dispepsia, diabetes, alterações no hábito intestinal, prurido, letargia, dor nas costas, dor no ombro e icterícia. Dor nas costas, letargia e diabetes de início recente, foram identificados como características únicas dos cânceres pancreáticos. Foi demonstrado que 5 sintomas ocorrem mais de 6 meses antes do diagnóstico: dor nas costas, dor no ombro, disfagia, alterações no hábito intestinal e letargia. Uma revisão sistemática descreveu os sintomas depressivos como os primeiros sintomas em perto de 38 a 45% dos pacientes com câncer de pâncreas. Outra revisão sistemática relatou 9 sintomas de câncer pancreático avançado. Desses sintomas, diabetes (97%) e dor abdominal (78-82%), causada pela interação nervo-câncer. Embora vários pesquisadores tenham relatado que 25% dos pacientes apresentam desconforto na parte superior do abdômen até 6 meses antes do diagnóstico, a detecção precoce do câncer de pâncreas ainda parece difícil, mesmo que os sintomas levanten a suspeita dos médicos (KAMISAWA et al. 2016).

Mesmo, outros relatos sugerem que o único sinal clínico específico está presente se o tumor estiver crescendo na cabeça do pâncreas, próximo ao ducto biliar. Muitos pacientes apresentam tardiamente sintomas secundários relacionados a um tumor maligno maior e/ou disseminação metastática com dor nas costas (invasão direta do plexo celíaco) ou ascite maligna. Às vezes, a perda inexplicada de peso é o único sinal. Aproximadamente o 80% dos pacientes têm doença irresssecável no momento do diagnóstico devido à disseminação metastática ou doença

localmente avançada. O desenvolvimento de diabetes deve alertar fortemente o médico para a possibilidade de câncer de pâncreas. Pacientes acima de 50 anos com diabetes de início tardio têm um risco 8 vezes maior de desenvolver câncer de pâncreas dentro de três anos após o diagnóstico em comparação com a população em geral. A maioria dos tumores malignos se desenvolve na cabeça do pâncreas devido à apresentação tardia, os tumores na cauda pancreática apresentam menor ressecabilidade e pior prognóstico (GRÜTZMANN 2014).

1.2.4 Etiologia do câncer de pâncreas

O câncer é reconhecido como uma doença genética causada pelo acúmulo de mutações somáticas em oncogenes e genes supressores de tumores. Existem 4 genes principais no adenocarcinoma ductal pancreático (um oncogene e três supressores de tumor). O KRAS, que codifica uma pequena GTPase, media a sinalização dos receptores dos fatores de crescimento. Mutações somáticas no KRAS ocorrem em mais de 90% dos tumores e se aglomeram em pontos críticos específicos, comumente no códon 12. CDKN2A, este codifica um regulador essencial do ciclo celular, é o gene supressor de tumor mais frequentemente alterado com perda de função em mais de 90% dos adenocarcinomas ductais. Mutações somáticas no gene supressor de tumor TP53 também são frequentes, a proteína codificada por TP53 é muito importante na resposta ao estresse celular e sofre mutação em uma ampla variedade de tipos de tumor. O gene supressor de tumor SMAD4 medeia a sinalização do receptor do fator de

crescimento transformador β (TGF β) e é inativado em cerca de 50% dos tumores (KAMISAWA et al. 2016).

1.2.5 Diagnóstico do câncer pancreático

Marcadores tumorais pareciam ser ideais para o diagnóstico precoce do câncer, mas na grande maioria dos estudos realizados nas últimas duas décadas, o CA19-9 sozinho foi aplicado como o “padrão ouro” para monitoramento e diagnóstico de pacientes com câncer de pâncreas (GRÜTZMANN 2014).

Contudo, o baixo valor preditivo positivo do CA19-9 significa que ele não tem papel na triagem em massa de pacientes assintomáticos e é adequado apenas para monitorar a resposta ao tratamento e como marcador de doença recorrente.

Ao mesmo tempo, a espectrometria de massa dos metabólitos do tecido tumoral encontrou níveis aumentados de subprodutos metabólicos específicos no adenocarcinoma pancreático em estágio inicial. Mas houve discordância entre os níveis destes no tecido tumoral comparado com as amostras de plasma.

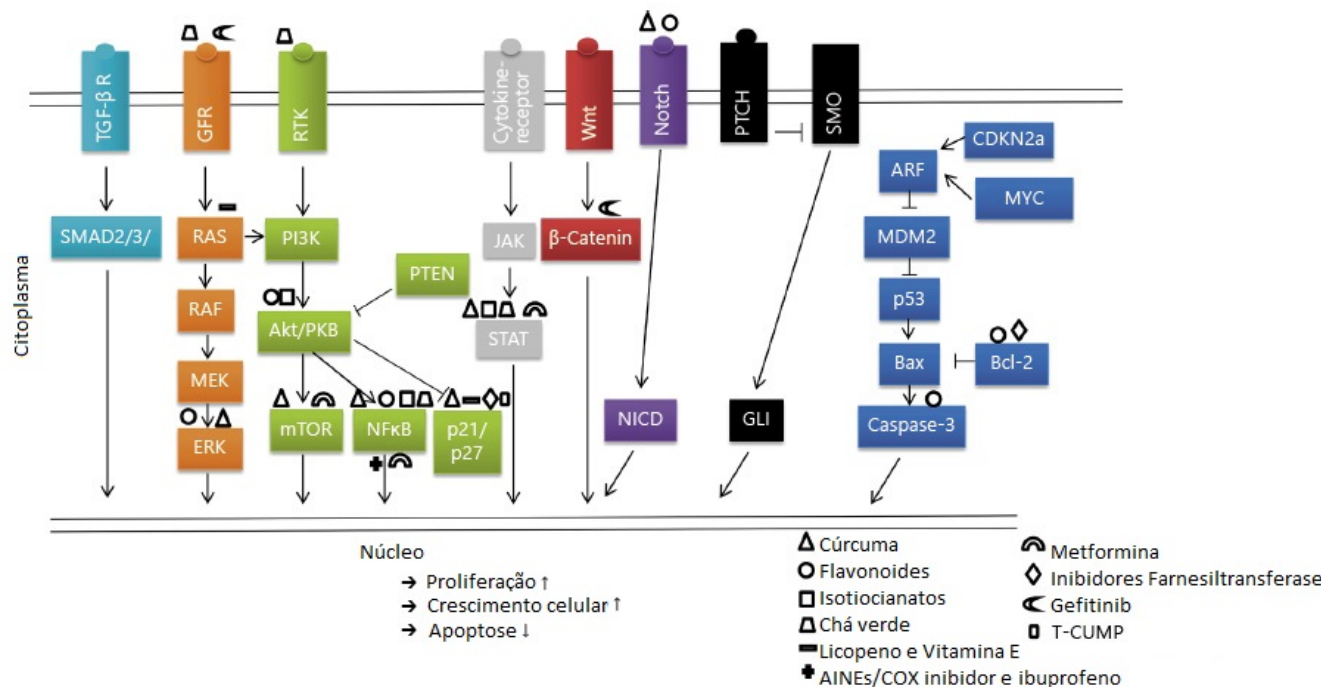
É reconhecido que a alta taxa de mutação genética associada ao adenocarcinoma do pâncreas também levou à investigação de DNA livre de células e células tumorais na circulação sistêmica como uma triagem ou teste de diagnóstico. Pesquisas divulgaram que, apesar das altas taxas de mutação KRAS no tecido tumoral pancreático, as concentrações de células tumorais circulantes ou de DNA livre de células não tinham o nível de

sensibilidade ou especificidade necessário para permitir seu uso como testes de triagem (MCGUIGAN et al. 2018).

Por outro lado, o objetivo da imagem é detectar o câncer de pâncreas, detectar metástases, avaliar o risco de malignidade e prever a ressecabilidade. A ultrassonografia transabdominal (US) serve como exame básico de imagem. Em mãos experientes, é possível prever a ressecabilidade com alta precisão usando US. A ultrassonografia endoscópica é um método diagnóstico útil, especialmente em pequenos tumores pancreáticos. Permite a aspiração com agulha fina para análise patológica. O câncer de pâncreas também pode ser visualizado por colangiopancreatografia endoscópica retrógrada (CPRE). O aparecimento de sinais de duplo ducto (oclusão do ducto pancreático e biliar) é patognomônico de um tumor maligno da cabeça do pâncreas. No entanto, a CPRE foi substituída principalmente por tomografia computadorizada *multislice* com contraste (TC) e colangiopancreatografia por ressonância magnética (CPRM) porque são muito menos invasivas que a CPRE. Tanto a tomografia computadorizada como a ressonância magnética com MRCP são úteis para o diagnóstico e caracterização de massas pancreáticas. Ambas as modalidades fornecem uma avaliação precisa de um tumor e sua relação com os órgãos e vasos circundantes (GRÜTZMANN 2014).

Enquanto a descoberta de biomarcadores para o diagnóstico de adenocarcinoma pancreático continua, diferentes estudos concluem que a falta de biomarcador validado e específico para esta doença continua sendo um grande desafio (ZHOU et al. 2017).

1.2.6 Tratamento do câncer de pâncreas



Fonte: Adaptado de BENZEL e FENDRICH (2018)

Figura 3 - Vias de sinalização no câncer de pâncreas e quimioprevenção. A quimioprevenção complementa o uso de agentes naturais, sintéticos ou biológicos, que inibem a progressão do tumor, implicando em baixos riscos e sem efeitos colaterais. O câncer de pâncreas leva aproximadamente 10 anos para se desenvolver desde a fase inicial até um tumor e, no curso da doença, leva mais 5 anos para uma disseminação metastática

1.2.6.1 Tratamento adjuvante

Entre os pacientes com câncer pancreático metastático, a quimioterapia combinada com fluorouracil, leucovorina, irinotecano e oxaliplatina (FOLFIRINOX) leva a uma sobrevida global mais longa do que a terapia com gencitabina. Um estudo experimental com um protocolo modificado de FOLFIRINOX (mFOLFIRINOX) comprovou alta eficácia na adjuvancia, comparado ao uso único da gencitabina, com sobrevida

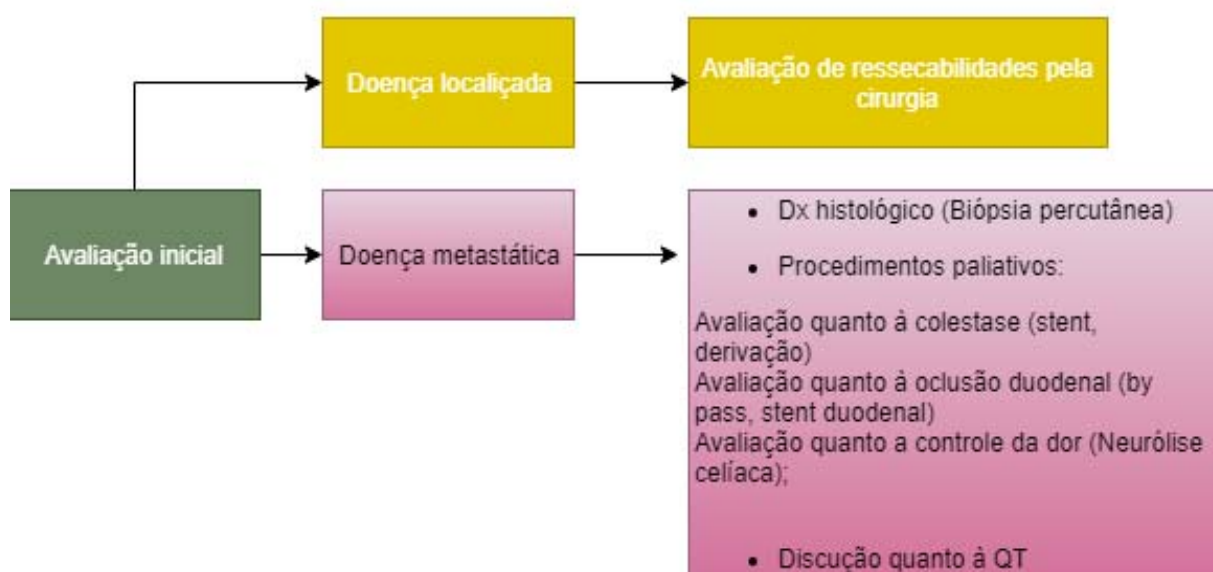
mediana livre de doença de 21,6 meses em comparação a 12,8 meses e uma taxa de sobrevida livre de doença de 3 anos de 39,7% em comparação com 21,4% com gencitabina isolada. O protocolo do mFOLFIRINOX foi superior ao da gencitabina, incluindo pacientes com tumores T3 T4, tumores N+, ressecção R1 e tumores pouco diferenciados ou indiferenciados (CONROY et al. 2018).

1.2.6.2 Tratamento neoadjuvante

Um estudo com o objetivo de comparar a sobrevida global entre pacientes que receberam terapia neoadjuvante seguida de ressecção e aqueles que receberam ressecção inicial, assim como um subgrupo de pacientes com ressecção inicial que também receberam terapia adjuvante para adenocarcinoma pancreático ressecável em estágio inicial. 15.237 pacientes com adenocarcinoma de cabeça pancreática ressecada em estágio clínico I ou II. O grupo que recebeu terapia neoadjuvante seguido da ressecção tem um benefício significativo de sobrevida em comparação com o grupo de ressecção inicial no adenocarcinoma de cabeça de pâncreas ressecado em estágio inicial. Esses achados apoiam o uso da terapia neoadjuvante, particularmente como ferramenta de seleção de pacientes, no tratamento do adenocarcinoma pancreático ressecável. Também o tratamento neoadjuvante tem um efeito benéfico significativo no estágio T, linfonodos e margens de ressecção (MOKDAD et al. 2017).

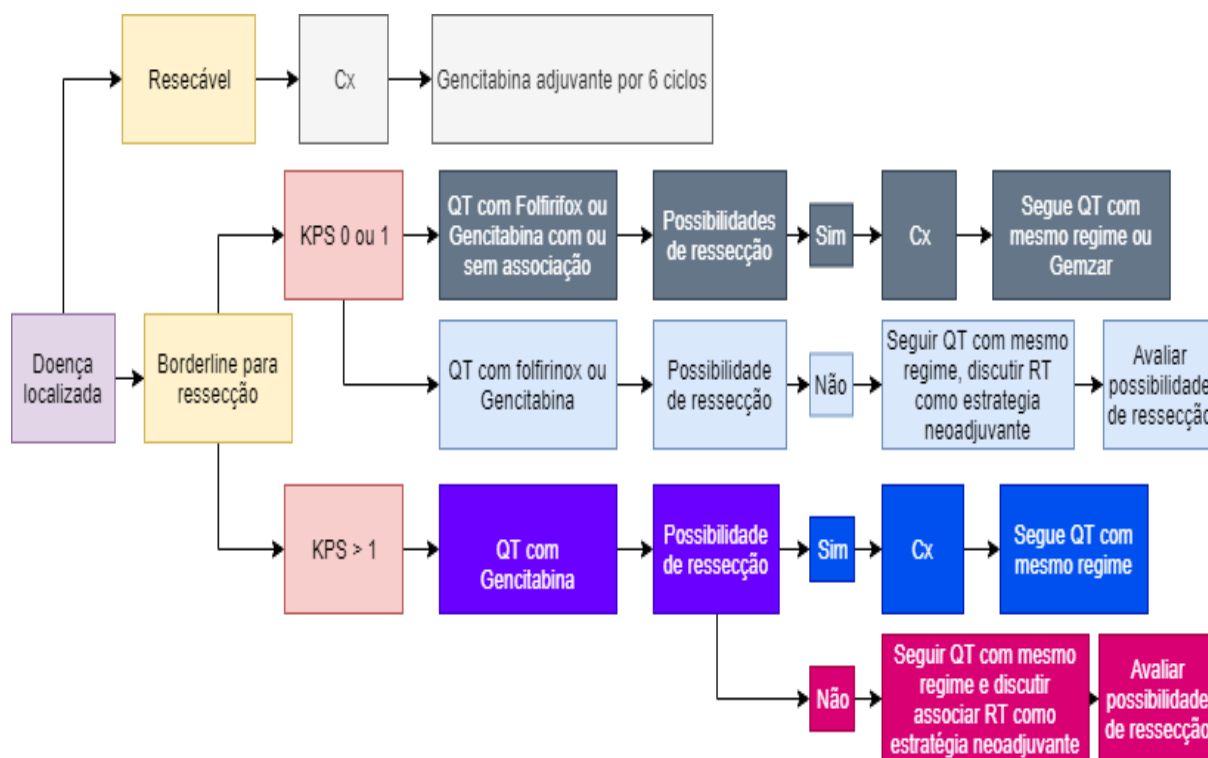
Ainda existem questões abertas que precisam ser resolvidas: Qual é o melhor regime de tratamento neoadjuvante? FOLFIRINOX, FOLFIRNOX

modificado, Gencitabina mais nab-Paclitaxel ou outros regimes, mesmo radioquimioterapia? Quantos ciclos de tratamento neoadjuvante devem ser administrados, dois, três, 4? Qual o papel do tratamento pós-operatório após quimioterapia neoadjuvante? (SEUFFERLEIN e ETTRICH 2019).



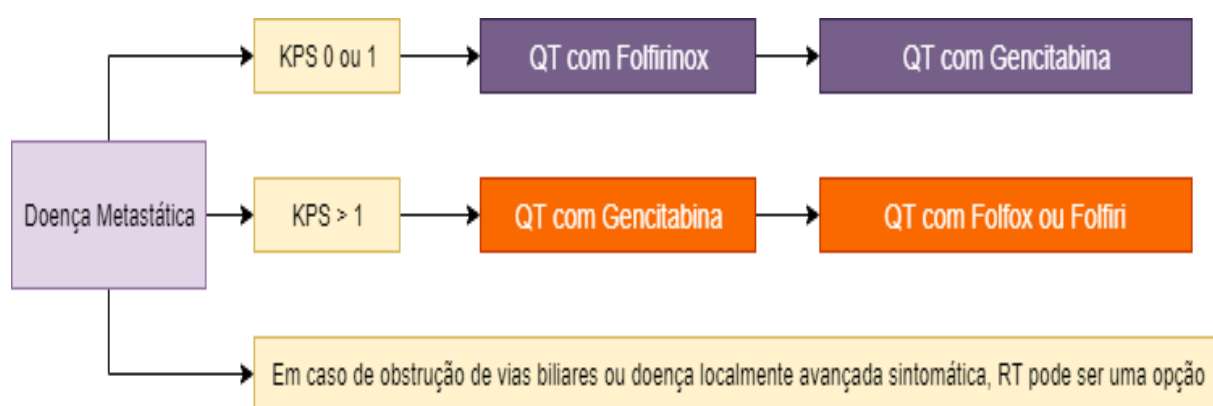
Fonte: Adaptado de FANELLI et al. (2015).

Figura 4 - Avaliação inicial do paciente com câncer de pâncreas.



Fonte: Adaptado de FANELLI et al. (2015).

Figura 5 - Avaliação terapêutica do paciente com câncer de pâncreas localizado.



Fonte: Adaptado de FANELLI et al. (2015).

Figura 6 - Avaliação terapêutica do paciente com câncer de pâncreas metastático.

Certamente a cirurgia é a única opção de tratamento potencialmente curativa disponível para o adenocarcinoma ductal pancreático. No entanto, devido à natureza silenciosa da doença e, conseqüentemente, diagnóstico tardio, apenas 10-15% são considerados como ressecáveis no momento do diagnóstico. A SG mediana do câncer de pâncreas após a cirurgia com cura é de 17 a 23 meses, enquanto os pacientes com câncer de pâncreas localmente avançado têm uma SG média de 8 a 14 meses e os pacientes com doença metastática têm uma SG média de 4 a 6 meses (ÅKERBERG et al. 2017).

1.3 ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÂNCREAS

O PDAC se desenvolve progressivamente a partir de lesões precursoras e pré-malignas, como neoplasia mucinosa papilar intraductal e neoplasia intra-epitelial pancreática. As alterações moleculares no KRAS, p16 e p53 revelaram alguma compreensão dessa progressão, mas grande parte de seu comportamento biológico e tempo para progressão permanecem desconhecidos. Não é apenas desafiador detectar componentes invasivos em IPMN e PanIN pré-existentes, mas também é difícil diferenciar PDAC de lesões benignas do pâncreas (ZHENG et al. 2018).

Embora as opções terapêuticas para gerenciar CPLA sejam controversas, esquematicamente, aconselha-se utilizar radiação como terapia principal, concentrando-se na massa tumoral primária. O uso de

quimioterapia de indução seguida de quimiorradiação de consolidação para pacientes sem evidência de progressão distante é uma estratégia terapêutica promissora, e o teste internacional de fase III - LAP 07 foi projetado para avaliar prospectivamente sua relevância (BIDARD et al. 2013).

Hoje em dia, o câncer de pâncreas (PC) tem uma taxa de mortalidade de quase 98% em todo o mundo e a sobrevida global em pacientes com PC está entre as piores nos tumores sólidos (XIE, et al. 2016).

No cenário atual de acompanhamento e tratamento do câncer, onde a personalização do tratamento poderia contribuir para um melhor prognóstico destes pacientes, a utilização de biomarcadores que possibilitem análises com finalidades diagnósticas, prognósticas e preditivas torna-se necessária.

1.4 BIÓPSIA

Biópsia constitui a remoção de células ou tecidos para exame por um patologista para estudar o tecido sob um microscópio ou realizar outros testes. Existem diferentes procedimentos de biópsia, os tipos mais comuns incluem a biópsia incisional, na que uma amostra de tecido é removida; a biópsia excisional, na que todo um nódulo ou área suspeita é removida; e a biópsia da agulha, na qual uma amostra de tecido ou fluido é removida com uma agulha. Quando uma agulha larga é usada, o procedimento é chamado de biópsia do núcleo. Quando uma agulha fina é usada, o procedimento é chamado de biópsia de aspiração por agulha fina (NCI 2011).

Consequentemente, a identificação no tecido tumoral de biomarcadores preditivos de resposta a tratamentos direcionados agora é obrigatória para o atendimento ideal ao paciente, mas enfrenta vários desafios biológicos e tecnológicos. Primeiro, a caracterização abrangente de várias amostras de tumores obtidas do mesmo paciente ilustrou que existe heterogeneidade intra-tumoral entre diferentes regiões do mesmo tumor, Além disso, as mudanças dinâmicas do tumor ao longo do tempo com o surgimento de subclones resistentes ao tratamento que estavam presentes em menor frequência no tumor primário. Assim, a heterogeneidade inter e intra-tumoral é um desafio na decisão clínica em oncologia, pois as biópsias podem ser imprecisas na captura da paisagem genômica completa. Também a limitação na acessibilidade do tumor, a taxa de complicações clínicas associadas aos procedimentos invasivos para obter tecido no diagnóstico inicial e durante o curso do tratamento da doença. As complicações próprias da doença e debilidade dos pacientes avançados, limitam o uso de incômodos procedimentos de biópsia intervencionista, além da disponibilidade de uma quantidade adequada de tecido, à pouca quantidade de tecido por paciente (ILIÉ e HOFMAN 2016a).

É de ressaltar que os resultados das biópsias líquidas não substituirão fundamentalmente as biópsias de tecidos, mas serão uma ferramenta adicional essencial. Sempre haverá um papel na biópsia de tecidos, pois fornece informações sobre morfologia (incluindo o microambiente), tipo de tumor e possível local de origem. Mais provavelmente, a biópsia líquida será usada quando o tecido do tumor for de qualidade ou quantidade insuficiente

para permitir uma ampla variedade de testes. Provavelmente, o papel mais importante para a análise de biópsias líquidas ocorrerá para o monitoramento serial em tempo real da progressão em tratamento (ILIÉ e HOFMAN 2016b).

1.5 BIÓPSIA LÍQUIDA

A biópsia líquida fornece uma variedade de componentes clinicamente informativos (MANSILLA et al. 2018). As amostras de sangue podem ser analisadas quanto a células tumorais circulantes (CTCs), ácidos nucleicos livres de células, exossomos e plaquetas educadas pelo tumor (TEPs), com cada uma delas fornecendo informações moleculares valiosas sobre o genoma, transcriptoma e/ou proteoma (MADER e PANTEL 2017). Isso determinaria o tratamento mais apropriado em cada caso, individualizando as terapias direcionadas aos pacientes e, assim, eliminando ou reduzindo em grande parte a toxicidade lateral dos tratamentos e aumentando a eficácia do tratamento administrado e, assim, a superação do paciente (MANSILLA et al. 2018).

Portanto, a biópsia líquida é a alternativa às biópsias convencionais para a avaliação tumoral por sua facilidade na coleta da amostra. Uma das principais aplicações é a enumeração de CTCs para avaliar a progressão do tumor ou a resposta ao tratamento. A análise das características funcionais das CTCs pode fornecer muito mais informações sobre o tumor, a fim de estabelecer um tratamento mais personalizado para os pacientes. A principal

questão que precisa ser resolvida é o isolamento da população das CTCs. Vários protocolos foram desenvolvidos, mas nenhum deles demonstrou ser o definitivo. De fato, uma combinação dessas técnicas tem sido frequentemente realizada para obter uma população mais pura e viável de CTCs (MANSILLA et al. 2018).

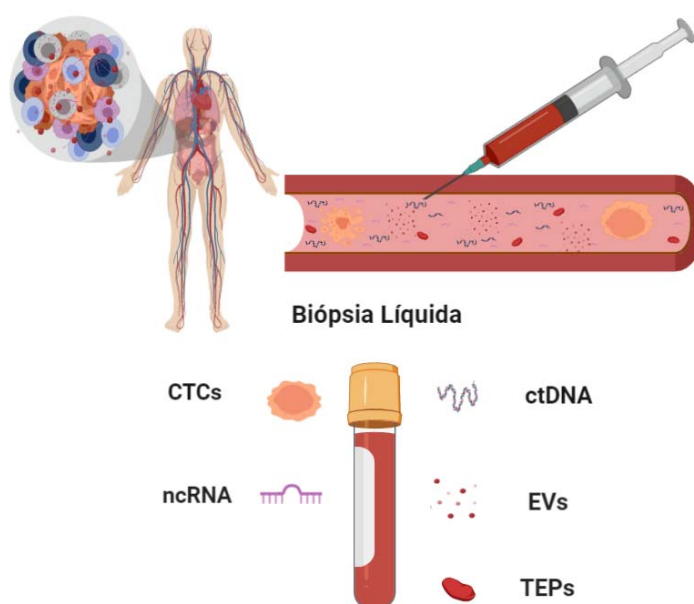


Figura 7 - Biópsia Líquida. Esta compreende todos os elementos derivados do tumor que circulam na corrente sanguínea que podem ser usados, direta ou indiretamente, como fonte de biomarcadores de câncer. Inclui proteínas tumorais circulantes, DNA tumoral circulante, células tumorais circulantes, vesículas extracelulares derivadas de tumores e seus constituintes, RNAs de tumores circulantes e plaquetas educadas por tumores.

1.6 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

As CTCs foram descritas pela primeira vez em meados do século 19 pelo patologista australiano Ashworth, que descobriu células semelhantes às do tumor no sangue de um paciente após a morte. As CTCs são células que

conseguiram extravasar do tumor para a circulação e podem potencialmente invadir tecidos distantes para formar metástases evidentes. Uma análise profunda dessas células iniciadoras de metástases pode ajudar a decifrar os processos moleculares da cascata metastática. Um passo crucial para o intravasamento e a sobrevivência na corrente sanguínea de uma célula é obter plasticidade e motilidade, o que envolve o processo de transição epitélio-mesênquima (TEM). Durante o TEM, a molécula de adesão de células epiteliais (EpCAM) pode ser regulada de forma negativa. Como é amplamente utilizado como marcador para enriquecer CTCs, são necessárias técnicas que também capturem com precisão a fração mesenquimal de CTCs (MADER e PANTEL 2017).

Se bem que as CTCs demonstraram ser marcadores prognósticos úteis em muitos tipos de câncer, diferentes métodos de detecção de CTCs revelaram a diversidade fenotípica destas e como podem representar o complemento de células encontradas em um tumor (THIELE et al. 2019).

Realmente, a detecção e caracterização molecular de CTCs é uma área muito ativa da pesquisa translacional do câncer, mais de 400 estudos clínicos nos EUA envolvem as CTCs como biomarcador. Os objetivos da pesquisa em CTCs incluem o risco de recidiva metastática ou progressão metastática (prognóstico), estratificação e monitoramento em tempo real de terapias, identificação de alvos terapêuticos e mecanismos de resistência e compreender o desenvolvimento de metástases em pacientes com câncer (ALIX-PANABIÈRES e PIERGA 2014).

1.7 MICROÊMBOLO TUMORAL CIRCULANTE

Enquanto a maioria das CTCs são células únicas, uma pequena fração viaja como grupos de células (ACETO et al. 2015). Um microêmbolo tumoral circulante (MTC) é definido como um aglomerado ou grupos de CTCs contendo três ou mais núcleos distintos, isto para evitar a designação falsa de um CTC mitótico como MTC (HOU et al. 2012).

Ainda mais, estes aglomerados de células são mantidas conectadas por junções intercelulares. Embora estes grupos celulares sejam menos prevalentes, os *clusters* de CTCs parecem ter maior potencial metastático do que as CTCs individuais na circulação. Ambos podem apresentar mudanças na expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais, que podem mostrar alterações dinâmicas durante a progressão do câncer (ACETO et al. 2015).

Igualmente, o MTC pode circular como aglomerados só de CTCs ou em conjunto com outros tipos celulares não malignos como os glóbulos brancos (SZCZERBA et al. 2019).

1.8 BIOLOGIA DAS CTCs

A taxa de liberação de células tumorais em pacientes com câncer é desconhecida; modelos experimentais revelam a disseminação consecutiva de milhões de células tumorais por todo o corpo (JOOSSE et al. 2015). Seu tempo na corrente sanguínea é de 1 a 2,4 horas (ALIX-PANABIÈRES e PANTEL 2016), mas poucas células atingem um órgão distante, devido ao

sistema imunológico, sobrevivência em senescência, perfil metastático e microambiente de proliferação. As CTCs metastáticas requerem características especiais intrínsecas e extrínsecas. As CTCs podem interromper a divisão celular após a disseminação nos tecidos; essa senescência pode durar mais de 10 anos (JOOSSE et al. 2015).

Indubitavelmente, a disseminação inclui estágios iniciais da cascata invasão-metástase, permitindo que os células tumorais deixem o local primário e naveguem para tecidos distantes. Uma é a chamada transição epitélio-mesênquima, um processo naturalmente realizado em embriogênese, cicatrização de tecidos epiteliais e utilizado por células de carcinoma que perdem propriedades epiteliais e adquirem propriedades mesenquimais (LAMBERT et al. 2017).

Provavelmente, essa transição dinâmica e reversível estimula a invasão, a perda de proteínas de adesão célula-célula, como a E-caderina, em detrimento da polaridade apical-basal (KANG e PANTEL 2013). A TEM pode ser desencadeada pela sinalização parácrina do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), via Wnt, fatores de crescimento derivados de plaquetas, interleucina-6 (IL-6), mas também induzida por nicotina, álcool e luz ultravioleta. Esses ativam fatores de transcrição, como o fator básico de hélice-loop-hélice (TWIST) e a homeobox de ligação à caixa E de zinco (ZEB), que mantêm o fenótipo mesenquimal por sinalização autócrina. Devido à deterioração das junções estreitas e aderentes e às variações do citoesqueleto, os marcadores epiteliais como EpCAM e E-caderina são regulados negativamente, a expressão da queratina é alterada e ocorre a

regulação positiva dos marcadores mesenquimais, como a vimentina (JOOSSE et al. 2015).

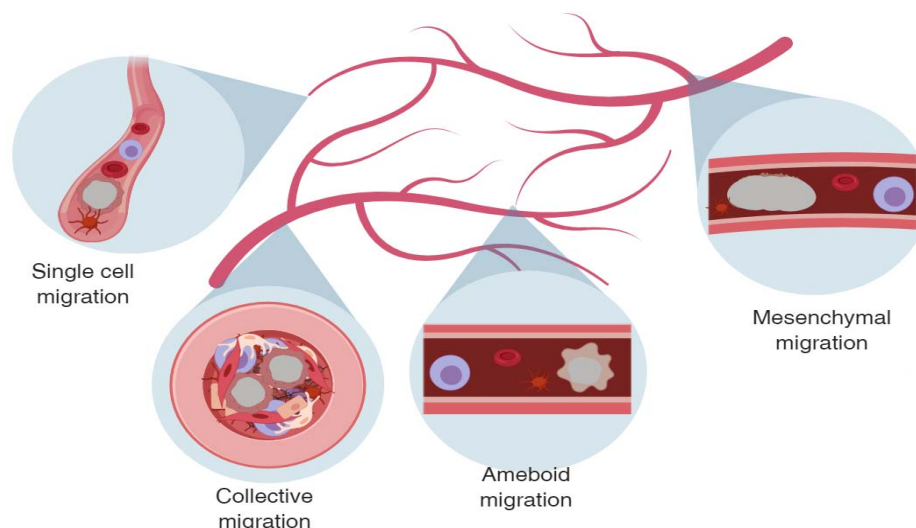


Figura 8 - Tipos de migração das CTCs. As CTCs podem viajar na corrente sanguínea como Microêmbolo Tumoral Circulante ou como célula única. Nesta viagem elas podem adquirir dois tipos morfológicos, ou ameboide ou mesenquimal.

1.8.1 Intravasação e interação de CTCs no sangue

As CTCs são vulneráveis a uma agressão imunológica, especialmente por células NK. Contudo, interações entre CTCs e outros tipos de células na circulação podem facilitar sua passagem e extravasamento em locais distantes, especialmente com plaquetas, neutrófilos, monócitos/macrófagos e células endoteliais (CE) (LAMBERT et al. 2017).

Além da interrupção das junções endoteliais, a perda de células endoteliais nos vasos tumorais, sugere que este mecanismo facilita o intravasamento das CTCs e remove a necessidade estrita de migração transendotelial. Achados em amostras de biópsia de pacientes demonstraram

que em diferentes lugares do tumor o revestimento endotelial está completamente ausente, ou substituído por células tumorais por vasculogênese tumoral (mimetismo vascular). O mimetismo vascular poderia melhorar a perfusão tumoral, promovendo o crescimento do tumor, e estaria associado à formação de metástases distantes. No entanto, a ruptura endotelial sugere que ocorre intravasamento em massa ou em alta taxa de células tumorais (KATT et al. 2018).

Quadro 3 - Interação das CTCs com células do sistema imune e seus efeitos.

Células	Efeitos	Referência
Células supressoras mieloides	Inibição de células T e incremento da proliferação de CTCs	(HSU et al. 2019)
Linfócitos	Expressão PD-1 e PD-L1 em CTCs e supressão de células T citotóxicas.	(KOTSAKIS et al. 2019)
Neutrófilos	Estimulam a interação das CTCs com células endoteliais facilitando a migração transendotelial.	(MCDOWELL e QUAIL 2019)
	<i>Neutrophil extracellular traps</i> (NETs) incitam a proliferação das CTCs e evasão do sistema imune.	(ALBRENGUES et al. 2018)
Macrófagos	Incrementam a supressão imune e invasão.	(SUAREZ-CARMONA et al. 2017)
	Promovem a fusão celular e proteção contra o sistema imune (detecção)	(BRONCY e PATERLINI-BRÉCHOT 2018)
Plaquetas	Formação de <i>tumor-educated platelets</i> (TEPs).	(BEST et al. 2018)
	Modulação de células endoteliais e aprendizado de extravasação das CTCs.	(KELLER e PANTEL 2019)
	Estimulam a Transição Epitélio-Mesênquima em CTCs.	(WANG et al. 2018)
	Supressão de células NK citolíticas.	(SADALLAH et al. 2016)

1.9 ANÁLISES DE CTCs

As análises funcionais em CTCs possibilitam conhecer e identificar propriedades biológicas das células que iniciam a metástase. Cronologicamente, numerosos estudos mostraram que a contagem de CTCs tem valor prognóstico em várias entidades tumorais (PANTEL e ALIX-

PANABIERES 2016).

Por outro lado, diferentes estratégias são utilizadas para detecção de CTCs, incluindo características morfológicas e físicas, como tamanho e peso, ou detecção da expressão de marcadores específicos. Os carcinomas são de origem epitelial, nestes as CTCs podem ser identificadas com base na expressão de marcadores de linhagem epitelial, como citoqueratinas ou EpCAM, mas também se encontram CTCs com marcadores mesenquimais como a Vimentina em sarcomas (DOMINGOS CHINEN et al. 2014).

Ainda, a maioria dos estudos focam-se com câncer de mama, colo, próstata, pulmão, epiteliais em especial. Então a captura e análise de CTCs já são conhecidas como “biópsias líquidas”. Devido à raridade das CTCs, geralmente são necessárias etapas de enriquecimento para aumentar a taxa de detecção, as mais frequentes abarcam técnicas imunomagnéticas ou de imunoseparação. Tipicamente, um anticorpo específico de EpCAM conjugado com partículas magnéticas e as células epiteliais marcadas com o anticorpos separadas num campo magnético. As células selecionadas são posteriormente identificadas e caracterizadas (MEGO et al. 2010).

Em síntese, as Células Tumorais Circulantes (CTCs) constituem população celular muito heterogênea, incluindo CTCs com marcadores epiteliais, com marcadores mesenquimais e CTCs com os dois tipos de marcadores (CHINEN et al. 2013).

1.10 ENRIQUECIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CTCs

São distinguidas muitas técnicas para detecção de CTCs, os métodos de enriquecimento e detecção da CTC foram classificados nas propriedades físicas das células como o tamanho/deformabilidade, densidade e carga elétrica ou propriedades biológicas como os marcadores proteicos *ex vivo* e *in vivo* (ALIX-PANABIÈRES e PANTEL 2014).

Até mesmo, as estratégias de enriquecimento para CTCs podem ser separadas em técnicas dependentes de marcação e independentes de marcação. Entre as técnicas dependentes de marcadores, os ensaios baseados em imunomagnetismo visando a proteína EpCAM são os mais comumente aplicados. Os métodos de enriquecimento independentes de marcação incluem abordagens baseadas em tamanho ou densidade. Além disso, a depleção negativa ou a capacidade invasiva das células tumorais podem ser usadas. Uma combinação de diferentes estratégias de enriquecimento também é praticável (JOOSSE et al. 2015).

Até, as propriedades físicas permitem a separação sem marcação, existe a de gradiente de densidade de centrifugação (Ficoll, OncoQuick[™]), no qual uma quantidade de CTCs é perdida (ALIX-PANABIÈRES e PANTEL 2014); também por filtração com filtros especiais, (ISET®, ou o método de isolamento por tamanho de células tumorais, Rarecells, França). Os níveis de CTC detectados pelo ISET® tiveram correlação com os exames de imagem e mostraram MTC, o que é conhecido como um fator de mau prognóstico. De fato, em estudo publicado por nosso grupo, o paciente teve

progressão da doença apenas um mês após a detecção da MTC (CHINEN et al. 2017). É conhecido um novo biochip livre de marcador versátil, usando as diferenças exclusivas em tamanho (maior) e deformabilidade (mais rígida) de células cancerosas de células do sangue (BHAGAT et al. 2011). Além disso, um dispositivo microfluídico combinando fracionamento de múltiplos orifícios e técnica de separação celular dieletrorética (DEP) (MOON et al. 2011); e um dispositivo de fracionamento de campo dieletrorético, permitindo o isolamento de CTCs viáveis por diferentes respostas à DEP devido a diferenças no tamanho e nas propriedades da membrana (GASCOYNE et al. 2009).

Paralelamente, outras metodologias de captar CTCs positivas para EpCAM, foram desenvolvidas, foi descrita uma chamada CTC-chip, com captura microfluídica de CTCs com anticorpos anti-EpCAM para a análise de doentes com tumores sólidos (STOTT et al. 2010a). O chip de espinha de peixe ou "HB-Chip", Tem capacidade de combinar a imunofluorescência com a análise microscópica de luz fornece informações sobre um desafio comum no isolamento de CTCs (STOTT et al. 2010b); também um chip CTC chamado "Ephesia", que usa colunas de contas superparamagnéticas biofuncionalizadas, montadas automaticamente em um canal microfluídico com adaptação magnética (SALIBA et al. 2010); realizaram uma seleção de alto rendimento, enumeração, manipulação eletrocinética e perfil molecular de CTCs de baixa abundância usando um sistema microfluídico (DHARMASIRI et al. 2011).

Ao mesmo tempo, fabricaram um dispositivo de enriquecimento

imunomagnético que isola as células tumorais vivas do sangue, esta purificação de CTCs se realiza usando o *MagSweeper* (POWELL et al. 2012). Através do uso de um substrato nanoestruturado tridimensional (3D) - específico, com um arranjo de silício-nanofio (SiNW) revestido com anticorpos de moléculas de adesão epiteliais (anti-EpCAM) - as CTCs podem ser capturados por “Fly Paper” (WANG et al. 2011); além do anterior, um dispositivo microfluídico do tipo Velcro pode separar os CTCs com uma eficiência que varia de 40 a 70% (HOU et al. 2013).

Igualmente, existe uma plataforma de captura de CTC microfluídica com ênfase na focalização inercial, denominada “CTC-iChip”, que classifica CTCs raras do sangue total em 10^7 células/s. Este isola CTCs usando estratégias dependentes ou independentes dos epítomos da membrana do tumor e, portanto, aplicáveis a praticamente todos os cânceres. Usa combinação de seleção de células hidrodinâmicas baseada em tamanho e seleção imunomagnética (positiva ou negativa) (OZKUMUR et al. 2013).

Ainda existem métodos como enriquecimento de células tumorais circulantes de um grande volume sanguíneo utilizando leucaférese e elutriação e sua recuperação e purezas determinadas por microscopia de fluorescência e PCR em tempo real para caracterização molecular (EIFLER et al. 2011).

1.11 ISET® ISOLAMENTO POR TAMANHO DE CÉLULAS TUMORAIS

O isolamento pelo ISET é amplamente utilizado na detecção de CTCs. As células tumorais são isoladas e retidas por um filtro de membrana devido ao seu tamanho maior, independente da expressão de marcadores. Pesquisadores usaram o dispositivo ISET e demonstraram a maior sensibilidade deste frente ao sistema *CellSearch* na detecção de CTCs de pacientes com câncer. Além disso, o dispositivo ISET revelou uma vantagem significativa frente aos *clusters* de CTCs capturados sobre o sistema *CellSearch*. No entanto, a maioria dos dispositivos ISET atuais são operados por mãos e frequentemente utilizam a coloração por imuno-fluorescência (IF) para identificação. Atualmente, o método de morfologia celular também tem sido amplamente utilizado para identificar CTCs e os critérios citomorfológicos foram propostos por diferentes grupos de pesquisa. O método de coloração pode mostrar a morfologia das células tumorais, apesar de sua heterogeneidade na expressão de marcadores moleculares. A coloração de Wright como um método de coloração da morfologia celular, tem vantagens simples e convenientes de levar apenas alguns minutos. Assim, a utilização do dispositivo ISET combinado com a coloração de Wright mantém o potencial de captura e identificação de uma permanência para CTCs e uma aplicação promissora na prática clínica (CHEN et al. 2017).

1.12 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES EM CARCINOMA DE PÂNCREAS

Diversos estudos sobre CTCs demonstraram que CTCs foram detectados em todos os estágios do PDAC (EFFENBERGER et al. 2018; KULEMANN et al. 2017; LIU et al. 2018). As CTCs raramente são encontrados em indivíduos saudáveis e em níveis significativamente mais baixos em comparação aos pacientes com lesões pancreáticas benignas, pré-cancerosas ou cancerígenas (ZHANG et al. 2018). ANANTHARAMAN et al. (2016) encontraram CTCs em pacientes com câncer de bexiga invasor e metastático muscular, as CTCs foram detectadas em 80% dos pacientes. Acredita-se, que o número de CTCs no sangue esteja correlacionado com o desenvolvimento tumoral, resposta ao tratamento, recorrência do tumor e o prognóstico em tumores sólidos. Apesar disso, o papel no câncer de pâncreas ainda não foi determinado, sendo importante a pesquisa em câncer de pâncreas (QI et al. 2018).

Apesar disso, num estúdio com 24 pacientes com PC, coletaram 8 ml de sangue venoso periférico antes de uma cirurgia indicada. Utilizaram MetaCell® para separação baseada em tamanho. As CTCs foram detectadas em 16 pacientes (66,7%) dos 24 pacientes avaliados. A positividade da CTC não refletiu o estágio da doença, o tamanho do tumor ou o envolvimento linfonodal. A mesma porcentagem de positividade da CTC foi observada nos pacientes metastáticos e não metastáticos (66,7% vs 66,7%) (BOBEK et al. 2014).

No obstante, sangue venoso (VB) foi coletado prospectivamente de 100 pacientes consecutivos pré-tratamento com PDAC. Utilizando o chip NanoVelcro CTC microfluídico, as amostras foram avaliadas quanto à presença e número de CTCs. A análise de mutação KRAS foi usada para comparar os CTCs com o tecido tumoral primário. Encontraram 100% de concordância para o subtipo de mutação KRAS entre tumor primário e CTCs nos cinco pacientes testados. A avaliação dos CTCs como diagnóstico revelou a presença de CTCs em 54/72 pacientes com PDAC confirmado (sensibilidade = 75,0%, especificidade = 96,4%, área sob a curva (AUROC) = 0,867, IC95% = 0,798-0,935 e $P < 0,001$). Além disso, um ponto de corte de ± 3 CTCs em 4 ml VB foi capaz de discriminar entre doença local / regional e metastática (AUROC = 0,885; IC95% = 0,800-0,969; e $P < 0,001$) (ANKENY et al. 2016).

No entanto, amostras de 68 indivíduos (58 pacientes com PDAC 10 doadores saudáveis) foram analisadas; CTCs estavam presentes em pacientes em estágio IA-IV da UICC e nenhum dos controles ($p < 0,001$). Pacientes com >3 CTC/ml exibiram tendência de pior sobrevida mediana geral (OS) do que pacientes com 0,3-3 CTC/ml ($P = 0,12$). Os CTCs refugiam mutações KRAS nos códons 12 e 13. Pacientes com uma mutação *KRAS*^{G12V} apresentaram uma tendência a melhor OS mediana, comparado com pacientes com outras mutações ou nenhuma mutação detectável no KRAS. As mutações do KRAS entre CTCs e o tumor, foram discordantes em 11 dos 26 (42%), enquanto 15 (58%) apresentaram uma mutação correspondente (KULEMANN et al. 2017).

Contudo, uma pesquisa com 21 pacientes detectaram CTCs em mediana de 22 20 e 8 CTCs/8ml de sangue antes do tratamento, no primeiro e segundo acompanhamento, respectivamente. Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa no número de CTCs e da sobrevida livre de progressão nem sobrevida global. Não houve diferença na sobrevida livre de progressão (SLP) e SG entre os marcadores TEM nos grupos com e sem marcadores (GASPARINI-JUNIOR et al. 2019).

De outro modo, GEMENETZIS et al. (2018) descreveram no seu estudo sobre dois subtipos principais de CTCs em pacientes com PDAC, CTCs epiteliais (eCTCs) e CTCs epiteliais/mesenquimais (mCTCs). Os pacientes tratados com quimioterapia neoadjuvante apresentaram CTCs totais significativamente menores (tCTCs, $P = 0,007$), eCTCs ($P = 0,007$) e mCTCs ($P = 0,034$), comparado com os pacientes não tratados elegíveis para ressecção inicial. A ressecção cirúrgica do tumor primário demonstrou uma redução significativa das CTCs em todos os subtipos de células ($P < 0,001$). As CTCs foram os únicos preditores de recorrência dentro de 12 meses após a cirurgia em pacientes quimio-ativos e pós-neoadjuvantes (*odds ratio* de 5,9 a 11,0) (GEMENETZIS et al. 2018).

Se as CTCs demonstraram ser úteis como biomarcadores, poderiam representar uma alternativa menos invasiva para diagnóstico e tratamento, especialmente quando a biópsia é considerada insegura ou inviável KHOJA et al. (2012).

Apesar de que nem todas as CTCs têm a capacidade de formar metástases, estas células com características de resistência e invasão

podem auxiliar na análise de progressão durante o tratamento, possibilitando uma melhor análise pós-terapêutica, assim como alternativas ao tratamento falho, como também para análise de recidiva.

1.13 RELAÇÃO NEUTRÓFILO LINFÓCITO

A resposta inflamatória sistêmica das células cancerígenas está envolvida na progressão do câncer e na transformação maligna. A infiltração dos neutrófilos ao redor do tumor está associada à baixa sobrevida dos pacientes, enquanto a infiltração de linfócitos prediz um melhor prognóstico. Ao mesmo tempo, a infiltração linfocitária nos estágios avançados do câncer de pâncreas é, até certo ponto, menor do que nos estágios iniciais; portanto, a razão neutrófilos/linfócitos (NLR), operação que consiste na resultado de dividir o número total de neutrófilos entre o número total de linfócitos, esta razão elevada pode ser um indicador potencial para o prognóstico do câncer de pâncreas (YANG et al. 2015).

Mesmo assim, a inflamação sistêmica está associada ao prognóstico em tumores sólidos. A NLR é um marcador da resposta imune geral a vários estímulos de estresse (SACDALAN et al. 2018). A NLR no sangue periférico está sendo cada vez mais estudada como um marcador inflamatório sistêmico, principalmente considerando sua avaliação rápida, amplamente disponível e relativamente barata por meio de análises de rotina do hemograma. Demonstrou-se que a NLR é um fator prognóstico independente em vários tumores sólidos, incluindo câncer de pulmão,

colorretal, pancreático, mama, ovário e gástrico. Além disso, tem sido associado à gravidade da doença, hospitalização, desnutrição, recorrências e mortalidade em várias doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e renais (PALIOGIANNIS et al. 2018).

Também, estudos de metanálises que avaliaram a associação entre a proporção NLR e o desfecho de pacientes com câncer de pâncreas, sugeriram um prognóstico ruim dos pacientes e a NLR alta foi associada à baixa sobrevida geral em pacientes com tratamento misto, quimioterapia ou ressecção cirúrgica. Do mesmo modo, a NLR alta foi significativamente correlacionada com metástase tumoral, má diferenciação tumoral, baixo status de desempenho, alto antígeno de carboidratos 199, alta proteína C reativa e baixa albumina e poderia ser um novo marcador de avaliação de sobrevida e ajudar os clínicos a desenvolver estratégias terapêuticas para pacientes com câncer de pâncreas (YANG et al. 2015).

1.14 RELAÇÃO PLAQUETA LINFÓCITO

As respostas inflamatórias dos pacientes podem influenciar amplamente o desenvolvimento e a progressão tumoral. Vários fatores inflamatórios, como fibrinogênio plasmático, NLR, são identificados como indicadores úteis para prever o prognóstico no carcinoma de células renais, câncer de ovário e carcinoma hepatocelular. Recentemente, verificou-se que a razão plaqueta/linfócito no pré-operatório, que também reflete o grau de inflamação sistêmica, está ligada ao prognóstico em pacientes com PC. No

entanto, alguns estudos falharam em encontrar correlação entre razão plaqueta/linfócito (PLR) e prognóstico de câncer de pâncreas (SONG et al. 2017).

Assim, estudos de metanálises de PLR pode ser usada como preditor prognóstico em pacientes com câncer de pâncreas. A alta PLR foi associada ao mau prognóstico, especialmente à SG mais curta. Em contraste, a baixa PLR obviamente estava correlacionada com a SG favorável no câncer de pâncreas (ZHOU et al. 2018).

Entretanto, outra metanálise conclui que um PLR elevado está associado a uma SG desfavorável em pacientes com câncer de pâncreas. O PLR pode ser um biomarcador prognóstico conveniente e econômico do câncer de pâncreas na prática clínica, o que poderia facilitar a seleção da estratégia terapêutica individual para pacientes com câncer de pâncreas (LI et al. 2018b).

Consequentemente, a inflamação relacionada ao câncer pode suprimir a imunidade anti-tumoral, recrutando células imunossupressoras, como células T reguladoras e células supressoras derivadas de mieloides, resultando na progressão do tumor. As plaquetas, como fonte crítica de citocinas, se ligam diretamente aos membros do VEGF, PDGF, FGF e TGF- β , portanto, as plaquetas atuam como um reservatório para fatores de crescimento secretados que regulam a angiogênese tumoral, proliferação celular, migração e metástase. Os linfócitos desempenham um papel crítico na resposta imune anti-tumoral mediada por células. A contagem de linfócitos reflete o grau de responsividade do sistema imunológico do

hospedeiro. Os linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) são importantes células imunes encontradas no tumor e responsáveis pelas respostas imunes anti-tumorais. Além disso, acredita-se que a baixa contagem de linfócitos seja responsável por uma resposta imunológica insuficiente, o que leva a uma sobrevivência inferior em vários cânceres. Tomados em conjunto, a PLR combinada com os efeitos de plaquetas e linfócitos pode prever o prognóstico de pacientes com PC (SONG et al. 2017).

1.15 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA

Setenta e oito por cento dos tecidos do carcinoma pancreático mostram expressão de SNAIL1 e 50% exibem expressão de SNAIL2, enquanto TWIST não está presente (HOTZ et al. 2007). O TGF β induz TEM em células de carcinoma pancreático. A sinalização do TGF β depende dos fatores de transcrição Smad3/Smad4 e Sp1 (MASSAGUE 2000). O HB-EGF induz a expressão de Zeb1, enquanto sua inibição ou a presença de uma forma não processada resulta em MET concomitante com a supressão da expressão de Zeb1 e em sensibilidade aprimorada à apoptose induzida pelo tratamento com gemcitabina/erlotinibe (WANG et al. 2007).

Não obstante, existem diversos estudos que sugerem o possível envolvimento da TEM na metástase, os CTCs que expressam atributos de células-tronco mesenquimais mantêm características para alcançar as etapas iniciais da colonização e a formação de nichos metastáticos. A

localização das CTCs em tecidos e órgãos colonizados, tornando-se células tumorais disseminadas (DTCs) envolve interações com o endotélio e o estabelecimento de um microambiente favorável, um nicho metastático, que sustentará seu desenvolvimento após um possível período de dormência. Embora seja provável que a formação de nichos implique um repertório de atores celulares e moleculares variando de acordo com o contexto, também é claro que uma matriz específica é criada no nicho e que as células hospedeiras, incluindo células imunes e células como os fibroblastos ativados, células-tronco mesenquimais, células endoteliais e demais, são recrutadas e são essenciais para a formação de o nicho (FRANCART et al. 2018).

1.16 METALOPROTEINASE 2 DE MATRIZ (MMP2)

As metaloproteinases de matriz (MMP) são uma família de enzimas proteolíticas que degradam múltiplos componentes da matriz extracelular, entre estes da membrana basal dos vasos. Um grande número de evidências experimentais e clínicas implicaram as MMP na invasão tumoral, neoangiogênese e metástase, e, portanto, representam alvos farmacológicos ideais para a terapia do câncer (WINER et al. 2018).

Reconhece-se que a MMP2 (gelatinase A) decompõe colágeno tipo IV, gelatina, elastina, proteoglicanos e outros compostos colágenos da MEC. É regulada em muitos tipos de câncer, como glioblastomas, melanomas, câncer de mama e câncer de cólon. A MMP2 desempenha um papel vital na

angiogênese e é superexpressa em condições hipóxicas. Sabe-se que a expressão de MMP2 em tumores promove invasão e metástase que se correlaciona com o pior prognóstico e comportamento agressivo associado a esses tumores. Além disso, a inibição da MMP2 demonstrou causar radiosensibilização, uma diminuição no crescimento e invasividade do tumor. No total, essas evidências identificam a MMP2 como um alvo interessante para o desenvolvimento de abordagens diagnósticas e terapêuticas. A imagem MMP2 pode ajudar na detecção de tumores agressivos, pode servir como marcador substituto de invasão ou como biomarcador para a seleção de pacientes em ensaios com inibidores de MMPs (PANTH et al. 2016).

Assim também, as MMPs estão envolvidas em muitos processos fisiológicos e patológicos. Algumas investigações clínicas sugeriram que essas enzimas também podem ter um papel potencial na patogênese da pancreatite crônica. Comprovou-se que a progressão tumoral, requer a quebra da Matriz Extracelular (MEC). A metaloproteinase 2 da matriz (MMP-2) degrada o colágeno tipo IV, assim esta gelatinase junto com outras gelatinase - metaloproteinase 9 da matriz (MMP-9) desempenha o papel mais importante na invasão, migração e metástase de células neoplásicas. Além disso, essa enzima promove a clivagem das proteínas da MEC e é intensamente expressa nos componentes tumorais e estromais de muitas doenças malignas, incluindo a PC. A degradação da MEC via MMPs é regulada em vários níveis, incluindo inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). O desequilíbrio entre essas enzimas

proteolíticas e seus inibidores teciduais leva à degradação excessiva da ECM, facilitando a disseminação de células cancerígenas e a neoangiogênese. Estudos com imuno-histoquímica manifestou que a expressão de MMP-2 era significativamente maior no tecido PC em comparação com tecidos não tumorais. Além disso, a superexpressão de MMP-2 no tecido PC correlacionou-se positivamente com níveis séricos de CA19-9 no pré-operatório mais altos, estágio avançado, baixo grau histológico, metástase linfonodal, invasão perineural e metástase distante. A atividade enzimática da MMP-2 também foi determinada em todas as amostras de tecido de PC, o que foi confirmado por análise zimográfica (ŁUKASZEWICZ-ZAJĄC et al. 2019).

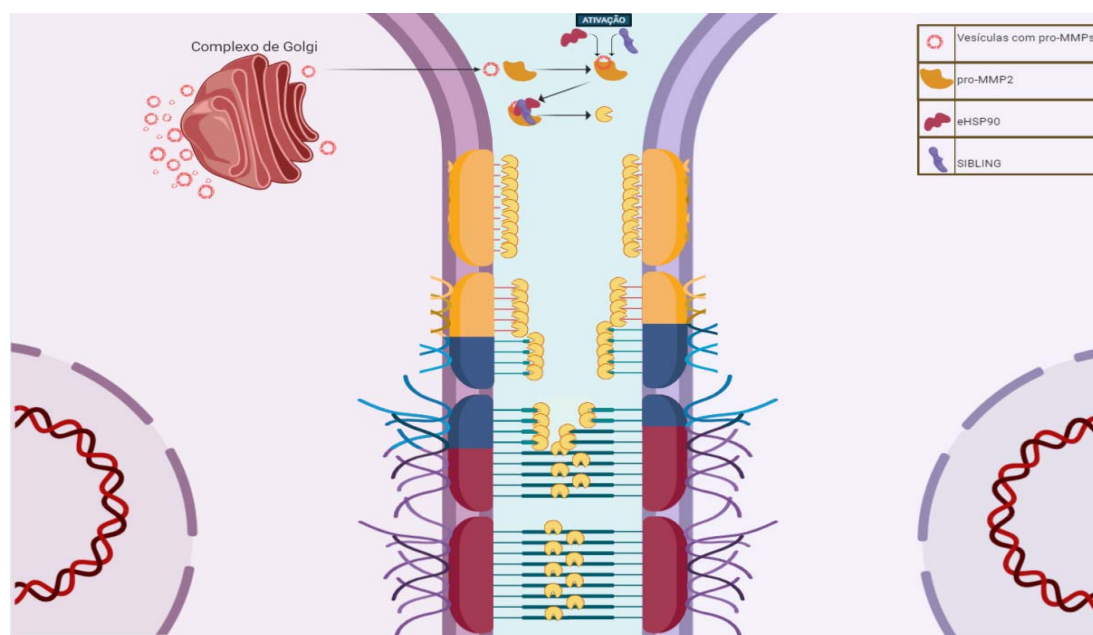


Figura 9 - Metalloproteinase de matriz 2. O papel da metaloproteinase 2 de matriz na invasão de células cancerígenas. O Pro-MMP2 é transportado através das vesículas secretoras da rede de Golgi para a membrana plasmática. Sua ativação ocorre extracelularmente através de sua interação com eHSP90 e SIBLING que consequentemente ligam a MMP2 ativa.

1.17 FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA RECEPTOR 1 (TGF β -RI)

O fator de crescimento transformador- β (TGF- β) desempenha um papel no mau prognóstico. TGF- β é uma citocina com dupla funcionalidade. Nas células normais e na carcinogênese precoce, o TGF- β funciona como um supressor de tumor e induz apoptose. Este efeito é mediado pela ativação da via canônica de Smad via acoplamento do receptor 1 de TGF- β (TGF- β RI). No entanto, durante os estágios posteriores do câncer, o TGF- β se torna um promotor de tumor e estimula a transição, migração e invasão epitelial a mesenquimal, aumentando a metástase. Esse efeito do TGF- β é mediado pela via Erk1 / 2 não-canônica (GROVER et al. 2017).

Acresce que a transição de um fenótipo epitelial séssil para um fenótipo mesenquimal em migração é uma etapa crucial na transformação da migração e invasão de células do câncer pancreático induzidas pelo fator de crescimento β (TGF- β). Essas profundas alterações morfológicas e funcionais estão associadas a alterações características na expressão gênica regulada por TGF- β , definidas pela rápida repressão dos marcadores epeliais e por uma forte e sustentada indução transcripcional de marcadores mesenquimais, como o filamento intermediário vimentina. Neste estudo, analisamos o papel do fator de transcrição Sp1 na regulação de genes induzida por TGF- β e mediada por Smad durante a transição epitelial para mesenquimal (EMT) e migração de células cancerígenas pancreáticas (JUNGERT et al. 2007).

Por tanto, o tratamento prolongado com TGF- β 1 induziu um TEM de três linhas celulares de câncer de pâncreas com uma via de sinalização funcional de TGF- β (PANC-1, IMIM-PC1 e COLO-357), levando a profundas alterações morfológicas. Como este efeito não pôde ser observado em linhas celulares sem Smad4 (IMIM-PC2 e CAPAN-1), uma via funcional de TGF- β parece ser um pré-requisito essencial. A conversão epitelial em fibroblastoide dependeu do tempo e iniciou-se 12 h após uma única aplicação de TGF- β 1, tornou-se máxima após 72 h e foi reversível após a remoção de TGF- β 1 do meio. Foi caracterizada por uma forte regulação negativa dos marcadores de diferenciação epitelial e uma regulação positiva dos marcadores mesenquimais, como a proteína de filamento intermediário vimentina. Efeitos semelhantes de TGF- β na morfologia das células epiteliais foram observados após o tratamento em longo prazo de queratinócitos, bem como em células epiteliais mamárias de camundongos altamente metastáticas. Curiosamente, paralelamente à aquisição de uma morfologia celular em forma de fuso, observamos uma dispersão aumentada de células cancerígenas pancreáticas, que foi acompanhada por um forte aumento da migração e invasão de células tumorais. Estudos apoiam fortemente estudos recentes que mostram que o TGF- β é um forte indutor de invasão e metástase de células tumorais em tumores em estágio avançado. A superexpressão do TGF- β é frequentemente observada em estágios avançados de carcinomas humanos e de camundongos, como o câncer de pâncreas. Estudos também afirmam que em células cancerígenas do pâncreas responsivas, o TGF- β 1 aumentou a expressão e a ativação da

metaloproteinase-2 de matriz e do sistema ativador do plasminogênio da uroquinase, o que poderia contribuir para invasão e metástase aumentadas em tumores pancreáticos. Estes dados sustentam a hipótese de que o TGF- β 1 contribui para a progressão do tumor, induzindo mudanças profundas na diferenciação e função celular. No câncer de pâncreas e em outros modelos de tumor, essa transdiferenciação parece estar associada à mudança de um fenótipo epitelial sésil para um fenótipo mesenquimal migratório (ELLENRIEDER et al. 2001)

Contudo, a operação correta do sistema imunológico em vertebrados requer regulação constante para garantir proteção contra agentes estranhos e tolerância aos auto-antígenos. Para alcançar esse equilíbrio crítico, vários tipos de componentes reguladores agem para impor restrições ao sistema imunológico. Esses componentes incluem tipos de células dedicadas, como células T reguladoras (Treg), que limitam a expansão de células efetoras imunológicas, moléculas de ponto de verificação como CTLA-4 e PD-1, que contrabalançam a sinalização de receptores de antígenos e citocinas imunossupressoras, o mais proeminente dos quais é o fator de crescimento transformador β (TGF- β).

O TGF- β regula a geração e funções efetoras de muitos tipos de células imunológicas. Controla a imunidade adaptativa, promovendo diretamente a expansão das células Treg e inibindo a geração e a função de células T efetoras e células dendríticas apresentadoras de antígenos (DCs). O TGF- β controla similarmente o sistema imunológico inato, inibindo as células natural killer (NK) e regulando o comportamento complexo de

macrófagos e neutrófilos, formando assim uma rede de entradas reguladoras imunes negativas (BATLLE e MASSAGUÉ 2019).

Esses efeitos do TGF- β na regulação imune caem dentro de um papel mais amplo dessa citocina e de outros membros de sua família no desenvolvimento, homeostase e regeneração tecidual. O mau funcionamento dessa via causa defeitos congênitos, doenças fibróticas, desregulação imunológica e câncer. A maioria dos tipos de células de mamíferos adultos responde ao TGF- β com efeitos na proliferação, diferenciação, adesão, movimento, metabolismo, comunicação e morte celular. De particular interesse aqui, o TGF- β funciona como um potente supressor de tumor, induzindo inibição do crescimento e apoptose em células pré-malignas. Mutações que eliminam a via TGF- β ou a desacoplam da apoptose não apenas convertem essas células em um estado maligno, mas também permitem que elas usem o TGF- β para criar um microambiente tumoral imunossupressor e produzir estromas adicionais modificadores que promovem a progressão do tumor e metástase (BATLLE e MASSAGUÉ 2019).

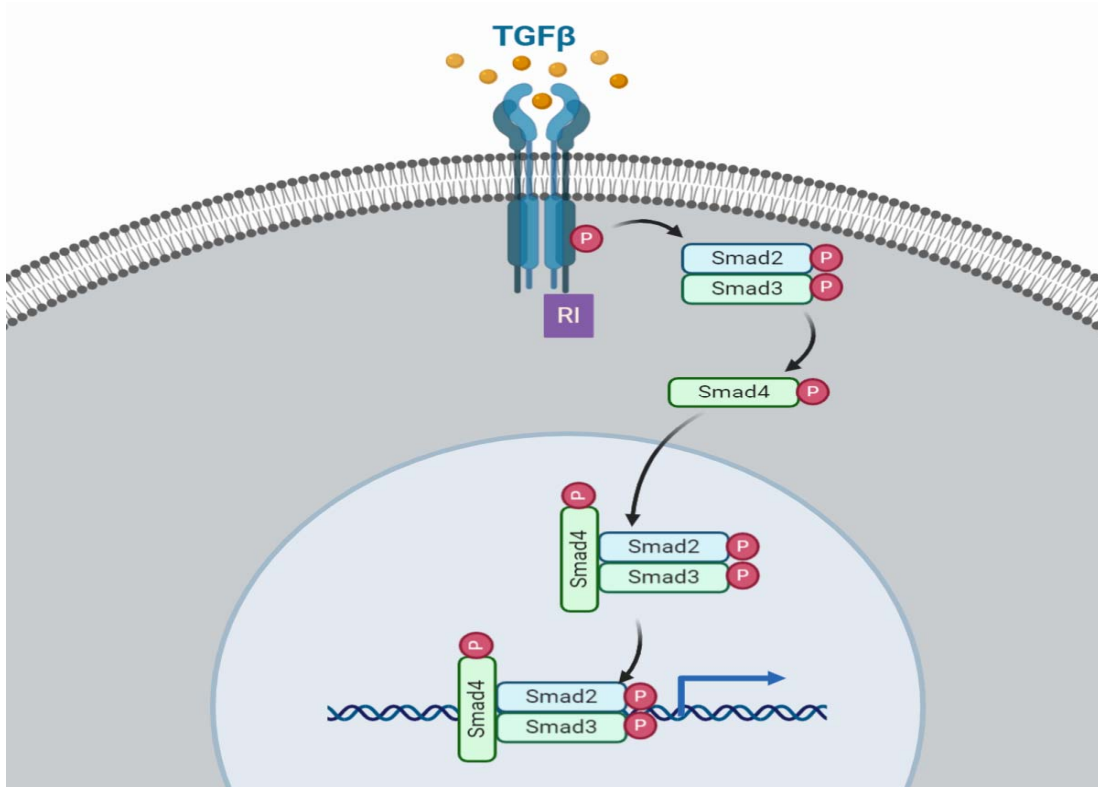


Figura 10 - TGFβ-RI. Apresentação esquemática da via dependente de Smads da sinalização de TGFβ. Os ligantes de TGFβ são sintetizados como um grande complexo de TGFβ latente. O receptor tipo I é recrutado para o complexo. O receptor TGF-beta tipo 1 ativado ativa R-SMADs (SMAD2 e SMAD3) via fosforilação. O SMAD2 e o SMAD3 são redimensionados com um co-SMAD (SMAD4). O trimero SMAD entra no núcleo para ativar a transcrição de genes e promover o crescimento e a sobrevivência das células.

1.18 VIMENTINA

A vimentina, um constituinte principal da família de proteínas com filamentos intermediários (IF), é onipresente em células mesenquimais normais e é conhecida por manter a integridade celular e fornecer resistência contra o estresse. Foi relatada uma expressão aumentada de vimentina em vários cânceres epiteliais, incluindo câncer de próstata, tumores gastrointestinais, tumores do SNC, câncer de mama, melanoma

maligno, câncer de pulmão e outros tipos de câncer. A super-expressão de Vimentina no câncer se correlaciona bem com o aumento do crescimento do tumor, invasão e mau prognóstico; no entanto, o papel da vimentina na progressão do câncer permanece obscuro. Nos últimos anos, a vimentina ganhou muita importância como marcador para a transição epitelial-mesenquimal. Embora a TEM esteja associado a vários eventos tumorigênicos, o papel da vimentina nos eventos subjacentes que mediam esses processos permanece desconhecido (SATELLI e LI 2011).

Bem assim, o citoesqueleto compreende microfilamentos, microtúbulos e proteína IF. A vimentina é a proteína IF mais abundante e desempenha um papel crítico na estabilização da arquitetura intracelular (DOS SANTOS et al. 2015). A vimentina é uma proteína IF de 57 kDa tipo III que é expressa principalmente nos tipos de células mesenquimais, incluindo fibroblastos, células sanguíneas derivadas da medula óssea e células endoteliais. Como principal proteína IF nas células mesenquimais, a vimentina é crítica para várias funções celulares, incluindo adesão, migração e sinalização celular. Mais notavelmente, no câncer, a vimentina é mais frequentemente usada como um marcador dos tipos de células mesenquimais na TEM, um processo crítico para as metástases do câncer (SHARMA et al. 2019).

Da mesma forma, um estudo observou a marcação de células esparsas em 30 adenocarcinomas pancreáticos primários com expressão em 15 metástases hepáticas. A marcação de vimentina foi mais pronunciada nos cânceres pancreáticos amplamente metastáticos em comparação com

os localmente destrutivos. Ao mesmo tempo descobriram que a expressão de vimentina em 34 cânceres pancreáticos estava correlacionada com baixa sobrevida (HANDRA-LUCA et al. 2011).

É reconhecido que as funções da vimentina são influenciadas por vias de sinalização celular, como AKT e STK33, que resultam em fosforilação da vimentina. A fosforilação da vimentina contribui para a desmontagem dos polímeros da vimentina, diminuindo sua função como filamento intermediário e influenciando suas interações proteína-proteína. A vimentina também sofre proteólise pelas caspases quando as células recebem estímulos pró-apoptóticos. Recentemente, a vimentina evoluiu como um marcador da 'transdiferenciação epitelial-mesenquimal' e muitas alterações moleculares foram implicadas nesse processo, incluindo Notch, miR-200 e outras (HANDRA-LUCA et al. 2011).

A presença de células epiteliais de tumor que expressam vimentina em adenocarcinomas pancreáticos ressecados cirurgicamente previu independentemente uma menor sobrevida pós-cirúrgica (HANDRA-LUCA et al. 2011).

Entretanto, uma expressão mais alta de vimentina nas células de câncer de pâncreas pode implicar um estado mais alto de malignidade dessas células, com uma capacidade metastática mais alta associada (ZHOU et al. 2014).

Entanto, um estudo que objetivou determinar se a vimentina na superfície celular poderia ser um biomarcador para isolar CTCs no adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC). A vimentina foi identificada

como altamente expressa na superfície das células tumorais pancreáticas do fenótipo mesenquimal. Vimentina + CTCs foram detectados em 76% dos pacientes com PDAC (76/100) usando CTCs enriquecidas por um ensaio microfluídico. CTCs com vimentina+ foi encontradas em pacientes com PDAC de indivíduos saudáveis. Vimentina+ combinada com CTCs e antígeno de carboidratos 19-9 forneceram potência diagnóstica favorável. As contagens de Vimentin+ e CTCs se correlacionaram com a alteração na carga tumoral para pacientes submetidos à ressecção. Contagens de CTCs significativamente reduzidas foram observadas após quimioterapia em indivíduos que responderam ao tratamento. As contagens mais altas de CTCs no pré-operatório correlacionaram-se à menor sobrevida livre de recorrência. Juntos a vimentina+ CTCs podem ser biomarcadores confiáveis no câncer de pâncreas. O enriquecimento de CTCs mesenquimais complementa a estratégia de captura de CTCs epiteliais, permitindo um exame mais aprofundado da biologia e do significado clínico das CTCs no PDAC (WEI et al. 2019).

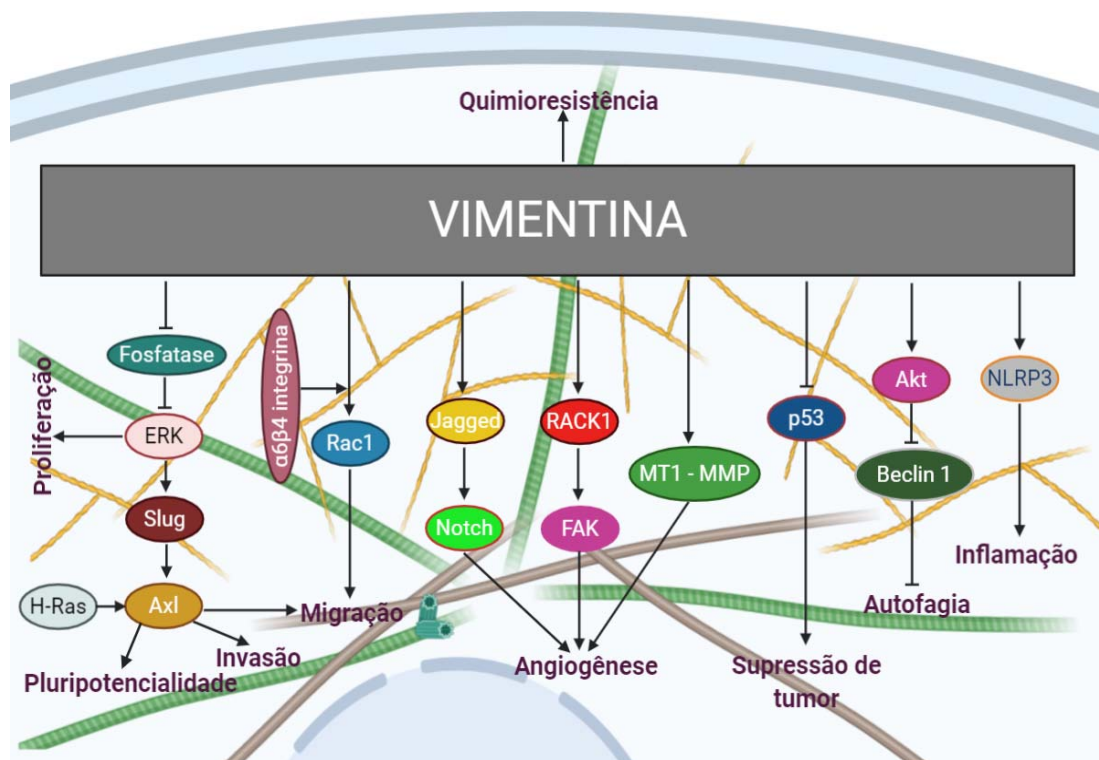


Figura 11 - Vimentina. Fatores a jusante e processos pró-tumorigênicos em roxo regulados pela vimentina. A vimentina é regulada positivamente em células que passaram pela transição epitelial para mesenquimal e promove invasão e migração via ativação das vias de sinalização Erk e Rac1.

1.19 MESOTELINA

A mesotelina (MSLN) é uma proteína ligada à membrana com funções pouco claras. MSLN é fisicamente indetectável na maioria dos tecidos normais, exceto células mesoteliais das cavidades peritoneal e pleural e pericárdio (HE et al. 2017). No entanto, MSLN é expressa em um alto nível em quase todos os mesoteliomas e muitos tumores sólidos, como câncer de pulmão (60-70%), câncer de pâncreas (80-85%), colangiocarcinoma (60-65%), câncer de ovário (60 -65%), câncer gástrico (50-55%), câncer de cólon (40-45%), câncer de mama (25-30%) e câncer de

endométrio (20-25%) (BEATTY et al. 2014; HE et al. 2017; KELLY et al. 2012; ORDÓÑEZ 2003).

Cabe ressaltar que a MSLN está emergindo como um alvo atraente para a imunoterapia do câncer, considerando sua baixa expressão nas células mesoteliais normais e alta expressão em um amplo espectro de tumores sólidos. As imunoterapias direcionadas a MSLN relatadas até o momento suportam um perfil de segurança favorável (MORELLO et al. 2016).

Ainda, um estudo revela que a MSLN desempenha um papel fundamental no controle da transição epitélio-mesênquima e propriedades das células tronco humanas de câncer de pulmão e mesotelioma que controlam sua tumorigenicidade e potencial metastático. Em primeiro lugar, verificaram que a MSLN estava altamente *upregulated* em tecidos de pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células e em linhas celulares de carcinoma do pulmão e mesotelioma. Em segundo lugar, o silenciamento genético de MSLN reduziu significativamente o crescimento de células independentes de ancoragem, formação de esferas tumorais, adesão celular, migração e invasão *in vitro*, bem como a formação de tumores e metástases *in vivo*. Em terceiro lugar, a superexpressão ectópica de MSLN induziu o fenótipo maligno de células não-cancerosas, apoiando o seu papel como um oncogene. Finalmente, estudos mecanísticos revelaram que o *knock down* de MSLN reverteu a TEM e atenuou as propriedades das células estaminais (HE et al. 2017).

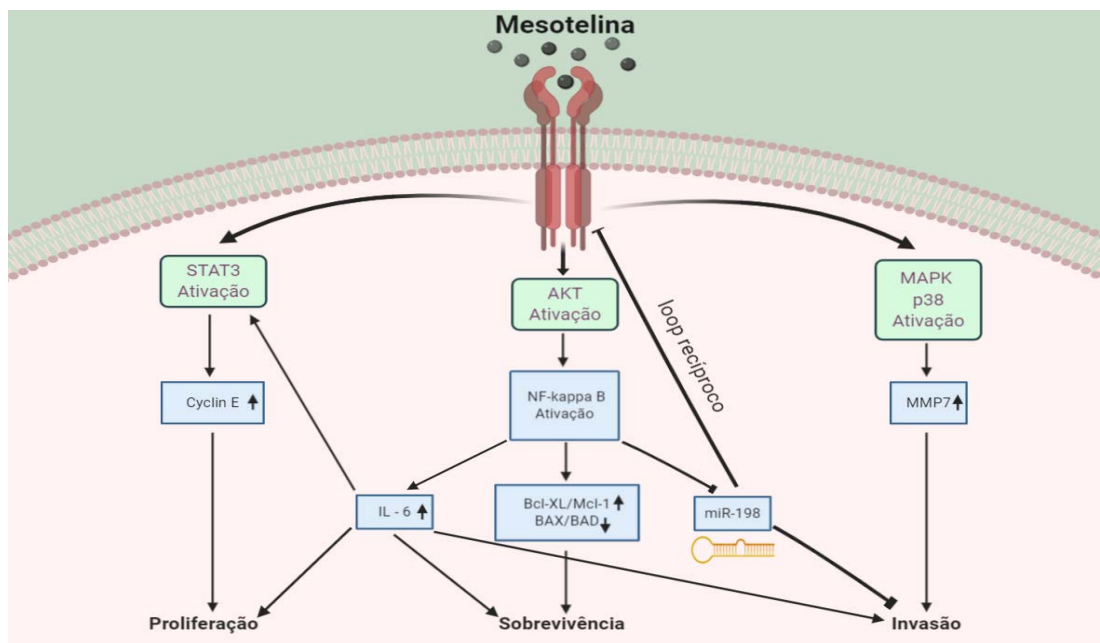


Figura 12 - Mesotelina. A mesotelina desempenha um papel importante na proliferação, sobrevivência e invasão do câncer de pâncreas por diferentes vias. Como fator maligno para o câncer de pâncreas.

1.20 MicroRNAs

Desde sua descoberta acidental em nematóides, os microRNAs (miRNAs) emergiram como principais reguladores dos processos biológicos em animais. Esses pequenos RNAs formam redes complexas que regulam a diferenciação, desenvolvimento e homeostase celular. A desregulação da função do miRNA está associada a um número crescente de doenças humanas, principalmente o câncer. Os miRNAs são RNAs não-codificadores curtos (ncRNAs) de ~22 nucleotídeos que mediam o silenciamento genético, guiando as proteínas *Argonaute* (AGO) para atingir os locais na região 3' não traduzida (UTR) dos mRNAs. Os AGOs constituem uma grande família de proteínas que utilizam ácidos nucleicos pequenos de fita simples como

guias para sequências complementares de RNA ou DNA direcionadas ao silenciamento (GEBERT e MACRAE 2019). O AGO carregado com miRNA forma o módulo de direcionamento do complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC), que promove a repressão da tradução e a degradação dos mRNAs alvo (JONAS e IZAURRALDE 2015).

Além disso, os miRNAs estão envolvidos em praticamente todos os processos celulares e são essenciais para o desenvolvimento animal, diferenciação celular e homeostase; deleções dos fatores fundamentais de biogênese do miRNA Dicer e Drosha são letais em embriões de camundongos. Embora a importância dos miRNAs para o desenvolvimento embrionário esteja bem estabelecida, Drosha e Dicer estão envolvidos em outros processos nucleares, como o *splicing* pré-mRNA, que também pode contribuir para seus fenótipos de deleção. O repositório miRNA miRBase lista 1.917 miRNAs precursores (pré-miRNAs) e 2.654 miRNAs maduros no *Homo sapiens*, e mais de 60% dos genes de codificação de proteínas humanas abrigam locais alvo de miRNA previstos. A desregulação da função do miRNA está associada a inúmeras doenças, principalmente o câncer; os miRNAs podem ser oncogenes (chamados oncomirs) e supressores de tumores, embora a regulação negativa geral da expressão do miRNA seja uma marca registrada do câncer. Alguns miRNAs são marcadores prognósticos ou alvos potenciais para novas terapias contra o câncer. Os miRNAs vegetais, que não são discutidos aqui, diferem consideravelmente dos miRNAs animais em sua evolução, biogênese e função (GEBERT e MACRAE 2019).

Aliás, os miRNAs interagem com o conjunto de moléculas críticas envolvidas na engenharia de TEM, modulando sua expressão e, conseqüentemente, sua função. As moléculas reguladas são muitas e variadas, pois a própria TEM é complexa e inclui proteínas mesenquimais, N-caderina, vimentina, fibronectina, proteínas da junção citoesquelética e aderente, incluindo E-caderina, citoqueratina e ocludina, mas, principalmente, os fatores de transcrição que estão no centro do processo TEM (ABBA et al. 2016).

Igualmente, os miRNAs desempenham papéis cruciais na TEM, como moléculas efetoras dos fatores centrais de transcrição ou como moduladores de sua expressão. A julgar pela quantidade de dados publicados, alguns miRNAs se destacam como indiscutivelmente os principais reguladores da EMT, mais proeminentemente, atualmente, a família miR-200. Isso não compromete de forma alguma a importância dos outros participantes, dado, como sabemos, o tipo de célula e a função associada ao contexto da maioria dos miRNAs (ABBA et al. 2016).

Embora a evidência disponível seja, no momento, circunstancial, os miRNAs podem controlar a dormência modulando a duração da sinalização de TGF- β . Por exemplo, o miRNA miR-23b, que está presente nos exossomos do nicho da medula óssea (BM), funciona como um inibidor da sinalização de TGF- β 1 através da inativação da sinalização de T β R2 / pSMAD3. A superexpressão do miR-23b inibiu a via TGF- β , diminuiu a proliferação nas células de câncer de mama, consistente com a dormência aumentada das células tumorais (PRUNIER et al. 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar CTCs presentes no sangue periférico de pacientes com carcinoma de pâncreas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de proteínas relacionadas à transição epitélio-mesênquima em CTCs provenientes de pacientes com carcinoma de pâncreas e correlacionar estes achados com sobrevida livre de progressão e global;
- Correlacionar os níveis de CTCs e expressão dos miRNAs das CTCs com sobrevidas livre de progressão e global em pacientes com carcinoma de pâncreas.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Este foi um estudo prospectivo longitudinal realizado por meio de coleta de sangue total de pacientes com carcinoma de pâncreas, submetidos a tratamento com quimioterapia, imunoterapia ou terapia alvo.

As amostras de sangue foram coletadas antes do início do tratamento, após 60 e 120 dias, junto à realização de exames de imagem ou até a progressão da doença. Como controle negativo foi utilizado sangue de indivíduos saudáveis e como controle positivo, este mesmo sangue acrescido de células tumorais de pâncreas mantidas em cultura.

O tamanho da amostra analisada foi de 9 pacientes com carcinoma de pâncreas e 7 doadores saudáveis para os experimentos com microRNAs.

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa-CEP do A.C.Camargo Cancer Center (CEP 2388/17) (Anexo 1). As amostras foram coletadas mediante aceitação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Apêndice 1). Os pacientes tiveram aproximadamente 10 ml de sangue em cada visita.

O presente projeto foi financiado pelo Ministério Público: TAC-MP-PAJ nº 00968.2012.10.000/0.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma de pâncreas localmente avançado ou metastático;
- Pacientes com idade maior que 18 anos (idosos também serão incluídos);
- Pacientes submetidos à primeira linha de tratamento;
- Doença metastática confirmada por avaliação patológica e/ou radiológica;
- Extensão da doença determinada por exame clínico e imagem;
- Doença mensurável pelos critérios de RECIST versão 1.1 (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*).

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes submetidos a algum tratamento oncológico prévio.

3.4 AMOSTRAS DE SANGUE

As análises das Células Tumerais Circulantes serão realizadas pelo aluno (José Gabriel Rodríguez Tarazona) e pela pesquisadora envolvida no projeto (Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen).

3.5 ISOLAMENTO DE CTCs E MARCADORES

Para separação das CTCs foi utilizado o método de filtração por tamanho através do dispositivo ISET. Para definir o fenótipo celular em adenocarcinoma de pâncreas, utilizamos 4 marcadores mesenquimais: vimentina, metaloproteinase 2 (MMP2), *Transforming Growth Factor Receptor I* (TGF β -RI) e mesotelina. Para cada anticorpo utilizado neste estudo foi determinada uma concentração específica.

3.5.1 Protocolo para filtração de sangue no ISET

Com este método, filtramos as CTCs do sangue total para posterior análise, no ISET, equipamento com desenho específico para a detecção por filtração por meio de um bloco com uma membrana com poros de 8 μ m na superfície.

Para localizar, contar e caracterizar as CTCs, utilizamos o sistema ISET[®] (*Isolation by size of tumor cells*), este é um método direto para obter as células epiteliais por filtração. O método é baseado na filtração das células sanguíneas previa lises das hemácias, os leucócitos são eliminados por filtração através de uma membrana de polycarbonato com poros calibrados de 8 μ m.

As amostras de sangue periférico do paciente foram coletadas em tubos com EDTA e são diluídas para realizar a lises das hemácias em 1:10 com *ISET Buffer*[™] (RareCells Diagnostics, Paris, França). Após 10 minutos de homogeneizado e incubação, as amostras são depositadas nos poços

cilíndricos do *ISET Block™* (RareCells Diagnostics, Paris, França), que contém em sua base uma membrana de polycarbonato com poros circulares de 8 µm de diâmetro. O equipamento filtra as amostras por aspiração sob vácuo e em seguida, as membranas são lavadas com *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 1X (pH:7,3), retiradas do *ISET Block™* e, quando secas, armazenadas a -20°C. Dos 10 mL de sangue analisados, 6 mL foram destinados à análise citopatológica e 4 mL à análise molecular (submersão da membrana em RNA later e posterior extração de DNA e RNA).

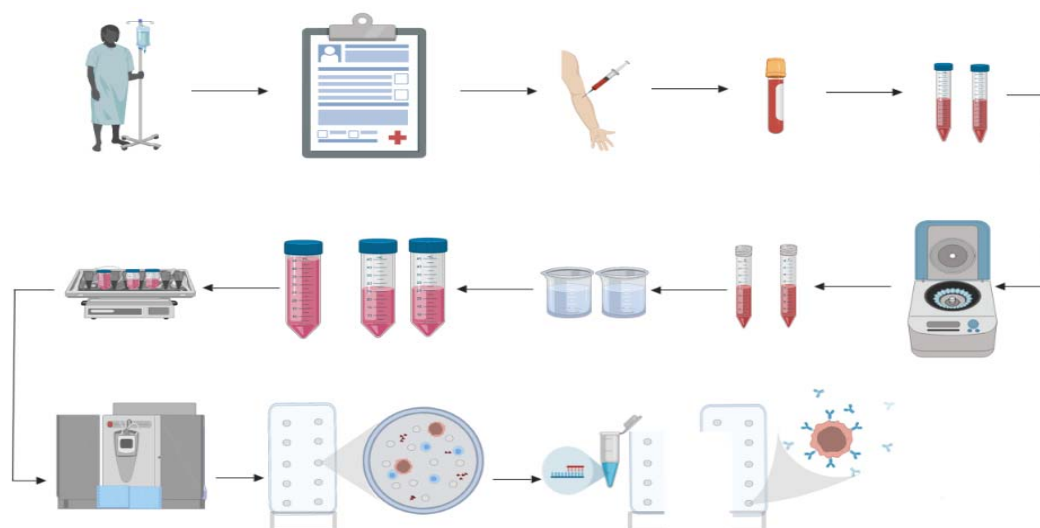


Figura 13 - Esquema do processo de filtração pelo ISET.

3.6 IMUNOCITOQUÍMICA

Para a realização da imunocitoquímica com dupla marcação, será utilizado o Kit GBI LABS *Golden Bridge Internacional*.

Quadro 4 - Descrição detalhada dos anticorpos testados nas CTCs.

Anticorpo	Diluição	Clone	Código	Fabricante	Linhagem para Controle positivo CTC
TGFβ-R1	1/100	Policlonal	CSB-PA061850	Cusabio	A549 - Carcinoma de Pulmão
Mesotelina	1/50	Policlonal	SAB5500143-100UL	Sigma-Aldrich	Hela cells - Câncer de colo do útero
Vimentina	1/100	Policlonal	CSB-PA025857LA01HU	Cusabio	MCF7 - Câncer de mama
MMP2	1/100	Policlonal	CSB-PA06879A0RbHU	Cusabio	U87 - Glioblastoma

3.6.1 Protocolo de Imunocitoquímica

Para confirmar a existência de células nos spots, foi realizada a reação de imunocitoquímica com os marcadores desejados. Os poços das membranas são cortados e colocados em placas de 24 poços. Foi realizada recuperação antigênica adicionando 1 ml de (Dako™ *Target retrieval solution* 1X) de cada poço por aquecimento em recipiente com água destilada em micro-ondas por aproximadamente 6 minutos com intervalos para resfriamento a cada 1 minuto e 40 segundos. Cada spot é hidratado com 160µl de *Tris buffered saline* 1X (TBS 1X, pH: 7,3) por 20 minutos. As células são permeabilizadas com 160 µl de TBS 0.2% + Triton X-100 por 5 minutos na temperatura ambiente. Após uma nova lavagem com TBS, as membranas são incubadas por 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, com peróxido de hidrogênio, e lavadas novamente com TBS. Em seguida o anticorpo primário é aplicado aos spots e incubado *overnight*. As membranas foram lavadas novamente com TBS, incubadas por 30 minutos em Polymer/HRP, lavadas novamente e reveladas pelo cromógeno DAB do mesmo Kit previamente diluído. O DAB é diluído conforme instruções do fabricante. Então as membranas foram lavadas com água destilada. Em

seguida incubadas em DS-RR-Block A por 30 minutos, em seguida incubadas em DS-RR-Block B por 5 minutos, e então lavadas com TBS. Logo, realizada a incubação de 2 horas com o segundo anticorpo primário, lavadas com TBS, e em seguida é realizada uma incubação de 30 minutos com o AP Polymer. O segundo anticorpo é então revelado por Permanent Red previamente diluído de acordo com instruções do fabricante por 10 minutos. Para finalizar, o spot lavado com água destilada e corado com hematoxilina por 2 minutos, lavado novamente com água destilada e aderidos às lâminas para leitura em microscópio de luz utilizando PBS.

As lâminas foram examinadas no microscópio de luz branca, BX61 - Olympus, (Tóquio, Japão) acoplado a câmera digital de alta resolução SC100 - Olympus, (Tóquio, Japão). As CTCs são caracterizadas de acordo com os seguintes critérios: tamanho nuclear igual ou maior que 16 μ m, irregularidade do contorno nuclear, presença de citoplasma visível, alta proporção núcleo-citoplasma ($>0,8$). Quando faltar qualquer dos critérios descritos, as células serão classificadas como atípicas. Os resultados são dados em número de CTCs por mL de sangue, conforme análise estatística realizada por KREBS et al. (2012), contando CTCs em 4 spots da membrana ou mais (KREBS et al. 2012).

Após a análise morfológica, os valores das CTCs foram somados e a média foi calculada. Desta forma, tivemos os cálculos de CTCs em 1 mL de sangue. Ainda, foi incluída na análise a presença e ausência de microêmbolos tumorais circulantes (MEs).

3.7 CONTAGEM DE PLAQUETAS, NEUTRÓFILOS E LINFÓCITOS

Os dados laboratoriais são tomados dos laudos do laboratório Fleury, incluindo o número total de neutrófilos, de linfócitos, contagem de plaquetas, CA 19-9, todos foram obtidos nos mesmos momentos das coletas de CTCs. O laboratório Fleury presta atendimento no A.C.Camargo Cancer Center. Avaliamos o valor prognóstico de NLR e PLR.

3.8 EXTRAÇÃO DE RNA DAS CTCS

A extração de RNA foi realizada utilizando o AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Brevemente, 4 spots da membrana sem formol foram cortados em pequenos fragmentos (aproximadamente 2 mm²) em microtubos de 1,5 mL e as células foram lisadas utilizando o tampão RLT Plus (Qiagen) e vortexadas por 1 minuto. Posteriormente, os passos foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante.

3.9 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DOS RNAS

A concentração de RNA foi mensurada através do espectrofotômetro Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) utilizando 1,5 µl de amostra e verificando a absorbância em 260nm. A razão entre os valores de

absorbância do RNA A260/A280 funciona como seu indicador de pureza, sendo que taxas de RNA de boa qualidade ficam entre 1,8 - 2,0.

3.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS miRNAS

3.10.1 Síntese do cDNA específico

Para avaliar a qualidade do RNA extraído foi realizada a amplificação de um miRNA (U6B) em todas as amostras. A reação de síntese do cDNA específico foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados no manual *TaqMan® MicroRNA Assays* (Applied Biosystems). Foi realizada a pipetagem da quantidade necessária para 10 ng de RNA para todas as amostras e adicionado água q.s.p. 9,16 µl. Para o mix de RT os reagentes foram descongelados e submetidos à centrifugação rápida antes de serem adicionados em tubo tipo eppendorf de 0,5 µl, utilizando-se de capela de fluxo laminar, conforme as quantidades indicadas no Quadro 5.

Quadro 5 - Reagentes e quantidades necessárias para a reação de síntese de cDNA específico.

Mix para reação RT	Volume para uma amostra (µl)
Tampão RT 10x	1,5
Oligonucleotídeo RT Primer 5x	3,0
100mM dNTPs (with dTTP)	0,15
Enzima MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1,0
Inibidor de RNase (20 U/µl)	0,19
Total	5,84

Em seguida foi adicionado em cada tubo contendo 9,16 µl das amostras e água, 5,84 µl de mix para reação RT, incubado 5 min. no gelo e colocado no termociclador seguindo as condições descritas (Quadro 6).

Quadro 6 - Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de síntese de cDNA específico.

Estágio	Temperatura	Tempo
1	16 °C	30 min
2	42 °C	30 min
3	85 °C	5 min
4	4 °C	∞

As amostras de cDNA obtidas foram armazenadas em freezer - 20°C.

3.10.2 Reações de qRT-PCR

Para as reações de qRT-PCR os cDNAs foram descongelados, homogeneizados e colocados no gelo. Para a constituição do mix de PCR, os reagentes também foram descongelados e submetidos à centrifugação rápida. Foram então adicionados em tubo tipo *eppendorf* de 1,5 µl utilizando-se de capela de fluxo laminar, conforme as quantidades indicadas (Quadro 7).

Quadro 7 - Reagentes e quantidades necessárias para a reação de qRT-PCR.

Reagentes	Volume para um Array (placa)
cDNA sample (10x)	-
TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase with UNG 2x	10,0
TaqMan Assay	1,0
Nuclease free-water	7,67
Total	18,67

Em seguida, a placa contendo 96 poços foi montada com a adição de 18,67 µl de Master Mix e 1,33 µl de cDNA, totalizando 20µl em cada poço. Após a selagem e centrifugação da placa, a mesma foi inserida no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) para realização da ciclagem descrita (Quadro 8).

Quadro 8 - Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de qRT-PCR.

Estágio	Temperatura	Tempo
Hold	95 °C	10'
40 ciclos	95 °C	15"
	60 °C	60"

Os resultados das expressões dos miRNAs foram analisados utilizando-se o software SDS 2.3 (Applied Biosystems). Este experimento foi realizado para verificar que a expressão dos microRNAs seja ótima e selecionar as amostras para a avaliação do perfil de microRNAs.

3.11 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE microRNAS

A reação para determinação dos perfis de expressão dos miRNAs foi realizada utilizando-se a metodologia TaqMan® Human MicroRNA Array.

3.11.1 Síntese do cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) total foi realizada de acordo com o protocolo *Megaplex™ Pools for microRNA Expression Analysis* (Applied Biosystems). Foi utilizado o Megaplex RT Primers (Pool A) que consiste em um conjunto predefinido composto por 380 oligonucleotídeos *stem-looped reverse-transcription* que são específicos para a síntese de cDNA a partir de miRNAs maduros. A reação foi preparada conforme a descrição no Quadro 9.

Quadro 9 - Reagentes e quantidades necessárias para a reação de transcriptase reversa.

Mix para reação RT	Volume para uma amostra (µl)
Oligonucleotídeos Megaplex RT (10x)	0.8
dNTPs com dTTP (100mM)	0.2
Enzima MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1.5
Tampão RT 10X	0.8
MgCl ₂ (25mM)	0.9
Inibidor de RNase (20 U/µl)	0.1
Água livre de nucleasse	0.2
Total	4.5

Os reagentes acima foram homogeneizados e foi adicionado 4,5 µl do mix para RT a 3 µl de cada *pool* de amostras (concentração de 150 ng) em

tubo de 0,2 µl. A síntese foi realizada em um termociclador Veriti - 9700 Max Mode (Applied Biosystems) de acordo com a descrição no Quadro 10.

Quadro 10 - Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de transcriptase reversa.

Estágio	Temperatura	Tempo
40 ciclos	16 °C	2 min
	42 °C	1 min
	50 °C	1 seg
Hold	85 °C	5 min
Hold	4 °C	∞

3.11.2 Pré-amplificação do cDNA

Nessa etapa foi realizada a pré-amplificação do cDNA sintetizado, de acordo com a descrição no Quadro 11.

Quadro 11 - Reagentes e quantidades necessárias para a reação de préamplificação do cDNA.

Componentes do Mix para Reação de Pré-Amplificação	Volume para uma amostra (µl)
TaqMan PreAmp Master Mix (2x)	12.5
Oligonucleotídeos Megaplex PreAmp Pool A (10x)	2.5
Água livre de nucleasse	7.5
Total	22.5

Os reagentes do Mix foram homogeneizados e foi adicionado a cada tubo na proporção de 22,5 µl de mix e 2,5 µl de cDNA de cada *pool* de amostras. A reação foi realizada em um termociclador Veriti - 9700 Max Mode (Applied Biosystems), de acordo com a descrição no Quadro 12.

Quadro 12 - Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de pré-amplificação do cDNA total.

Estágio	Temperatura	Tempo
Hold	95 °C	10 min
Hold	55 °C	2 min
Hold	72 °C	2 min
12 ciclos	95 °C	15 seg
	60 °C	4 min
Hold	99,9 °C	10 min
Hold	4 °C	∞

O cDNA total pré-amplificado foi armazenado em freezer-20°C, por no máximo uma semana.

3.11.3 Amplificação dos microRNAs - TAQMAN® LOW DENSITY ARRAY (TLDA)

Nessa etapa ocorreu a amplificação do *pool* de cDNA pré-amplificado. Cada array contém 372 miRNAs e 7 controles. A reação de amplificação foi preparada conforme a descrição no Quadro 13.

Quadro 13 - Reagentes e quantidades necessárias para a amplificação do cDNA total através da placa TLDA.

Reagentes	Volume para uma placa TLDA (µL)
TaqMan Universal PCR Master Mix, sem AmpErase com UNG 2x	450
cDNA pré-amplificado (10x)	9
Água livre de nucleasse	441
Total	900

O mix foi homogeneizado e foi realizado o carregamento dos 8 canais da placa TLDA. Em seguida foi realizada centrifugação à 1200 rpm por 1

minuto, por duas vezes. Após selar a placa, ela foi inserida no equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) para a realização da ciclagem (Quadro 14).

Quadro 14 - Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de amplificação do cDNA total através da placa TLDA.

Estágio	Temperatura	Tempo
Hold	48 °C	30 min
Hold	95 °C	10 min
40 Ciclos	95 °C	15 seg
	60 °C	1 min

Os resultados foram analisados pelo software RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems). O nível de expressão dos miRNAs foi quantificado relativamente à expressão de um miRNA controle e também foi normalizado de acordo com a amostra calibradora. O miRNA utilizado como controle foi o miR-126, selecionado através da ferramenta NormFinder (<https://moma.dk/normfinder-software>), que avalia qual microRNA apresenta a expressão mais estável em um conjunto de amostras. O resultado final (Rq) foi expresso como um aumento ou diminuição da expressão de um miRNA em n-vezes quando comparado ao miRNA controle e a amostra calibradora (*pool* de RNAs provenientes de leucócitos de voluntários saudáveis), da seguinte forma $Rq = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct$ é a diferença entre valor ΔCt das amostras tumorais e amostra calibradora, e o ΔCt é a diferença entre o valor de Ct das amostras tumorais e do miRNA controle.

3.12 ANÁLISES DOS microRNAS

Os miRNAs foram selecionados de acordo com a maior diferença de expressão entre os grupos CTC e Leucócito, avaliada por fold-change ≥ 2 para expressão aumentada e ≤ -2 para expressão diminuída. Para a construção dos boxplot foi utilizado o pacote ggplot2 disponível para o programa R.

A predição de transcritos alvos possivelmente regulados pelos miRNAs selecionados foi feita com o programa miRWalk 3.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) considerando os bancos de dados miRWalk, miRDB, miRanda e Targetscan. Foram selecionados apenas os transcritos alvos identificados pelos quatro bancos de dados.

3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizada uma análise descritiva de cada grupo (aqueles que expressam proteínas de resistência a drogas *versus* aqueles que não expressam), em relação às variáveis clínico-patológicas. Para avaliar diferenças e associações entre grupos, o método do Qui-Quadrado foi utilizado para variáveis categóricas. Para análise da sobrevida livre de progressão e global foi utilizado o método de Kaplan-Meier e a diferença entre as curvas calculada por log-rank. Toda análise estatística foi realizada usando-se o programa SPSS para Windows, versão 15. Os valores de p foram considerados significativos quando $\leq 0,05$.

Para o cálculo de sobrevida global, consideramos o tempo entre a primeira amostragem do paciente até o seu óbito e para sobrevida livre de progressão, consideramos o tempo entre a primeira amostragem do paciente e a progressão objetiva do tumor. O *baseline* (primeira amostragem) das análises de sobrevida neste estudo foi realizado partir da data da primeira coleta de CTCs.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COLETAS DE AMOSTRAS

Realizamos coletas de 10 pacientes com carcinoma de pâncreas antes do procedimento cirúrgico (*baseline*). Contudo, um paciente foi excluído do estudo, porque a análise patológica confirmou que era tumor neuroendócrino. A segunda coleta ou primeiro seguimento foi realizada dois meses depois da primeira coleta; foi realizada 5 pacientes, perdemos 4 pacientes (óbito de um paciente e atraso na chegada do material de coletas, levando à perda de seguimento de 3 pacientes). A terceira coleta (4 meses após a primeira coleta, segundo seguimento) foi realizada em 8 pacientes e o detalhamento de como foram feitas as coletas (*baseline* e seguimento) pode ser visualizado na Figura 10.

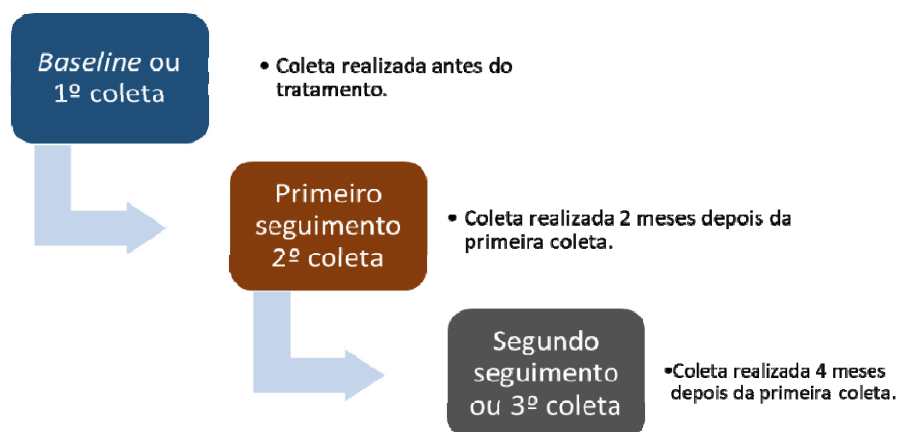


Figura 14 - Fluxograma de descrição cronológica das coletas. Foram 22 coletas de pacientes com câncer de pâncreas, se fizeram 9 coletas pré-tratamento, 5 coletas do primeiro seguimento realizado 2 meses depois, e 8 coletas no segundo seguimento 2 meses depois da anterior coleta.

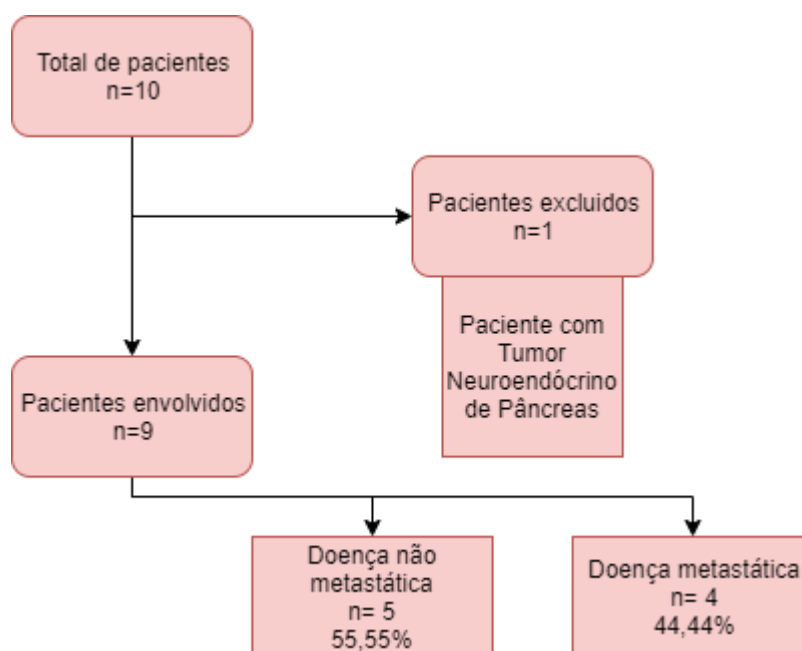


Figura 15 - Fluxograma da classificação dos pacientes. Dos 9 pacientes incluídos no estudo 4 tem doença metastática e 5 são doença não metastática.

4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Amostras de sangue foram coletadas de 9 pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna de pâncreas antes do tratamento no período de 05/2018 até 09/2019. Dos 9 pacientes incluídos, 4 (44,44%) são homens e 5 (55,55%) mulheres, a idade média de 57 anos e mediana de 59,7 anos (42 - 82). Também foram recrutados 7 doadores saudáveis, 6 mulheres e 1 homem, com uma idade mediana de 48 anos, como grupo controle das análises dos experimentos da expressão dos microRNAs.

Em relação ao grau histológico, 6/9 pacientes apresentavam adenocarcinoma ductal (66,66%) 2/9 pacientes (22,22%) adenocarcinoma e em 1/9 o tumor foi classificado como carcinoma, constituindo (11,11%).

Dos 9 pacientes incluídos, 3 (33,33%) progrediram e 6 pacientes continuaram no mesmo estágio da doença no momento do último seguimento. Dos três pacientes que progrediram, dois portavam doença não metastática e uma doença metastática.

Os pacientes que apresentaram progressão tiveram uma distribuição maior de CTCs na primeira coleta (IC) ($p= 0,54$) (Figura 16). Um estudo recente concluiu que a dinâmica das CTCs reflete na progressão da doença e resposta ao tratamento, e fornece informações importantes sobre os resultados clínicos que não estão disponíveis por meio de marcadores tumorais correntes e de imagem (GEMENETZIS et al. 2018).

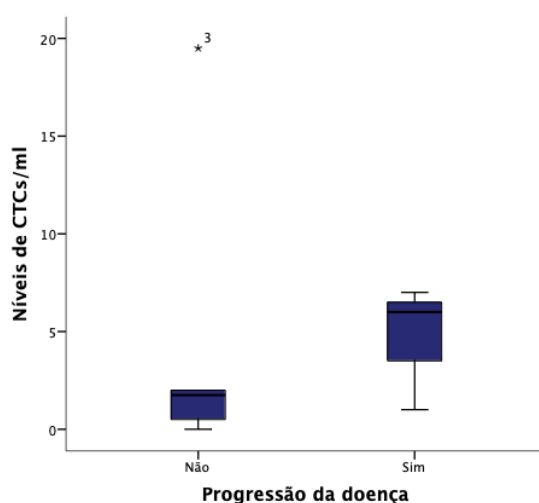


Figura 16 - Distribuição das CTCs na progressão na coleta baseline. Os pacientes com progressão tem maior distribuição de CTCs, porém, sem significância estatística ($p= 0,54$). A distribuição quantitativa das variáveis foi calculada pelo Teste U de Mann-Whitney.

Referente ao estagiamento patológico dos pacientes incluídos neste trabalho, 4 iniciaram no estudo em estágio IV (44,44%), dois em estágio III (22,22%), dois em estágio IB (22,22%) e um paciente em estágio IIB

(11,11%). PORUK et al. (2016) avaliaram 50 pacientes com PDAC com o objetivo de avaliar CTCs com fenótipos epiteliais e mesenquimais como um biomarcador potencial de prognóstico para doentes com adenocarcinoma do pâncreas. Eles estudaram pacientes em estágio I (16%), estágio II (76%) e estágio IV (8%). O estudo conclui que as CTCs existem como populações heterogêneas, e a avaliação delas deve incluir a identificação fenotípica adaptada para caracterizar as células, com base em marcadores epiteliais e mesenquimais. Nosso estudo avaliou quatro marcadores mesenquimais, e nosso foco foi a transição epitélio-mesênquima.

Em relação ao tamanho do tumor (pT), 66,66% (6) dos pacientes são T4, (22,22%) dos pacientes apresentaram-se como T2 (2), e 11,11% (1) do total dos pacientes como T3. Em relação ao acometimento linfonodal (pN), 5 pacientes (55,55%) eram N1 e 4 pacientes (44,44%), N0. Em relação às metástases (pM), 5 pacientes (55,55%) eram M0 e 4 (44,44%) eram M1.

Na estratégia terapêutica estabelecida para os pacientes deste estudo, encontrou-se nos prontuários que 4 pacientes (44,44%) iniciaram tratamento paliativo, três pacientes (33,33%) tratamento neoadjuvante e dois pacientes (22,22%) tratamento curativo.

Tabela 1 - Características clínicas e patológicas dos pacientes do estudo (n=9). Estadiamento TNM de acordo com AJCC.

Variáveis (n)	Nº	%
Número total de pacientes	9	100
Idade ao entrar no estudo, em anos (9)		
Média	57	
Mediana	59,7	
Variação	42-82	
Gênero (9)		
Masculino	4	44,44
Feminino	5	55,55
Grau histológico (9)		
Adenocarcinoma ductal	6	66,66
Adenocarcinoma	2	22,22
Carcinoma	1	11,11
Diagnóstico sítio primário (9)		
Neoplasia maligna de pâncreas	9	100
Metástases no diagnóstico (9)		
Sim	4	44,44
Não	5	55,55
Progressão (9)		
Sim	3	33,33
Não	6	66,66
Tromboses (9)		
Tromboses Venosa Profunda	2	22,22
Dados não disponíveis	2	22,22
Sem Tromboses Venosa Profunda	5	55,55
Tamanho do tumor (pT) (9) Baseline		
T2	2	22,22
T3	1	11,11
T4	6	66,66
Acometimento Linfonodal (pN) (9) Baseline		
N0	4	44,44
N1	5	55,55
Metástases (pM) (9) Baseline		
M0	5	55,55
M1	4	44,44
Estadiamento patológico (9)		
IB	2	22,22
III	2	22,22
IIB	1	11,11
IV	4	44,44
Estratégia Terapêutica (9)		
Neoadjuvância	3	33,33
Paliativo	4	44,44
Curativo	2	22,22

Tabela 2 - Dados dos biomarcadores do estudo, taxa de detecção de CTCs, marcadores em CTCs em todos os momentos do estudo (n= 9).

Variáveis (n)	Nº	%
Biomarcadores		
Nível mediana de CA 19-9 (UI/mL) Baseline	337,9 (3,1 - 41544)	
Nível média de CA 19-9 (UI/mL) Baseline	7841,7 (3,1 - 41544)	
Mediana de NLR Baseline	4 (2 - 15)	
Média de NLR Baseline	5 (2 - 15)	
Mediana de PLR Baseline	165 (78 - 563)	
Média de PLR Baseline	195 (78 - 563)	
Nº da mediana de CTCs/mL		
1ª coleta (avaliadas em 9/9)	2 (0 - 19,5)	
2ª coleta (avaliadas em 5/9)	4,5 (2 - 20)	
3ª coleta (avaliadas em 8/9)	2,75 (0 - 11,5)	
Pacientes com presença de CTCs		
1ª coleta (avaliadas em 9/9)	8	88,88
2ª coleta (avaliadas em 5/9)	5	55,55
3ª coleta (avaliadas em 8/9)	7	77,77
Total Coletas (22)	20	90,90
Pacientes com Células Tumorais Circulantes positivas para MMP2		
1ª coleta (avaliados 9)	7	77,77
2ª coleta (avaliados 5)	4	80
3ª coleta (avaliados 8)	4	50
Pacientes com Células Tumorais Circulantes positivas para MESOTELINA		
1ª coleta (avaliados 9)	2	22,22
2ª coleta (avaliados 5)	1	20
3ª coleta (avaliados 8)	0	0
Pacientes com Células Tumorais Circulantes positivas para VIMENTINA		
1ª coleta (avaliados 9)	3	33,33
2ª coleta (avaliados em 5)	3	60
3ª coleta (avaliados em 8)	2	25
Pacientes com Células Tumorais Circulantes positivas para TGFB-R1		
1ª coleta (avaliados 9)	4	44,44
2ª coleta (avaliados 5)	3	60
3ª coleta (avaliados 8)	1	12,5
Pacientes com Microêmbolos Tumorais Circulantes		
1ª coleta (avaliados 9)	1	11,11
2ª coleta (avaliados 5)	0	0
3ª coleta (avaliados 8)	1	12,5

CA 19-9, antígeno carboidrato 19-9; NLR, razão neutrófilo-linfócito; PLR, razão plaqueta-linfócito.

Dentro dos biomarcadores usados no estudo, pela análise de dados de prontuário, observamos que o nível mediano de CA 19-9 (UI/ml) na coleta antes do tratamento foi de 337,9. O nível da média de CA 19-9 (UI/ml) na mesma coleta foi de 7841,7 com variação de (3,1 - 41544). No estudo de SANTUCCI et al. (2018), valor médio de CA 19-9 em pacientes ressecados foi $174 \pm 41,7$ UI/ml, com uma mediana de 77 UI/ml ($p < 0,001$). Em pacientes com doença localmente avançada, o valor médio de CA 19-9 no soro foi $986 \pm 270,3$ UI/ml com uma mediana de 271 UI/ml. Os pacientes com doença metastática (pré-operatório) tinham uma média CA 19-9 de $4277 \pm 975,9$ UI/ml com uma mediana de 1071 UI/ml.

A razão neutrófilo/linfócito (NLR) é outro marcador que conseguimos integrar no estudo. O cálculo para os 9 pacientes foi realizado no tempo da coleta pré-tratamento e estabeleceu-se a mediana com valor de 4, a média de 5 (2 - 15). CHENG et al. (2015) realizaram uma meta-análise, com 9 estudos, com um total de 2035 pacientes. Mostraram que os pacientes com um elevado NLR tiveram pior sobrevida global após o tratamento (HR=1,587; CI 95%: 1,411-1,785, $p < 0,01$). ZHOU et al. (2018) realizaram uma meta-análise sobre 43 estudos de coorte em câncer de pâncreas com foco no valor prognóstico da NLR. Os resultados demonstraram que os pacientes com baixo NLR tiveram melhor sobrevida global em comparação com os pacientes com elevada NLR. O nosso estudo não teve diferenças significativas deste marcador comparado com os outros parâmetros envolvidos, porém, continua sendo uma alternativa importante para os clínicos.

Outro biomarcador foi a razão plaqueta/ linfócito (PLR), calculada para os 9 pacientes na coleta pré-tratamento. A mediana dos pacientes foi de 165 e a média de 195 (78 - 563). Uma meta-análise com 16 estudos compreendendo 3028 pacientes com câncer de pâncreas demonstrou que o PLR elevado está ligado a uma pior sobrevida global (HR=1.22, 95% CI: 1.09-1.36, $P<.001$). O papel prognóstico da PLR na sobrevida global foi significativo no subgrupo de asiáticos (HR=1.22, 95% CI: 1.11-1.34, $P<.001$), nos pacientes tratados com quimioterapia (HR=1.18, 95% CI: 1.04-1.35, $P=.01$) e no subtipo patológico de adenocarcinoma do pâncreas (HR=1.21, 95% CI: 1.08-1.36, $P=.001$). O valor de *cut-off* de PLR foi ≥ 160 (HR=1.48, 95% CI: 1.25-1.75, $P<.001$) (LI et al. 2018a). Nossos dados não encontraram significância estatística, mas a mediana em nosso estudo esteve acima do *cut-off* do estudo em comparação, explicando a importância deste dado clínico.

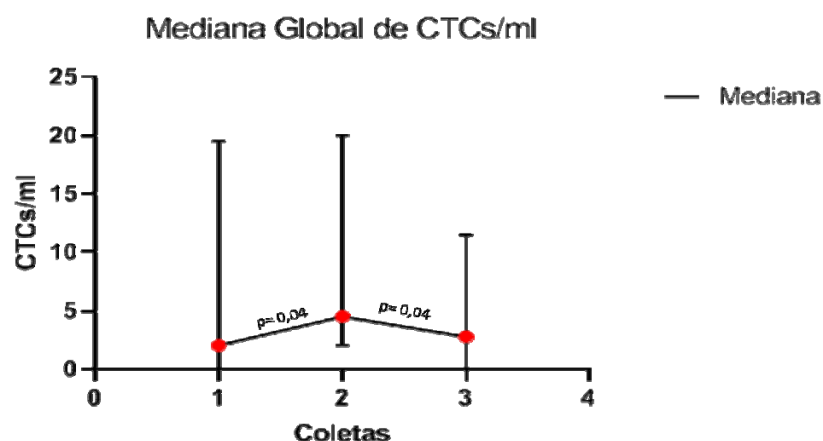


Figura 17 - Mediana de CTCs/ml nas 3 coletas. Pelo teste de Wilcoxon, observamos que as CTCs no grupo todo aumentaram com diferença estatisticamente significativa entre a primeira e a segunda coleta ($p=0,04$), e entre a segunda e terceira coleta diminuíram com diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$).

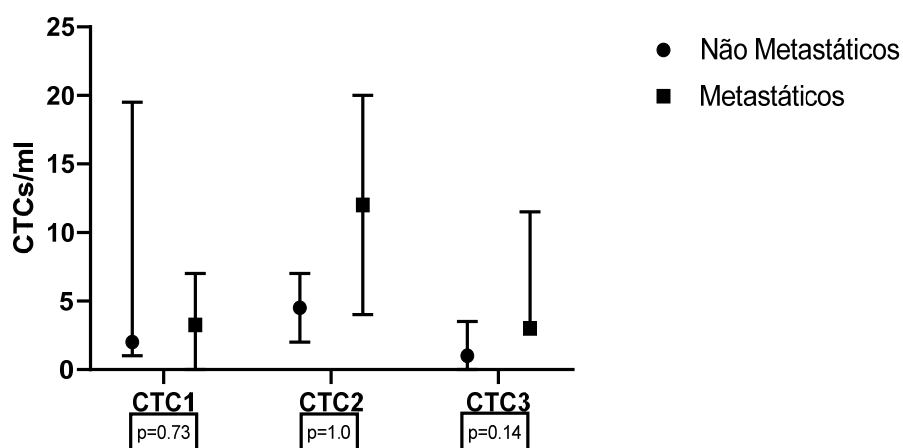


Figura 18 - Níveis de CTCs nas 3 coletas classificando os pacientes metastáticos e não metastáticos. Os pacientes com metástases tiveram maior distribuição de CTCs (não significativos) em todas as coletas (CTC1: $p=0,73$; CTC2: $p=1,0$; CTC3: $p=0,14$).

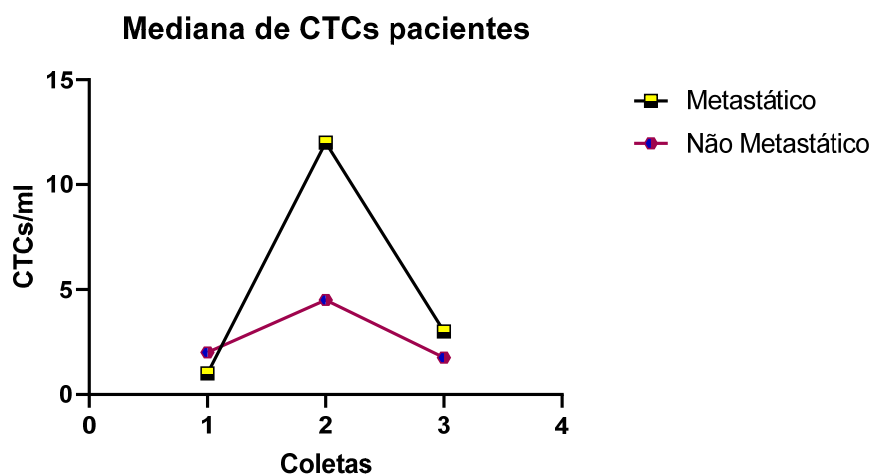


Figura 19 - Níveis medianos de CTCs nas 3 coletas classificando os pacientes metastáticos e não metastáticos. A figura mostra que os pacientes tem maior quantidade de CTCs/ml na segunda coleta e é mais exposto nos pacientes metastáticos.

4.3 EXPRESSÃO PROTEICA NAS CTCs

Avaliamos a expressão das proteínas envolvidas no processo de transição epitélio-mesênquima por imunocitoquímica nas CTCs de 9 pacientes na primeira coleta, 5 da segunda coleta e 8 pacientes da terceira coleta. A Figura 20 amostra reações de padronização do anticorpo anti-mesotelina (controle positivo) em células Hela, os demais anticorpos já foram padronizados previamente no nosso laboratório

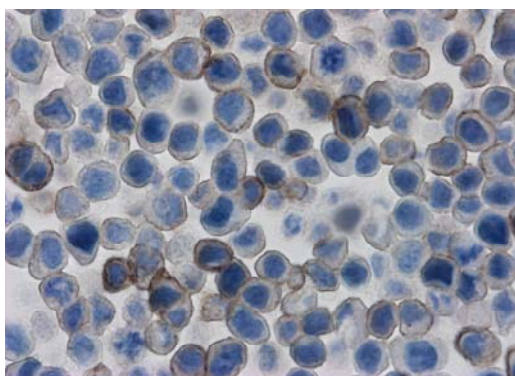


Figura 20 - Fotomicrografias de Células Hela com marcação positiva para Mesotelina DAB+. A fotomicrografia foi tirada em aumento de 40x.

Analizamos separadamente a expressão proteica das CTCs, relacionando cada marcador com cada coleta e o que podemos observar foi a expressão de MMP2 em 77,77% dos casos da coleta *baseline* (1C). Inclusive, os pacientes com expressão de MMP2 nas CTCs na 1C apresentaram maior distribuição de níveis de CTCs, mas sem significância estatística ($p=0,33$).

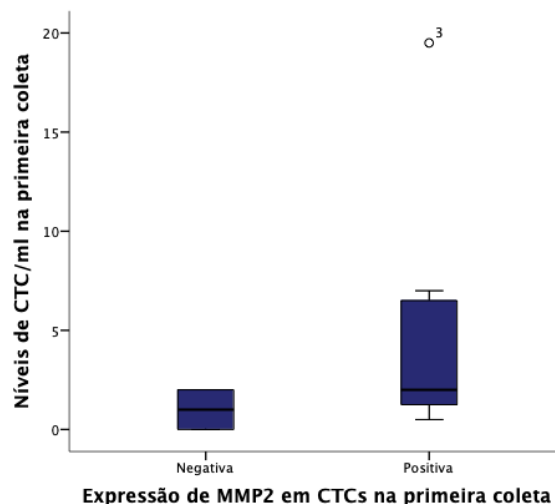


Figura 21 - Distribuição das CTCs na expressão proteica de MMP2 na coleta *baseline*. Não tem significância estatística ($p=0,33$). A distribuição quantitativa das variáveis foi calculada pelo Teste U de Mann-Whitney.

TGF β -R1 encontrou-se expressa em 44,44% dos casos. Pacientes com expressão de TGF β -R1 nas CTCs na 1C apresentaram maior distribuição de níveis de CTCs, sem significância estatística ($p=0,09$).

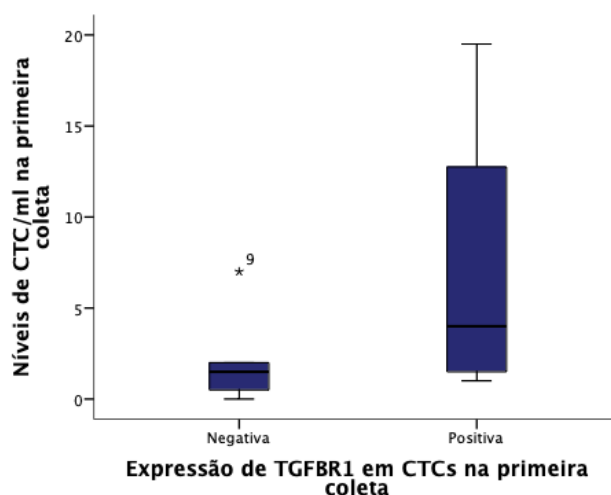


Figura 22 - Distribuição das CTCs na expressão proteica de TGF β -R1 na coleta *baseline*. Não tem significância estatística ($p=0,09$). A distribuição quantitativa das variáveis foi calculada pelo Teste U de Mann-Whitney.

Vimentina encontrou-se expressa em 33,33% dos casos. Pacientes com expressão de vimentina nas CTCs na 1C apresentaram maior distribuição de níveis de CTCs, sem significância estatística ($p=0,09$).

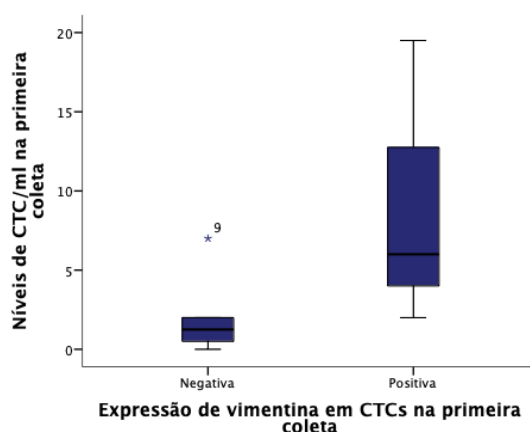


Figura 23 - Distribuição das CTCs na expressão proteica de vimentina na coleta *baseline*. Não tem significância estatística ($p=0,09$). A distribuição quantitativa das variáveis foi calculada pelo Teste U de Mann-Whitney.

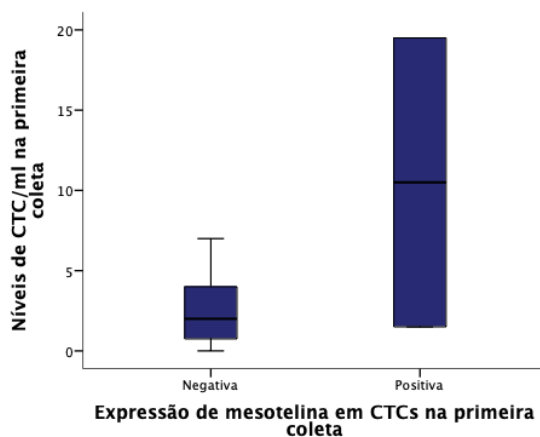


Figura 24 - Distribuição das CTCs na expressão protéica de mesotelina na coleta *baseline*. Não tem significância estatística ($p=0,5$). A distribuição quantitativa das variáveis foi calculada pelo Teste U de Mann-Whitney.

Pacientes com expressão de mesotelina nas CTCs na 1C apresentaram maior distribuição de níveis de CTCs, sem significância estatística ($p= 0,5$). A expressão de Mesotelina foi positiva em 22,22% dos casos.

No grupo de 5 pacientes do primeiro seguimento, as CTCs expressaram MMP2 em 80% dos pacientes. A vimentina foi expressa em 60% dos pacientes. Pacientes com expressão de vimentina nas CTCs na 2C apresentaram maior distribuição de níveis de CTCs, sem significância estatística ($p= 0,2$).

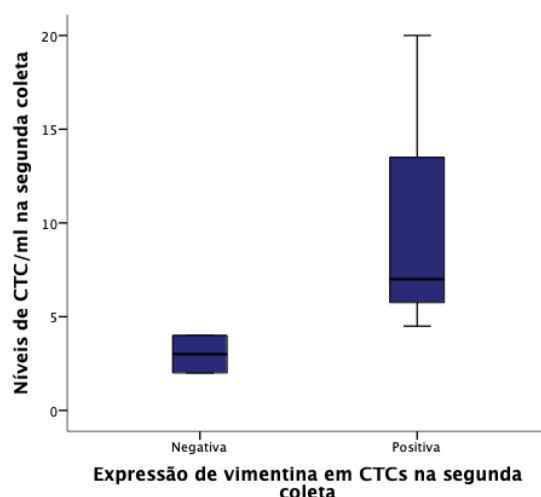


Figura 25 - Distribuição das CTCs na expressão protéica de vimentina na coleta de primeiro seguimento. Não tem significância estatística ($p= 0,5$). A distribuição quantitativa das variáveis foi calculada pelo Teste U de Mann-Whitney.

TGF β -R1 expressou-se em 60% dos casos. Pacientes com expressão de TGF β -R1 nas CTCs no primeiro seguimento apresentaram maior distribuição de níveis de CTCs, sem significância estatística ($p= 0,2$).

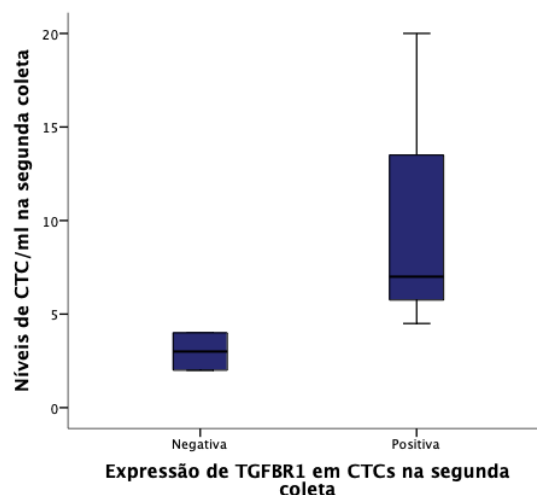


Figura 18 - Distribuição das CTCs na expressão proteica de TGF β -R1 na coleta de primeiro seguimento. Não tem significância estatística ($p= 0,2$). A distribuição quantitativa das variáveis foi calculada pelo Teste U de Mann-Whitney.

A mesotelina foi expressa em 20% dos pacientes do primeiro seguimento.

Em relação ao grupo de 8 pacientes do segundo seguimento, as CTCs expressaram a MMP2 em 50% dos pacientes. A Vimentina é expressa em 25% dos casos. A expressão de TGF β -R1 foi em 12,5% dos casos. A expressão de Mesotelina foi nula, 0% dos casos.

Seguindo com a descrição da expressão proteica, nos 9 pacientes do estudo, a proteína expressa em todos os pacientes nas três coletas foi a MMP2, e a menos expressa nas três coletas foi a mesotelina.

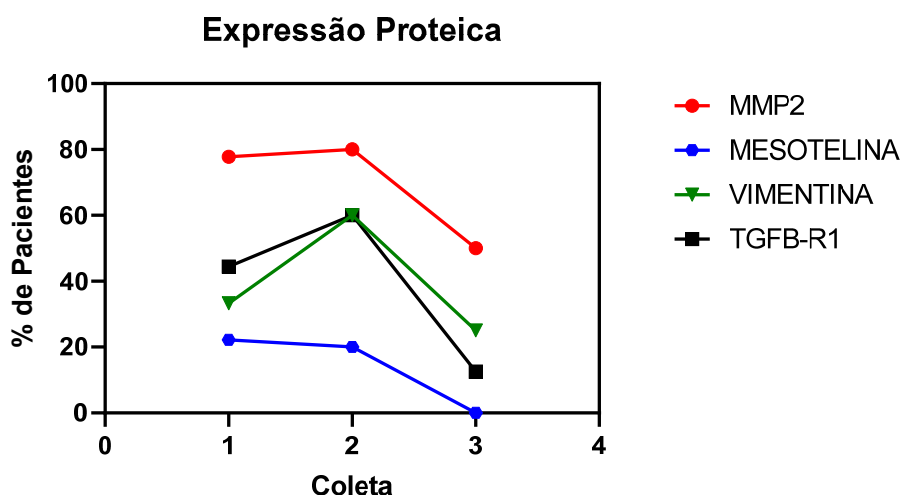


Figura 26 - Porcentagem de pacientes com CTCs que expressam as proteínas envolvidas no estudo em cada momento de coleta. MMP2 apresentou maior expressão proteica nas CTCs, vimentina e TGF β -R1 tiveram um padrão parecido na segunda coleta, e a Mesotelina teve uma expressão baixa nas três coletas.

A MMP2 é importante na disseminação e invasão de células tumorais e ativa a angiogênese. MURRAY et al. (2012) estudaram por imunocitoquímica da expressão de MMP2 em células prostáticas circulantes (CPCs), células tumorais disseminadas (DTCs) e micrometástases (mM) na medula óssea de homens com câncer de próstata. Em 185 pacientes com câncer não metastático, detectaram CPCs em 62,7%, DTCs em 62,2% e mM em 71,4%. Em 30 pacientes de câncer metastático 100% de CPCs, DTCs e mM foram detectados. Em todos, CPCs, DTCs e mM, a expressão de MMP2 foi positivamente associada ao aumento do escore de Gleason. A expressão de MMP2 em CPCs e DTCs mostrou concordância. Nossos achados, embora em câncer de pâncreas, demonstraram que a expressão de MMP2 foi a mais alta de todas as proteínas do estudo em todas as

coletas, sendo a maior expressão encontrada na segunda coleta, em 80% dos pacientes.

Amostras de sangue periférico e portal foram obtidas partir de 50 pacientes com PDAC antes da ressecção cirúrgica e filtrada utilizando o ISET. As CTCs foram identificadas por imunofluorescência para citoqueratina, vimentina, e CD45. Citoqueratina encontrou-se expressa em 78% dos pacientes e vimentina em 67% (CTCs mesenquimais). A detecção de CTCs expressando tanto vimentina e citoqueratina foi preditiva de recorrência ($P = 0,01$). Entre os pacientes com recidiva do câncer, aqueles com CTCs vimentina+ e as que expressam citoqueratina, tiveram menor tempo mediano para a recorrência em comparação com pacientes sem CTCs ($P = 0,02$) PORUK et al. (2016). Em nosso estudo, na primeira coleta a Vimentina não é altamente exposta, quanto no estudo de PORUK et al. (2016), embora sua expressão na segunda coleta aumenta em até 60% dos pacientes, o que pode levar à hipótese de ser um mecanismo de resistência aos quimioterápicos após o início da quimioterapia.

GASPARINI-JUNIOR et al. (2019) estudaram expressão de TGF β -RI em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas 16 pacientes foram testados para TGF β -RI, 4 apresentaram marcação positiva, representando 25% dos pacientes. Não houve diferença estatisticamente significativa na SLP entre os pacientes que apresentaram marcação positiva para TGF β -RI em comparação aos que não apresentaram expressão deste marcador (1,73 meses vs. 1,36 meses; $p=0.83$). O mesmo aconteceu para a SG (6,95 vs. 6,53 meses; $p=0.89$), não apresentando diferença estatisticamente

relevante. O nosso estudo permitiu ver a cinética desta proteína nas três coletas, percebendo um aumento no segundo momento, apresentando-se em 60% dos pacientes e com uma importante queda da expressão no terceiro momento das coletas, podendo expor que o fenótipo mesenquimal é mais exibido depois do início da quimioterapia, podendo ser um mecanismo de resistência do tumor.

A mesotelina é uma glicoproteína expressa em células mesoteliais normais e encontra-se superexpressa em vários tipos histológicos de tumores, incluindo adenocarcinomas pancreáticos. JOHNSTON et al. (2009) realizaram um estudo com mesotelina por imuno-histoquímica e ELISA. A resposta imune celular *in vitro* à mesotelina foi avaliada pela secreção de INF- γ , por ELISA e coloração intracelular desta citocina em células T CD4+ e CD8+. O nível de anticorpos circulantes contra a mesotelina foi medido por ELISA. Todo o tecido tumoral de pacientes com adenocarcinoma pancreático expressou mesotelina (n = 10). A proteína de mesotelina circulante foi detectada em pacientes com adenocarcinoma pancreático (73 de 74 pacientes) e doença pancreática benigna (5 de 5), mas não em indivíduos saudáveis. O estudo concluiu que a mesotelina circulante é um biomarcador útil para a doença pancreática. Isso sugere que a mesotelina é um alvo potencial para estratégias de intervenção imunológica no câncer de pâncreas. Também o trabalho de MONTEMAGNO et al. (2019) concretiza uma análise do TCGA que mostrou que pacientes com PDAC com alta expressão de mesotelina tiveram uma pior sobrevida global (P = 0,00066). Incluímos a análise de mesotelina em nosso estudo, baseados em seu

potencial. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo utilizando a mesotelina em imunocitoquímica para ver a sua expressão em CTCs de pacientes. Encontramos esta proteína expressa em CTCs de três pacientes e sem nenhuma correlação clínica relevante.

Tabela 3 - Características clínicas e de expressão proteica dos pacientes envolvidos no estudo.

Pte	Gn	Estagio	T	N	M	Tipo histológico	Meta ao Dx	Sítio Meta	1° Col. CTC/ml	Expressão Proteica	2° Col. CTC/ml	Expressão Proteica	3° Col. CTC/ml	Expressão Proteica	MTC	CA 19-9 ao Dx	Prog	Tratamento	Trombose	Quimioterapia
1	F	III	4	0	0	Carcinoma	Não		2	VIM, TGFB	7	MESOTH, VIM, TGFB	3,5	MMP2, VIM, TGFB	Sim	211	Não	Neoadjuvante	TVP MSD	mFOLFIRINOX
2	M	III	4	0	0	Adenocarcinoma ductal	Não		2	MMP2	4,5	MMP2, VIM, TGFB	1	MMP2	Não	337,9	Não	Neoadjuvante	Sem dados	FOLFIRINOX
3	F	IB	2	0	0	Adenocarcinoma ductal	Não		1	MMP2, TGFB	2	MMP2	0	-----	Não	26,5	Sim	Neoadjuvante	Sem dados	mFOLFIRINOX
6	F	IB	2	0	0	Adenocarcinoma ductal	Não		19,5	MMP2, MESOTH, VIM, TGFB	Perda de coleta	-----	2,5	Todas as CTCs negativas	Não	39	Não	Curativo	Sem TVP	FOLFOX
10	M	IIB	3	1	0	Adenocarcinoma ductal	Não		7	MMP2	Óbito paciente	-----	Óbito Paciente	-----	Não	388,5	Sim	Curativo	Sem TVP	NÃO APLICA
5	M	IV	4	1	1	Adenocarcinoma	Sim	Fígado	6	MMP2, VIM, TGFB-RI	Perda de coleta	-----	3	Todas as CTCs negativas	Não	3,1	Sim	Paliativo	Sem TVP	mFOLFIRINOX
7	M	IV	4	1	1	Adenocarcinoma	Sim	Fígado, Peritoneo	1,5	MMP2, MESOTH	Perda de coleta	-----	1	MMP2	Não	41544	Não	Paliativo	Sem TVP	mFOLFIRINOX
8	F	IV	4	1	1	Adenocarcinoma ductal	Sim	Fígado	0,5	MMP2	4	MMP2	3	VIM	Sim	6700	Não	Paliativo	TVP MIE	mFOLFIRINOX
9	F	IV	4	1	1	Adenocarcinoma ductal	Sim	Fígado, Linfonodos	0	-----	20	MMP2, VIM, TGFB	11,5	MMP2	Não	21325,9	Não	Paliativo	Sem TVP	mFOLFIRINOX

Classificou-se esta tabela em pacientes não metastáticos e metastáticos. Encontramos que pacientes com microêmbolos tumorais circulantes tiveram tromboses venosa profunda.

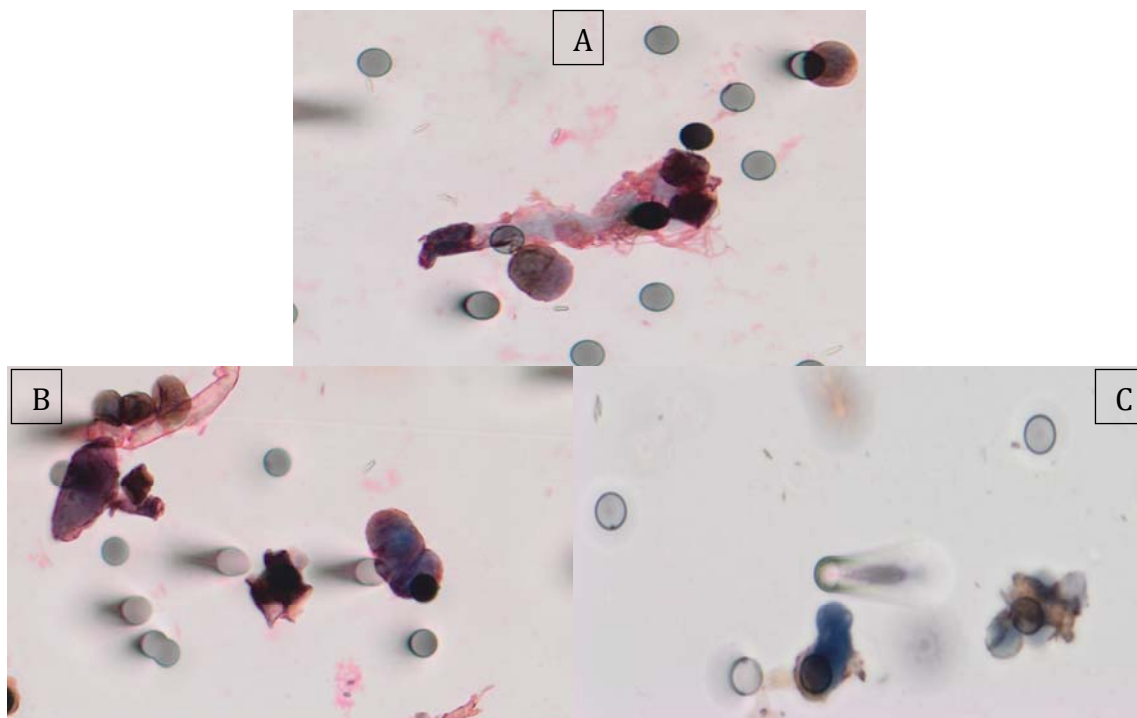


Figura 27 - Fotomicrografias de Células Tumorais Circulantes (CTCs) isoladas do sangue de pacientes com câncer de pâncreas. **A)** CTC positiva, marcação citoplasmática para TGFβR1 DAB+. **B)** CTC positiva, marcação citoplasmática para TGFβR1 DAB+. **C)** CTC negativa. Todas as fotomicrografias foram tiradas em aumento de 40x.

Porcentagem de pacientes que expressaram as proteínas do estudo (22 coletas)

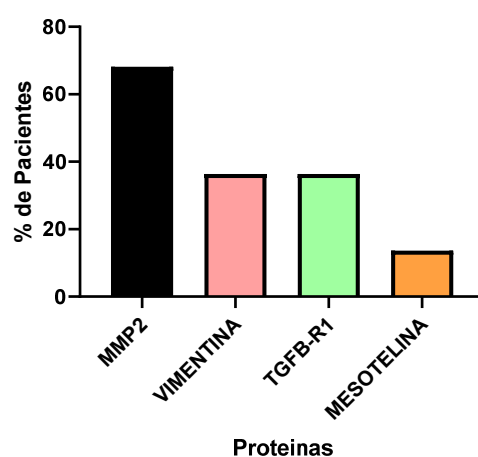


Figura 28 - Porcentagem de pacientes que expressaram MMP2, vimentina, TGFβ e mesotelina nas 22 coletas. A MMP2 foi a proteína mais expressa nos pacientes deste estudo, a expressão de vimentina e TGFβ-R1 foi muito parecida.

Não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de casos com presença das proteínas nem correlação com a presença de metástase a distância, nem com progressão da doença em nenhum momento analisado.

4.4 EXPRESSÃO DOS microRNAs

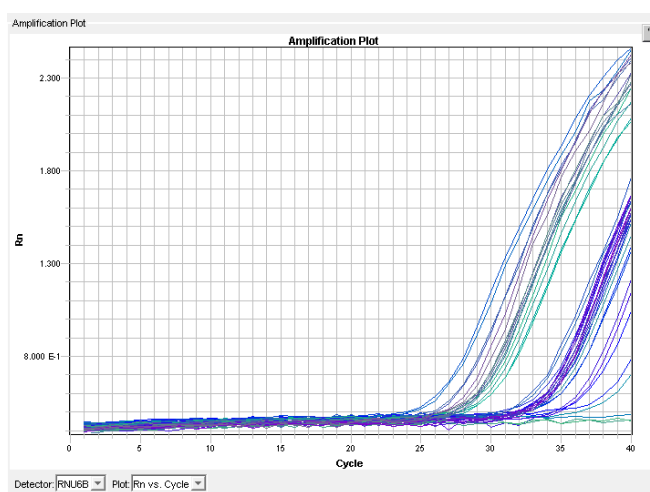


Figura 29 - Curva de amplificação dos testes com o microRNA endogeno U6B. Foi feito este teste para controle da expressão dos microRNAs.

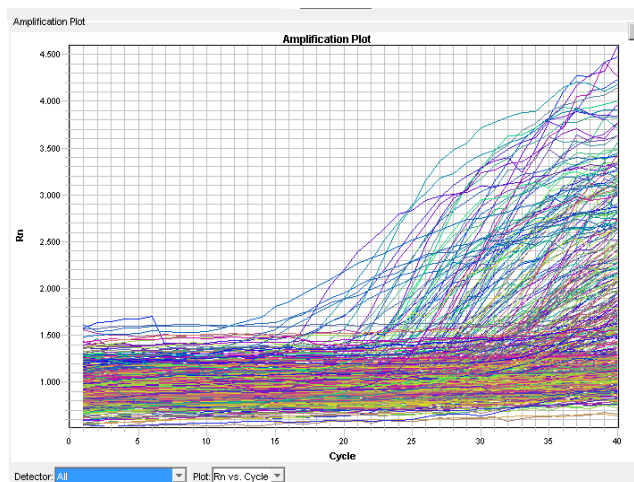


Figura 30 - Curva de amplificação da placa TLDA.

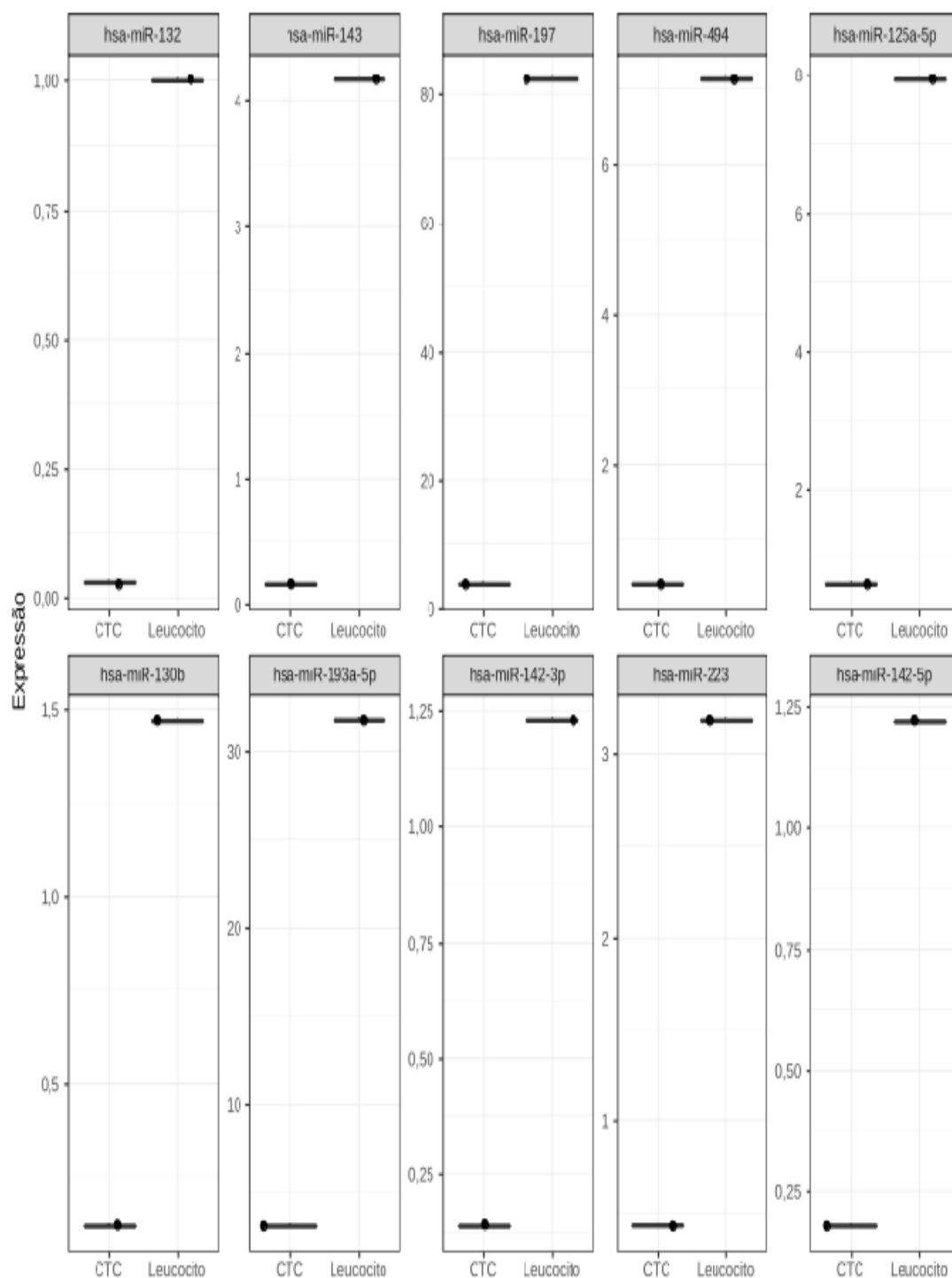


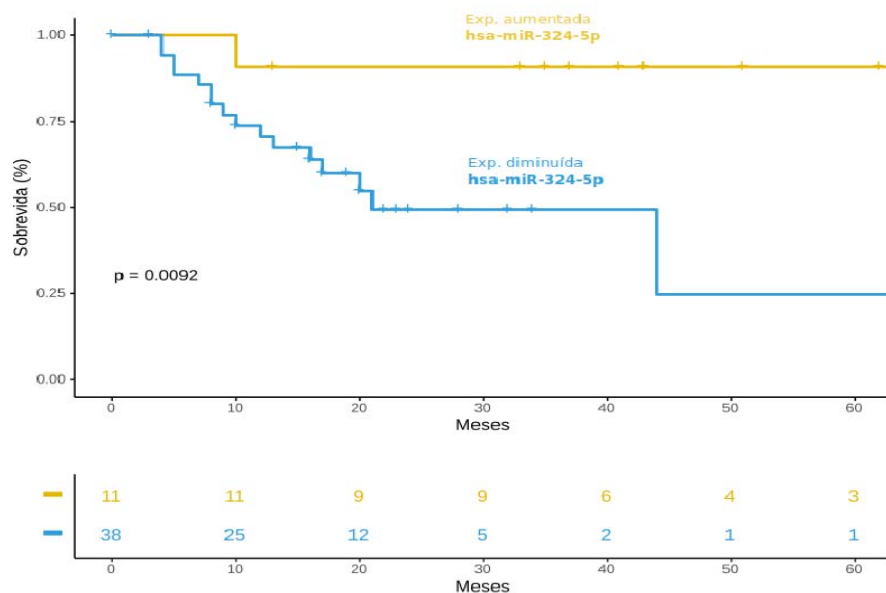
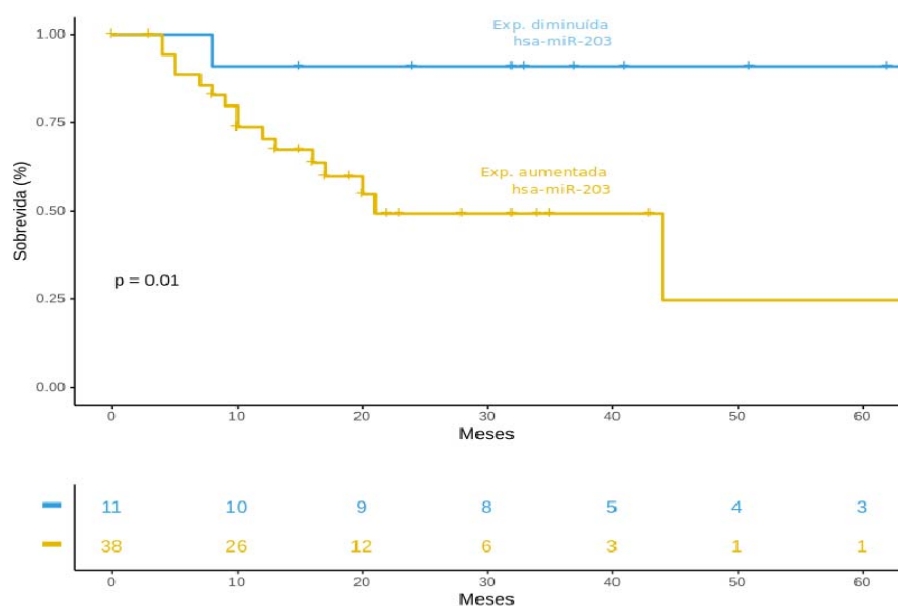
Figura 31 - Representação dos 10 melhores miRNAs selecionados com expressão diminuída nas CTCs em comparação com leucócitos periféricos de pacientes com carcinoma de pâncreas.



Figura 32 - Representação dos 10 melhores miRNAs selecionados com expressão aumentada nas CTCs em comparação com leucócitos periféricos de pacientes com carcinoma de pâncreas.

As Figuras 31 e 32 apresentam os 20 melhores miRNAs selecionados no estudo, sendo 10 com menor expressão em CTCs em comparação com leucócitos e 10 com maior expressão em CTCs após a mesma comparação em pacientes com carcinoma de pâncreas.

Foram selecionadas 182 amostras de câncer de pâncreas obtidas no TCGA (The Cancer Genome Atlas) para a avaliação de miRNAs diferencialmente expressos entre amostras neoplásicas e não-neoplásicas. Foram consideradas apenas amostras de pacientes com estadiamento patológico precoce (I e II), resultando em 50 amostras. Foram considerados significativos os miRNAs que apresentavam p-valor < 0.05 e fold-change ≥ 2 e ≤ -2 . Os 93 alvos selecionados foram comparados com aqueles obtidos neste estudo, resultando em 25 candidatos. Foi observado que os miRNAs hsa-miR-203a-3p e hsa-324-5p foram associados com pior sobrevida em pacientes com diagnóstico precoce da doença.



CHEN et al. (2019) objetivaram fornecer um novo alvo terapêutico (LINC00342) para a terapia de NSCLC. A expressão dos alvos foi detectada por reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). A migração e invasão celular foram medidas por *transwell*. As ferramentas DIANA do software *online* foram usadas para prever os locais de ligação do LINC00342 e miR-203a-3p. A luciferase foi utilizada para confirmar a interação entre LINC00342 e miR-203a-3p. A expressão de LINC00342 foi aumentada em tecidos e células NSCLC em comparação com tecidos e células normais. A eliminação do LINC00342 suprimiu a proliferação celular, a formação de colônias, a migração e a invasão. O LINC00342 regulou a expressão do miR-203a-3p, direcionando-o diretamente. O estudo sugeriu que o LINC00342 contribui para o crescimento e à metástase das células NSCLC através do direcionamento competitivo de miR-203a-3p.

BRIEM et al. (2019) realizaram pequenos sequenciamentos de RNA de uma linhagem celular progenitora epitelial da mama (D492) e seu derivado mesenquimal (D492M) cultivado em microambiente tridimensional. Entre os miRNAs mais regulados em D492M estava o miR-203a, um miRNA que desempenha um papel importante na diferenciação epitelial. A expressão aumentada de miR-203a foi observada em D492. Quando o miR-203a foi superexpresso em D492M, foi observada uma reversão parcial em direção ao fenótipo epitelial. A análise da expressão gênica de D492M e D492M^{miR-203a} revelou a peroxidasina, envolvida na produção de colágeno IV, como o gene mais significativamente regulado em D492M^{miR-203a}. Eles demonstraram que a expressão do miR-203a correlacionou-se temporalmente com a morfogênese ramificada e foi suprimida no D492M. A

superexpressão de miR-203a em D492M induziu a TME parcial e reduziu a expressão de peroxidase. Além disso, os autores demonstraram que o miR-203a é um novo repressor da peroxidase. O eixo MiR-203-peroxidase pode ser um importante regulador na morfogênese ramificada, TEM / TME e remodelação da membrana basal. Nas CTCs este microRNA pode estar envolvido nestes mecanismos, estudos adicionais são necessários para melhor entendimento desta via e de seu papel nas CTCs provenientes de pacientes com câncer de pâncreas.

RUBIO et al. (2008) acreditam que os carcinomas que derivam de células epiteliais com progressão maligna, frequentemente são associados à TEM. Eles caracterizaram tumores gerados por células mesenquimais humanas espontaneamente transformadas (TMC). Análises imuno-histopatológicas identificaram esses tumores como carcinomas pouco diferenciados, sugerindo que uma transição mesênquima-epitelial estava envolvida na geração de TMC. Isso foi corroborado pela análise de *microarray* e expressão de proteínas, que mostrou que quase todos os genes relacionados ao fenótipo mesenquimal foram severamente reprimidos nessas TMC. Além disso, TMC expressou antígenos embrionários e foi capaz de integrar blastocistos em desenvolvimento sem sinais de formação de tumores, sugerindo que um processo de desdiferenciação estava associado à transformação de células-tronco mesenquimais (C-TM), apoiando a hipótese de que alguns carcinomas são derivados de precursores mesenquimais em vez de precursores epiteliais.

KUO et al. (2016) relataram que a expressão de miR-324-5p foi frequentemente observada estando regulada, tanto para cima quanto para

baixo, a depender do tipo de câncer humano. A superexpressão do miR-324-5p suprimiu o crescimento e a invasão de células de câncer de mama. A superexpressão do miR-324-5p reduziu o crescimento e as habilidades invasivas das células cancerígenas colorretais. O fator nuclear *kappa-light-chain-enhancer* das células B ativadas (NF-κB) é um fator de transcrição vital que regula vários processos biológicos importantes, incluindo a TEM e as metástases do câncer de mama. A sinomenina é uma isoquinolina bem conhecida por seu notável efeito curativo em doenças reumáticas e artríticas e pode induzir a apoptose de vários tipos de células cancerígenas. Recentemente, a sinomenina foi relatada como um supressor de tumor através da inibição da proliferação celular e da indução de apoptose. A sinomenina suprimiu a invasão e migração de células de câncer de mama MDA-MB-231 e 4T1 de maneira dependente da dose. Isto pela ligação de NF-κB ao inibidor de NF-κB (IκB) depois que as células MDA-MB-231 foram tratadas com sinomenina 0,25, 0,5 e 1 mM. As técnicas de *Western blotting* e ELISA indicaram que a supressão estava associada à fosforilação da IκB quinase (IKK) e seu regulador negativo CUEDC2. O tratamento com sinomenina diminuiu a expressão do miR-324-5p, aumentou o nível de seu gene alvo CUEDC2 e bloqueou a fosforilação da IKK através da alteração do eixo *upstream*. Finalmente, a transfecção de uma imitação do miR-324-5p inibiu a supressão da invasão e metástase das células MDA-MB-231 e 4T1 pela sinomenina, fornecendo evidências de que o tratamento com sinomenina suprimiu a invasão e as metástases das células cancerígenas via regulação do Eixo IL4 / miR- 324-5p / CUEDC2 (SONG et al. 2015).

JIANG et al. (2018) concretizaram experimentos para formação de colônias, ensaios de migração celular foram utilizados para determinar a formação, proliferação, migração e invasão de colônias *in vitro*, assim como modelos murinos de tumor subcutâneo e o modelo de metástase pulmonar para verificar o crescimento e a metástase do tumor *in vivo*. A expressão de TPT1-AS1 foi regulada positivamente em tecidos e linhagens celulares de câncer cervical (CC). Alto TPT1-AS1 foi correlacionado com prognóstico adverso e baixa sobrevida. As experiências de superexpressão e *knockdown* do TPT1-AS1 revelaram que o TPT1-AS1 promoveu a formação de colônias celulares, proliferação, migração, invasão, progressão e TEM das células de CC *in vitro* e *in vivo*. O mecanismo subjacente indicou que o TPT1-AS1 funcionava como uma esponja endógena para miR-324-5p em células de CC. O experimento de ganho e perda confirmou que o miR-324-5p inibiu a formação de colônias celulares, proliferação, migração, invasão, progressão e TEM das células CC e mediou os efeitos biológicos do TPT1-AS1. Assim, o miR-324-5p foi identificado não apenas como alvo, mas também como mediador funcional do TPT1-AS1 nas células CC. Esses achados melhorarão a compreensão do mecanismo envolvido na progressão do câncer e fornecerão novos alvos para o tratamento molecular do CC.

Os estudos supracitados fornecem dados para postularmos que talvez, miR-324-5p encontrado e *up-regulado* nas CTCs possa estar envolvido nestes fenômenos anteriormente nomeados. Precisamos de estudos adicionais para elucidar esta via e de seu papel nas CTCs provenientes de pacientes com câncer de pâncreas.

5 CONCLUSÕES

- Neste trabalho foi possível encontrar CTCs em todos os 9 pacientes de câncer de pâncreas incluídos no estudo.
- Devido ao baixo número de pacientes incluídos e curto tempo de *follow-up*, não conseguimos ver correlação entre níveis de CTCs e expressão de proteínas e SLP e SG, mas continuaremos acompanhando os pacientes.
- Encontramos correlação entre presença de MTC e TEP.
- Como esperávamos, encontramos microRNAs relacionados à TEM altamente expressos em CTCs de pacientes com câncer de pâncreas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abba M, Patil N, Leupold J, Allgayer H. MicroRNA regulation of epithelial to mesenchymal transition. **J Clin Med** 2016; 5:8.

Aceto N, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. En route to metastasis: circulating tumor cell clusters and epithelial-to-mesenchymal transition. **Trends Cancer** 2015; 1:44-52.

Åkerberg D, Ansari D, Andersson R, Tingstedt B. The effects of surgical exploration on survival of unresectable pancreatic carcinoma: a retrospective case-control study. **J Biomed Sci Eng** 2017; 10:1-9.

Albregues J, Shields MA, Ng D, et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. **Science** 2018; 361:eaao4227.

Alix-Panabières C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. **Lab Chip** 2014; 14:57-62.

Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. **Cancer Discov** 2016; 6:479-91.

Alix-Panabières C, Pierga J-Y. Circulating tumor cells: liquid biopsy. **Bull Cancer** 2014; 101:17-23.

Anantharaman A, Friedlander T, Lu D, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) characterization of circulating tumor cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. **BMC Cancer** 2016; 16:744.

Ankeny JS, Court CM, Hou S, et al. Circulating tumour cells as a biomarker for diagnosis and staging in pancreatic cancer. **Br J Cancer** 2016; 114:1367-75.

Batlle E, Massagué J. Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer. **Immunity** 2019; 50:924-40.

Beatty GL, Haas AR, Maus M V, et al. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. **Cancer Immunol Res** 2014; 2:112-20.

Benzel J, Fendrich V. Chemoprevention and treatment of pancreatic cancer: update and review of the literature. **Digestion** 2018; 97:275-87.

Best MG, Wesseling P, Wurdinger T. Tumor-educated platelets as a noninvasive biomarker source for cancer detection and progression monitoring. **Cancer Res** 2018; 78:3407-12.

Bhagat AAS, Hou HW, Li LD, Lim CT, Han J. Pinched flow coupled shear-modulated inertial microfluidics for high-throughput rare blood cell separation. **Lab Chip** 2011; 11:1870.

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

Blaszak M, El-Masri M, Hirmiz K, et al. Survival of patients with pancreatic cancer treated with varied modalities: a single-centre study. **Mol Clin Oncol** 2017; 6:583-8.

Bobek V, Gurlich R, Eliasova P, Kolostova K. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: enrichment and cultivation. **World J Gastroenterol** 2014; 20:17163-70.

Briem E, Budkova Z, Sigurdardottir AK, et al. MiR-203a is differentially expressed during branching morphogenesis and EMT in breast progenitor cells and is a repressor of peroxidasin. **Mech Dev** 2019; 155:34-47.

Broncy L, Paterlini-Bréchet P. Cancer-associated circulating atypical cells with both epithelial and macrophage-specific markers. **J Lab Precis Med** 2018; 3:91.

Chen F, Wang S, Fang Y, et al. Feasibility of a novel one-stop ISET device to capture CTCs and its clinical application. **Oncotarget** 2017; 8:3029-41.

Chen Q-F, Kong J-L, Zou S-C, et al. LncRNA LINC00342 regulated cell growth and metastasis in non-small cell lung cancer via targeting miR-203a-3p. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 2019; 23:7408-18.

Cheng D, Sun Y, He H. The diagnostic accuracy of HE4 in lung cancer: a meta-analysis. **Dis Markers** 2015; 2015:352670.

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

Chinen LTD, Abdallah EA, Braun AC, et al. Circulating tumor cells as cancer biomarkers in the clinic. In: Magbanua MJM, Park JW. editors. **Isolation and molecular characterization of circulating tumor cells**. New York: Springer International Pu; 2017. p.1-41.

Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic Cancer. **N Engl J Med** 2018; 379:2395-406.

Dharmasiri U, Njoroge SK, Witek MA, et al. High-throughput selection, enumeration, electrokinetic manipulation, and molecular profiling of low-abundance circulating tumor cells using a microfluidic system. **Anal Chem** 2011; 83:2301-9.

Domingos Chinen LT, Lopes 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.

Dos Santos G, Rogel MR, Baker MA, et al. Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome. **Nat Commun** 2015; 6:6574.

Effenberger KE, Schroeder C, Hanssen A, et al. Improved risk stratification by circulating tumor cell counts in pancreatic cancer. **Clin Cancer Res** 2018; 24:2844-50.

Eifler RL, Lind J, Falkenhagen D, Weber V, Fischer MB, Zeillinger R. Enrichment of circulating tumor cells from a large blood volume using leukapheresis and elutriation: proof of concept. **Cytom Part B Clin Cytom** 2011; 80B:100-11.

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

Faure S, De Santa Barbara P. Molecular embryology of the foregut: **J Pediatr Gastroenterol Nutr** 2011; 52:S2-S3.

Francart M-E, Lambert J, Vanwynsberghe AM, et al. Epithelial-mesenchymal plasticity and circulating tumor cells: Travel companions to metastases: epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. **Dev Dyn** 2018; 247:432-50.

Fusco J, El-Gohary Y, Gittes GK. Anatomy, physiology, and embriology of the pancreas. In: Yeo CJ. **Shackelford's surgery of the alimentary tract**. 8th ed. New York: Elsevier; 2017. p.1062-75. v.2.

Gascoyne PRC, Noshari J, Anderson TJ, Becker FF. Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis. **Electrophoresis** 2009; 30:1388-98.

Gasparini-Junior JL, Fanelli MF, Abdallah EA, Chinen LTD. Evaluating mmp-2 and tgfb-ri expression in circulating tumor cells of pancreatic cancer patients and their correlation with clinical evolution. **ABCD Arq Bras Cir Dig** 2019; 32:e1433.

Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2019; 20:21-37.

Gemenetzi G, Groot VP, Yu J, et al. Circulating tumor cells dynamics in pancreatic adenocarcinoma correlate with disease status: results of the prospective CLUSTER Study. **Ann Surg** 2018; 268:408-20.

Grover P, Nye MD, Yazdanifar M, et al. MUC1 regulates TGF β function in pancreatic cancer. **Cancer Res** 2017;77(13 Suppl):Abstract nr 321. [Presented at AACR Annual Meeting 2017; April 1-5, 2017; Washington, DC].

Grützmann R. Epidemiology, treatment, and outcome of pancreatic cancer. In: Azmi AS. **Molecular diagnostics and treatment of pancreatic cancer: systems and network biology approaches**. New York: Elsevier; 2014.

Handra-Luca A, Hong SM, Walter K, Wolfgang C, Hruban R, Goggins M. Tumour epithelial vimentin expression and outcome of pancreatic ductal adenocarcinomas. **Br J Cancer** 2011; 104:1296-302.

He X, Wang L, Riedel H, et al. Mesothelin promotes epithelial-to-mesenchymal transition and tumorigenicity of human lung cancer and mesothelioma cells. **Mol Cancer** 2017; 16:63.

Henry BM, Skinningsrud B, Saganiak K, Pękala PA, Walocha JA, Tomaszewski KA. Development of the human pancreas and its vasculature: an integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. **Ann Anat** 2019; 221:115-24.

Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr H-J, Hotz HG. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. **Clin Cancer Res** 2007; 13:4769-76.

Hou J-M, 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.

Hou S, Zhao H, Zhao L, et al. Capture and stimulated release of circulating tumor cells on polymer-grafted silicon nanostructures. **Adv Mater** 2013; 25:1547-51.

Hsu YL, Yen MC, Chang WA, et al. CXCL17-derived CD11b+Gr-1+ myeloid-derived suppressor cells contribute to lung metastasis of breast cancer through platelet-derived growth factor-BB. **Breast Cancer Res** 2019; 21:1-13.

Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. **Br J Cancer** 2005; 92:2076-83.

Ilié M, Hofman P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? **Transl Lung Cancer Res** 2016a; 5:420-3.

Ilié M, Hofman P. Rebuttal from Dr. Hofman and Dr. Ilié. **Transl Lung Cancer Res** 2016b; 5:428-9.

Jiang H, Huang G, Zhao N, et al. Long non-coding RNA TPT1-AS1 promotes cell growth and metastasis in cervical cancer via acting AS a sponge for miR-324-5p. **J Exp Clin Cancer Res** 2018; 37:169.

Johnston FM, Tan MCB, Tan BR, et al. Circulating mesothelin protein and cellular antimesothelin immunity in patients with pancreatic cancer. **Clin Cancer Res** 2009; 15:6511-6518.

Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. **Nat Rev Genet** 2015; 16:421-33.

Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. **EMBO Mol Med** 2015; 7:1-11.

Jungert K, Buck A, Wichert GV, et al. Sp1 Is required for transforming growth factor-induced mesenchymal transition and migration in pancreatic cancer cells. **Cancer Res** 2007; 67:1563-70.

Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. **Lancet** 2016; 388:73-85.

Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. **Cancer Cell** 2013; 23:573-81.

Katt ME, Wong AD, Searson PC. Dissemination from a solid tumor: examining the multiple parallel pathways. **Trends Cancer** 2018; 4:20-37.

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

Kelly RJ, Sharon E, Pastan I, Hassan R. Mesothelin-targeted agents in clinical trials and in preclinical development. **Mol Cancer Ther** 2012; 11:517-25.

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

Kotsakis A, Kallergi G, Aggouraki D, et al. CD8+ PD-1+ T-cells and PD-L1+ circulating tumor cells in chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer: towards their clinical relevance? **Ther Adv Med Oncol** 2019; 11:1-14.

Krebs MG, Hou J-M, 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.

Kulemann B, Rösch S, Seifert S, et al. Pancreatic cancer: circulating tumor cells and primary tumors show heterogeneous KRAS mutations. **Sci Rep** 2017; 7:4510.

Kuo W-T, Yu S-Y, Li S-C, et al. MicroRNA-324 in human cancer: miR-324-5p and miR-324-3p have distinct biological functions in human cancer. **Anticancer Res** 2016; 36:5189-96.

Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging biological principles of metastasis. **Cell** 2017; 168:670-91.

Lewis AR, Valle JW, McNamara MG. Pancreatic cancer: Are “liquid biopsies” ready for prime-time? **World J Gastroenterol** 2016; 22:7175-85.

Li C, Zhang X-Y, Peng W, et al. Preoperative albumin-bilirubin grade plus platelet-to-lymphocyte ratio predict the outcomes of patients with BCLC stage A hepatocellular carcinoma after liver resection. **Medicine (Baltimore)** 2018a; 97:e11599-e9.

Li W, Tao L, Lu M, Xiu D. Prognostic role of platelet to lymphocyte ratio in pancreatic cancers: A meta-analysis including 3028 patients. **Medicine (Baltimore)** 2018b; 97:e9616.

Liu J, Wada Y, Katsura M, et al. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) in molecular regulation of angiogenesis. **Theranostics** 2018; 8:6053-69.

Łukaszewicz-Zajac M, Gryko M, Pączek S, Szmitkowski M, Kędra B, Mroczko B. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and its tissue inhibitor 2 (TIMP-2) in pancreatic cancer (PC). **Oncotarget** 2019; 10:395-403.

Mader S, Pantel K. Liquid biopsy: current status and future perspectives. **Oncol Res Treat** 2017; 40:404-8.

Mansilla C, Soria E, Ramírez N. The identification and isolation of CTCs: a biological Rubik's cube. **Crit Rev Oncol Hematol** 2018; 126:129-34.

Massague J. New EMBO members review: transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. **EMBO J** 2000; 19:1745-54.

McDowell SAC, Quail DF. Immunological regulation of vascular inflammation during cancer metastasis. **Front Immunol** 2019; 10:1984.

McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: a review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. **World J Gastroenterol** 2018; 24:4846-61.

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

Mokdad AA, Minter RM, Zhu H, et al. Neoadjuvant therapy followed by resection versus upfront resection for resectable pancreatic cancer: a propensity score matched analysis. **J Clin Oncol** 2017; 35:515-22.

Montemagno, Cassim, Trichanh, et al. 99mTc-A1 as a novel imaging agent targeting mesothelin-expressing pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancers (Basel)** 2019; 11:1531.

Moon H-S, Kwon K, Kim S-I, et al. Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP). **Lab Chip** 2011; 11:1118.

Morello A, Sadelain M, Adusumilli PS. Mesothelin-targeted CARs: driving t cells to solid tumors. **Cancer Discov** 2016; 6:133-46.

Murray NP, Reyes E, Tapia P, Badínez L, Orellana N. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 expression in disseminated tumor cells and micrometastasis in bone marrow of patients with nonmetastatic and metastatic prostate cancer: theoretical considerations and clinical implications-an immunocy. **Bone Marrow Res** 2012; 2012:259351.

[NCI] National Cancer Institute. **NCI dictionary of cancer terms**. 2011. Available from: <URL:<https://bit.ly/3cjOY29>> [2019 dez 12]

Ordóñez NG. Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis. **Am J Surg Pathol** 2003; 27:1418-28.

Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and-independent sorting of rare circulating tumor cells. **Sci Transl Med** 2013; 5:179ra47-179ra47.

Paliogiannis P, Fois AG, Sotgia S, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and clinical outcomes in COPD: recent evidence and future perspectives. **Eur Respir Rev** 2018; 27:170113.

Pandol SJ. **The exocrine pancreas**. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. Pancreatic embryology and development.

Pantel K, Alix-Panabieres C. Functional studies on viable circulating tumor cells. **Clin Chem** 2016; 62:328-34.

Panth KM, Van Den Beucken T, Biemans R, et al. In vivo optical imaging of MMP2 immuno protein antibody: tumor uptake is associated with MMP2 activity. **Sci Rep** 2016; 6:1-10.

Poruk KE, Valero 3rd V, Saunders T, et al. Circulating tumor cell phenotype predicts recurrence and survival in pancreatic adenocarcinoma. **Ann Surg** 2016; 264:1073-81.

Powell AA, Talasaz AH, Zhang H, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell Lines. **PLoS One** 2012; 7:e33788.

Prunier C, Baker D, Ten Dijke P, Ritsma L. TGF- β family signaling pathways in cellular dormancy. **Trends Cancer** 2019; 5:66-78.

Qi Z-H, Xu H-X, Zhang S-R, et al. The significance of liquid biopsy in pancreatic cancer. **J Cancer** 2018; 9:3417-26.

Rubio D, Garcia S, De La Cueva T, et al. Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition. **Exp Cell Res** 2008; 314:691-8.

Sacidalan DB, Lucero JA, Sacidalan DL. Prognostic utility of baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients receiving immune checkpoint inhibitors: a review and meta-analysis. **Onco Targets Ther** 2018; 11:955-65.

Sadallah S, Schmied L, Eken C, Charoudeh HN, Amicarella F, Schifferli JA. Platelet-derived ectosomes reduce NK cell function. **J Immunol** 2016; 197:1663-71.

Saliba A-E, Saias L, Psychari E, et al. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. **Proc Natl Acad Sci** 2010; 107:14524-9.

Santucci N, Facy O, Ortega-Deballon P, Lequeu J-B, Rat P, Rat P. CA 19-9 predicts resectability of pancreatic cancer even in jaundiced patients. **Pancreatology** 2018; 18:666-70.

Satelli A, Li S. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy or vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cell Mol Life Sci** 2011; 68:3033-46.

Seufferlein T, Ettrich TJ. Treatment of pancreatic cancer-neoadjuvant treatment in resectable pancreatic cancer (PDAC). **Transl Gastroenterol Hepatol** 2019; 4:21.

Sharma P, Alsharif S, Fallatah A, Chung BM. Intermediate filaments as effectors of cancer development and metastasis: a focus on keratins, vimentin, and nestin. **Cells** 2019; 8:497.

Soldan M. Pancreatic cancer screening. **Rev Col Bras Cir** 2017; 44:109-11.

Song L, Liu D, Zhao Y, et al. Sinomenine inhibits breast cancer cell invasion and migration by suppressing NF- κ B activation mediated by IL-4/miR-324-5p/CUEDC2 axis. **Biochem Biophys Res Commun** 2015; 464:705-10.

Song W, Mazziere R, Yang T, Gobe GC. Translational significance for tumor metastasis of tumor-associated macrophages and epithelial-mesenchymal transition. **Front Immunol** 2017; 8:1106.

Stevens RJ, Roddam AW, Beral V. Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis. **Br J Cancer** 2007; 96:507-9.

Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. **Sci Transl Med** 2010a; 2:25ra23.

Stott SL, Hsu C-H, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. **Proc Natl Acad Sci** 2010b; 107:18392-7.

Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. **Mol Oncol** 2017; 11:805-23.

Szczerba BM, Castro-Giner F, Vetter M, et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. **Nature** 2019; 566:553-7.

Thiele J-A, Pitule P, Hicks J, Kuhn P. Single-cell analysis of circulating tumor cells. In: Murray SS. editor. **Tumor Profiling**. New York: Springer; 2019. p.243-64.

Wang F, Sloss C, Zhang X, Lee SW, Cusack JC. Membrane-bound heparin-binding epidermal growth factor like growth factor regulates E-cadherin expression in pancreatic carcinoma cells. **Cancer Res** 2007; 67:8486-93.

Wang S, Li Z, Xu R. Human cancer and platelet interaction, a potential therapeutic target. **Int J Mol Sci** 2018; 19:E1246.

Wang S, Owens GE, Tseng H-R. Nano “Fly Paper” technology for the capture of circulating tumor cells. In: Hurst SJ. editor. **Biomed. Nanotechnol.** Totowa: Humana Press; 2011. p.141-50.

Wei T, Zhang X, Zhang Q, et al. Vimentin-positive circulating tumor cells as a biomarker for diagnosis and treatment monitoring in patients with pancreatic cancer. **Cancer Lett** 2019; 452:237-43.

Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: turning past failures into future successes. **Mol Cancer Ther** 2018; 17:1147-55.

Wolpin BM, Kraft P, Gross M, et al. Pancreatic cancer risk and ABO blood group alleles: results from the pancreatic cancer cohort consortium. **Cancer Res** 2010; 70:1015-23.

Xie Z-B, Yao L, Jin C, Fu D-L. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: efficacy in diagnosis and value in prognosis. **Discov Med** 2016; 22:121-8.

Yang J-J, Hu Z-G, Shi W-X, Deng T, He S-Q, Yuan S-G. Prognostic significance of neutrophil to lymphocyte ratio in pancreatic cancer: a meta-analysis. **World J Gastroenterol** 2015; 21:2807-15.

Zhang X, Shi S, Zhang B, Ni Q, Yu X, Xu J. Circulating biomarkers for early diagnosis of pancreatic cancer: facts and hopes. **Am J Cancer Res** 2018; 8:332-53.

Zheng J, Hernandez JM, Doussot A, et al. Extracellular matrix proteins and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules characterize pancreatic duct fluid exosomes in patients with pancreatic cancer. **HPB** 2018; 20:597-604.

Zhou B, Xu J-W, Cheng Y-G, et al. Early detection of pancreatic cancer: Where are we now and where are we going?: early detection of pancreatic cancer. **Int J Cancer** 2017; 141:231-41.

Zhou Y-F, Xu W, Wang X, et al. Negative methylation status of vimentin predicts improved prognosis in pancreatic carcinoma. **World J Gastroenterol** 2014; 20:13172-13177.

Zhou Y, Cheng S, Fathy AH, Qian H, Zhao Y. Prognostic value of platelet-to-lymphocyte ratio in pancreatic cancer: a comprehensive meta-analysis of 17 cohort studies. **Onco Targets Ther** 2018; 11:1899-908.

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

Apêndice 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE