

**IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES
EM PACIENTES COM CÂNCER DE CANAL ANAL E SUA
INTERAÇÃO COM VÍRUS HPV**

DANIELA DE JESUS FERREIRA COSTA

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

Oncologia: Área de concentração

Orientadora: Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Co-Orientadora: Dra. Rachel Simões Riechelmann

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

F383i Ferreira Costa, Daniela de Jesus

Identificação de células tumorais circulantes em pacientes com câncer de canal anal e sua interação com vírus HPV / Daniela de Jesus Ferreira Costa – São Paulo, 2021.

32p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores. 1. Neoplasias do Ânus/Anus Neoplasms. 2. Infecções por Papillomavirus/Papillomavirus Infections. 3. Células Neoplásicas Circulante/Circulating Neoplastic Cells

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

“O conselho da sabedoria é: Procure obter sabedoria; use tudo o que você possui para adquirir entendimento”.

(Provérbio 4:7)

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo processo de bolsa modalidade Mestrado- 2019/01567-0

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família que foi um grande suporte mesmo estando longe, sem o apoio de todos eu não teria conseguindo. Dedico também à família CTC, aos meus pacientes e familiares por acreditarem na ciência. Aos amigos que ganhei em São Paulo que me apoiaram e me receberam de braços abertos fazendo me sentir em casa. Com a presença de vocês na minha vida nesse tempo tudo se tornou mais leve, obrigada por todos os momentos inesquecíveis que irei carregar por toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Top das Galáxias, a Dra. Ludmilla Chinen que foi uma excelente mãe científica, dedicada, incentivadora, me apoiando e instruindo em todas as etapas, irei carregar seus ensinamentos por toda minha trajetória profissional. Gratidão define meus sentimentos por ela.

À minha co-orientadora, Dra. Rachel Riechelmann Simões por sugerir o estudo e participar ativamente no processo de recrutamento dos pacientes, por sua disponibilidade em esclarecer todas as dúvidas que surgiram no meio do caminho.

Agradeço a colaboração de todos os pacientes envolvidos, eles foram imprescindíveis para o desenvolvimento desse estudo, sem eles nada poderia ter sido feito.

Às colegas de laboratório, as “CTCs Lovers”: Alexia Braun pela contribuição e companheirismo em várias etapas, compartilhando seus conhecimentos comigo; Anna Carreta pelo seu coração sempre disponível em ajudar nos momentos de desespero; Jaqueline Torres por transmitir serenidade e disponibilidade em ajudar sempre que necessário; Caroline Barberan pela parceria, amizade, por ter acompanhado as padronizações e uma boa parte das filtrações, você também fez parte disso. Aprendi muito com cada uma de vocês durante esse tempo, a contribuição de cada uma foi essencial, evidenciando que ninguém faz ciência sozinho.

Não poderia deixar de agradecer ao Dr. Virgílio pela sua disponibilidade durante o desenvolvimento desse estudo, foi um grande suporte no entendimento dos quadros clínicos de cada paciente.

Agradeço também 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 e à Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) por confiar e financiar o meu estudo.

RESUMO

Ferreira Costa DJ. **Identificação de células tumorais circulantes em pacientes com câncer de canal anal e sua interação com vírus HPV.** [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

O câncer tem se tornado um grande problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsável por mais de 6 milhões de casos/ óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. O câncer de canal anal corresponde a 4% de todas as neoplasias malignas do trato digestivo baixo e tem como um dos fatores etiológicos, o vírus do papiloma humano (HPV), o que lhe confere forte associação com as doenças sexualmente transmissíveis. A imunossupressão desencadeada pelo HIV também pode acelerar a progressão de lesões precursoras anais associadas ao HPV. Muitos estudos têm demonstrado que as células tumorais circulantes (CTCs) são bons marcadores para avaliação da evolução tumoral. Além disso, essas células são úteis no monitoramento da resposta ao tratamento, contribuindo para avanços na medicina personalizada. O presente estudo teve como objetivos principais: 1) quantificar as CTCs das coletas de primeiro e segundo momento; 2) Correlacionar os achados das análises com evolução clínica dos pacientes. Foram coletadas 24 amostras de sangue total de pacientes com câncer de canal anal localizado e candidatos a tratamento definitivo com quimio-radioterapia. Os pacientes tiveram aproximadamente 10 ml de sangue coletados em tubos EDTA em dois momentos distintos: antes do início do tratamento e após seu término. O sangue coletado foi filtrado em uma membrana pelo sistema ISET (*Isolation by SizE of Tumor Cells, Rarecells, France*). Após a filtração, as células fixadas na membrana de polycarbonato foram submetidas à quantificação e à análise por imunocitoquímica (ICC) com os anticorpos p16, CD-45, PD-L1, RAD23B, TYMS e ERCC1 e CISH para detecção da presença do RNAm do vírus HPV. O tempo mediano de seguimento foi de 11 28 meses (1,35- 16,61 meses). Entre as amostras analisadas por ICC, não encontramos nenhuma CTC marcada para p16, houve um paciente cujas CTCs marcaram para PD-L1 na primeira coleta. Dois pacientes tiveram suas CTCs expressando RAD23B na primeira coleta e um na segunda coleta. CTCs expressando TYMS foram encontradas no material de três pacientes na primeira coleta e em

um na segunda. ERCC1 estava expresso em CTCs de um paciente na primeira e de três na segunda, onde correlacionou-se com altos níveis de CTCs ($p= 0,083$) e com ausência de reposta clínica ($p= 0,09$), porém, sem significância estatística. Nenhuma CTC marcou para CD-45, sendo este anticorpo usado somente para garantir a depleção de leucócitos. Por meio do CISH conseguimos verificar a positividade para HPV nas CTCs em 14 pacientes dos 15 incluídos no estudo na primeira coleta. Os parâmetros obtidos aqui podem ser clinicamente úteis para o melhor monitoramento dos pacientes com câncer de canal anal não metastático, porém, estudos futuros com uma coorte maior precisam ser feitos.

Descritores: Neoplasias do Ânus, Infecções por Papillomavirus, Células Neoplásicas Circulantes

ABSTRACT

Ferreira Costa DJ. **[Identification of circulating tumor cells in patients with anal canal cancer and their interaction with HPV viruses]**. [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

Cancer has become a major public health problem in developed and developing countries, accounting for more than 6 million cases of death each year, representing about 12% of all causes of death in the world. Anal canal cancer corresponds to 4% of all malignant neoplasms of the lower digestive tract and has as one of its etiological factors, the human papilloma virus (HPV), which gives it a strong association with sexually transmitted diseases. Immunosuppression triggered by HIV can also accelerate the progression of anal precursor lesions associated with HPV. Many studies have shown that circulating tumor cells (CTCs) are good markers for assessing tumor evolution. In addition, these cells are useful in monitoring the response to treatment, contributing to advances in personalized medicine. The present study had as main objectives: 1) To detect CTCs in patients with cancer of the located anal canal and to identify the presence of the HPV virus in these cells; 2) assess whether there is a relationship between presence of HPV and the number of CTCs, correlating the findings with the clinical evolution of patients through the analysis of medical records. Whole blood samples were collected from patients with cancer of the localized anal canal, candidates for definitive treatment with chemotherapy. The patients had approximately 10 ml of blood collected in EDTA tubes at two different times: before the start of the chemotherapy treatment and after the end of the treatment. The collected blood was filtered on a membrane by the ISET device (*Isolation by SizE of Tumor Cells*). After filtration, the cells were fixed on the polycarbonate membrane and subjected to quantification and immunocytochemistry (ICC) analysis with antibodies p16, CD-45, PD-L1, RAD23b, TYMS and ERCC1. The median follow-up was 11 28 months (1,35- 16,61 months). There were collected 24 blood samples. Among the samples analyzed by ICC, we did not find any CTC marked for p16. There was one patients whose CTCs stained for PD-L1 in the first collection, two who marked for RAD23B in the first collection and one in the second collection. Three patients had CTCs marked for TYMS in the first collection and one on the second collection. ERCC1

was expressed in CTCs from one patient on the first and in three on the second collection and correlated with higher numbers of CTCs at this moment ($p= 0,083$) and with absence of clinical response ($p= 0,09$), although without statistical significance. No CTC stained for CD45, as this antibody was used only to guarantee leukocyte depletion. Through CISH, we verified positivity for HPV in CTCs in 13/15 patients in the first blood collection. The parameters obtained here can be clinically useful for better monitoring of patients with non-metastatic anal canal cancer, however, future studies with a larger cohort need to be done.

Keywords: Anus Neoplasms, Papillomavirus Infections, Circulating Neoplastic Cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Proteína E6 e E7 do vírus HPV.....	19
Figura 2	Via de reparo por excisão de nucleotídeos.....	20
Figura 3	O eixo PD-1/PD-L1.....	22
Figura 4	Modelo dos mecanismos de reconhecimento de danos no NER	23
Figura 5	Ativação da TS e a competição do Fluoroucil com substrato	24
Figura 6	Micrografia de CTC, controle positivo.....	43
Figura 7	Fotomicrográfica de CTCs com marcadores.....	46
Figura 8	Fotomicrográfica de CTCs controle negativo.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genótipos do vírus HPV.....	18
Tabela 2	Relação entre os genes do Papilomavírus humano e suas requeridas funções.....	19
Tabela 3	Tecnologia disponíveis para isolamento de CTCs	18
Tabela 4	Padronização dos anticorpos utilizados na expressão proteica	38
Tabela 5	Descrição dos controles negativos dos marcadores utilizados no estudo	38
Tabela 6	Características clínico-patológicas dos pacientes.....	41
Tabela 7	Níveis de CTCs em cada paciente no primeiro e segundo momento	42
Tabela 8	Identificação do p16 no tumor primário e do vírus HPV nas CTCs	43
Tabela 9	Descrição da expressão protéica nas CTCs dos pacientes com câncer de canal anal no primeiro e segundo momento	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CGT	Células germinativas tumorais
CISH	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica
CTC	Células tumorais circulantes
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERCC1	<i>Excision Repair</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Vírus do papiloma humano
ICC	Imunocitoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISCT	<i>Isolation by Size of Tumor Cells</i>
MRP1	<i>Multidrug Resistance Protein 1</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-L1	<i>Programmed Death Ligand 1</i>
RAD23B	<i>UV excision repair protein, homolog B</i>
RC	Resposta completa
RP	Resposta parcial
TARV	Terapia antirretroviral combinada
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TYMS	Thymidylate synthase
UV	Ultravioleta
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum</i> um grupo de complementação A
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum</i> um grupo de complementação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Canal Anal e a Presença do Papiloma Vírus Humano e o Vírus da Imunodeficiência Humana	1
1.2	Proteína P16	4
1.3	Proteína ERCC1	4
1.4	Proteína PDL1.....	7
1.5	Rad23B.....	8
1.6	Proteína TYMS.....	9
1.7	Células Tumorais Circulantes (CTC)	10
1.8	Isolamentos de Células Tumorais Circulantes	12
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Secundários	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1	Desenho do Estudo	20
3.2	Contagem de Ctcs	21
3.3	Expressão Protéica nas CTCs.....	21
3.4	Hibridização <i>in situ</i> Cromogênica (CISH).....	22
3.5	Análise Estatística	23
4	RESULTADOS	24
4.1	Variáveis Clínico Patológicas e sua Relação Com AS CTCS	24
4.1.1	Contagem de CTCs no primeiro momento	25
4.1.2	Presença do vírus HPV no tumor primário e nas células tumorais circulantes.....	25
4.1.3	Expressão protéica nas CTCs de primeiro momento e segundo momento	27
4.1.4	Análise do vírus HIV	29

5	DISCUSSÃO.....	30
6	CONCLUSÃO	33
7	REFERÊNCIAS.....	34

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

O câncer tem se tornado um grande problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsável por mais de 6 milhões de casos óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo (Guerra 2005). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) foi estimada a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer no Brasil para 2020. A distribuição da incidência por região geográfica mostra que as regiões Sul e Sudeste concentram 70% da ocorrência de casos novos, sendo que na região Sudeste encontra-se quase metade dessa incidência. Existe, entretanto, grande variação no número e nos tipos de câncer entre as diferentes regiões do Brasil (Ministério da Saúde 2020).

O surgimento do câncer se dá a partir de uma única célula cujo material genético sofre mutação e que se multiplica por mitose. As células descendentes passam a acumular novas mutações que, somadas, formam uma célula cancerosa. Esta, por sua vez, prolifera rápido, acaba perdendo sua capacidade de aderência e secreta enzimas que atacam a matriz extracelular, invadindo tecidos vizinhos. Essas células, também penetram em vasos linfáticos e venosos, espalhando-se pelo organismo, podendo aparecer em locais distantes do de origem, formando assim, tumores secundários conhecidos por metástases (Junqueira e Carneiro 2012).

Alguns fatores de risco também estão associados ao desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres, entre eles podemos citar o tabagismo, alimentação, radiação, infecções por determinados microrganismos como o papiloma vírus humano (HPV), vírus da hepatite B e C, o vírus *Epstein barr*, e *Helicobacter pylori* (ONCOGUIA 2018).

1.1 CÂNCER DE CANAL ANAL E A PRESENÇA DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO

O câncer de canal anal corresponde de 2 a 4% de todas as neoplasias malignas do trato digestivo na América do Norte e tem entre as suas múltiplas causas, como um dos fatores etiológicos, o vírus do papiloma humano (HPV), o que lhe confere forte

associação com as doenças sexualmente transmissíveis. Os tumores anais podem ocorrer na borda anal ou no canal anal, até a transição com o reto (Santos 2007).

A imunossupressão desencadeada pelo HIV pode acelerar a progressão de lesões precursoras anais associadas ao HPV. Embora o carcinoma de células escamosas do canal anal não seja uma doença maligna que defina a AIDS (Síndrome da imunodeficiência adquirida), as displasias e cânceres relacionados ao HPV são comuns em indivíduos infectados pelo HIV (Chiao et al. 2005). Em países de alta renda, a incidência de câncer anal aumentou nas pessoas HIV soropositivas, mesmo com introdução da terapia antirretroviral combinada (TARV), e no subsequente aumento da expectativa de vida (Lin et al. 2018).

As alterações genômicas promovidas pelo HPV vão desde mutações pontuais até o silenciamento gênico ou ativação de proto-oncogenes (Urgoiti et al. 2014). A proteína E7 do HPV oncogênico é responsável pelo aumento dos níveis de expressão de proteína p16. De acordo com esta hipótese, a disfunção da proteína pRb, através da associação com a proteína E7 do HPV, aumenta a liberação do fator de transcrição E2F, resultando em superexpressão da proteína p16. Esta por sua vez, é controlada por *feedback* negativo exercido pela pRB, levando à progressão anormal do ciclo celular (Serup et al. 2014). Portanto, a carcinogênese promovida pelo HPV é um processo de múltiplas etapas, onde mutações alteram a fisiologia das células que, assim, alteram o funcionamento do tecido.

O mecanismo molecular que permite a entrada do HPV na célula ainda não é muito bem compreendido. Entende-se que a entrada ocorra via endocitose, por vesículas cobertas por clatrina, sendo um processo lento e complexo que pode durar horas. O desnudamento do vírus, no interior da célula, permite que o DNA viral seja transportado para o núcleo. O vírus reconhece receptores específicos presentes apenas em células indiferenciadas. Por isso, a infecção inicia-se na camada basal da epiderme, com consequente formação de microlesões na pele ou mucosa (Mikulić et al. 2019; Bannach et al. 2020).

A classificação do HPV ocorre de acordo com seu potencial oncogênico. HPVs são considerados de baixo risco, associados a lesões benignas, enquanto os de alto risco são associados ao câncer (Alves et al., 2021).

Tabela 1- Genótipos do vírus HPV

TIPOS	SUBTIPOS
Alto Risco	16,18, 45 e 48
Risco Intermediário	31, 33, 35, 39, 51 e 52
Baixo Risco	6, 11, 41, 42, 43 e 44

O HPV pertence à família Papovaviridae e é constituído por uma única molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) circular duplo, contendo aproximadamente 7.900 pares de base. O genoma do HPV é organizado em três regiões: região precoce (E), região tardia (L) e região reguladora (URR) (Piotto et al. 2020). Os genes L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo viral e os genes capsídeo codificam as proteínas envolvidas na replicação viral e na transformação celular. As proteínas E1 e E2 estão envolvidas na replicação viral, a E5 parece atuar sinergicamente com o fator de crescimento epidérmico EGF (*Epidermal Growth Factor*). A proteína E6 degrada e inativa a proteína celular p53 por proteólise, mediada pela ubiquitina. Um polipeptídeo celular do hospedeiro chamado de polipeptídeo associado à E6 (E6-AP) inicialmente liga-se à E6 e o complexo E6/E6-AP atua como uma ubiquitina-ligase, conjugando ubiquitina à p53 (Calumby et al. 2020).

A degradação da p53 resulta em aumento da instabilidade genética e em acúmulo de mutações oncogênicas. Este mecanismo *in vivo* pode ser especialmente importante nas fases iniciais da progressão tumoral. A proteína E7, por sua vez, liga-se às formas hipofosforiladas da pRb (Nagib et al. 2019). Esta interação libera o fator E2F, desencadeando o processo de replicação do DNA e aumentando a proliferação das células do epitélio infectado. O gene *P16INK4a*, por sua vez, tem sua expressão controlada por *feedback* negativo exercido pela pRB. Assim, a inativação de pRB por E7 resulta no acúmulo de p16 nas células infectadas. Portanto, a carcinogênese promovida pelo HPV é um processo de múltiplas etapas sequenciais, onde mutações alteram a fisiologia das células (Fischer et al. 2017; Sem et al. 2018; Assis et al. 2019).

Tabela 2 - Relação entre os genes do Papilomavírus Humano e suas requeridas funções.

Expressão Gênica	Genes	Função
Precoce	E1	Replicação do DNA viral
	E2	Controle da transcrição e replicação
	E4	Maturação do vírus e alteração da matriz intracelular
	E5, E6, E7	Estímulo da proliferação e transformação celular
Tardia	L1	Codifica proteína principal do capsídeo
	L2	Codifica proteína secundária do capsídeo

1.2 PROTEÍNA P16

O p16 INK4a é uma proteína supressora de tumor envolvida em várias respostas celulares relacionadas ao estresse, incluindo apoptose. Linhas de evidência recentes indicam que p16 INK4a também é um modulador da expressão gênica. Em resposta a diversos tipos diferentes de estresse, p16 liga-se a CDK4 /6 e anula sua ligação a ciclinas do tipo D. Isto inibe a fosforilação mediada por CDK4/6 da proteína pRB, o que impede a transcrição mediada por E2F de genes necessários para a síntese de DNA. Existem estudos apontando que p16 INK4a modula os níveis de vários microRNAs em certos tumores como cervical, mama e cabeça e pescoço, podendo estar associado ao mau prognóstico. Além disso, a proteína p16 INK4a tem a capacidade de interagir com outras proteínas, regulando a expressão de genes envolvidos em diversos processos, como controle do ciclo celular, tumorigênese e senescência (Souza et al. 2007; Al-Khalaf et al. 2013).

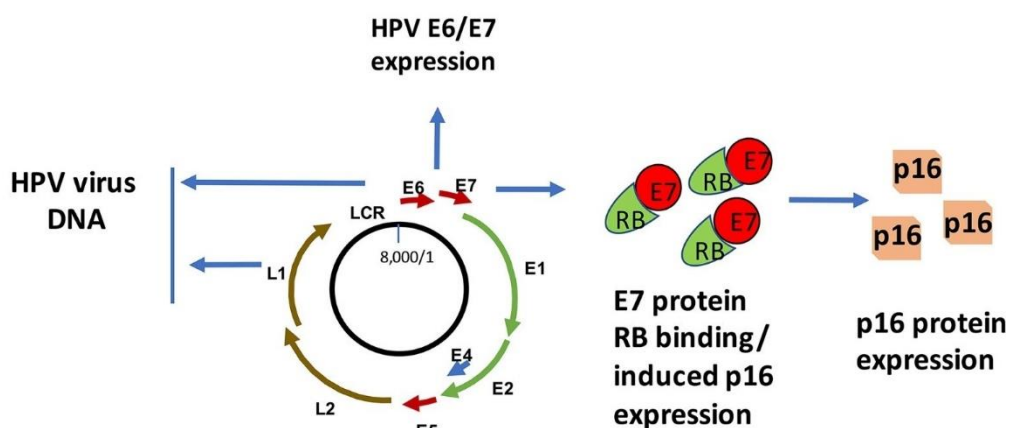


Figura 1 - HPV E6 e E7 interrompem as vias moleculares de pRb. HPV E7 inativa pRb que estimula a expressão da proteína p16 que desempenha um papel importante no ciclo celular. Sua desregulação contribui para formação de células malignas.

1.3 PROTEÍNA ERCC1

A conservação e a estabilidade da informação genética não dependem apenas de um mecanismo preciso para copiar as sequências de DNA antes da divisão celular, mas também da manutenção precisa da informação genômica pela maquinaria de reparo do DNA. Alguns fatores são responsáveis pelas lesões no DNA, como a luz ultravioleta (UV), radiações ionizantes e agentes químicos genotóxicos. As diferentes vias de reparo do DNA compartilham várias etapas durante seu processo de reparo e, às vezes, até os mesmos fatores são encontrados nas diferentes vias. Este é claramente o caso da endonuclease específica da estrutura do *Excision Repair Cross Complementing Group 1*-ERCC1 (Faridounnia et al. 2018).

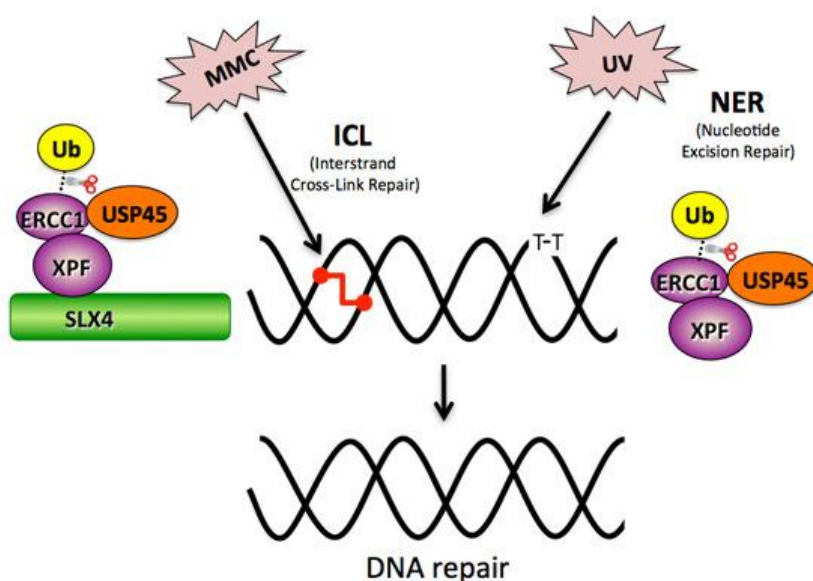


Figura 2 - Via de reparo por excisão de nucleotídeos (ERCC1)

O gene ERCC1 codifica uma proteína de 297 aminoácidos com peso molecular de 32,5 kDa, de localidade nuclear e propriedades estruturais de hélice, com capacidade de ligar-se ao DNA. A função da ERCC1 além de estabilizar a *Xeroderma pigmentos* um grupo de complementação F-XPF, inclui uma ligação funcional com toda maquinaria de

Nucleotide excision repair-NER, pois interage com *Xeroderma pigmentos* um grupo de complementação A-XPA, e contribui para seleção do substrato de DNA. Seu papel é essencial no reparo por excisão de nucleotídeos em lesões ao DNA que distorcem a hélice, particularmente nos danos causados por luz ultravioleta. O aumento da expressão de ERCC1 em tumores de pacientes expostos ao tratamento com cisplatina tem sido descrito na literatura como um fator de mau prognóstico, associado à resistência a platina e pior sobrevida global (Kim et al. 2020).

Vários estudos têm avaliado a relevância clínica do papel de ERCC1 no mecanismo de reparo de DNA em câncer de ovário, câncer gástrico, câncer colorretal, carcinoma epidermóide de esôfago, carcinoma de pulmão não-pequenas células. Em linhagens celulares de câncer de ovário e em tecido de pacientes portadores desta neoplasia, foi demonstrado que o aumento da expressão de ERCC1 estava associado à resistência à cisplatina (Castro, 2009).

Alguns estudos que avaliaram a expressão de ERCC1 por imunoistoquímica (IHC) mostraram resultados conflitantes porque isoformas distintas desse marcador são avaliadas de forma heterogênea por IHC. Já os estudos de expressão gênica mostram associação entre alta expressão de ERCC1 e resistência à platina. Um estudo clínico demonstrou que o nível de expressão de mRNA ERCC1 intratumoral foi um marcador preditivo independente de resposta antitumoral e controle de doença para pacientes tratados com quimioterapia com 5-FU e oxaliplatina em câncer colorretal metastático (Shirota et al. 2001).

1.4 PD-L1 (Programmed Death ligant 1)

A proteína 1 de morte celular programada (PD-1) desempenha um papel vital na inibição das respostas imunológicas e na promoção da autotolerância por meio da modulação da atividade das células T, ativando a apoptose das células T específicas para o antígeno e inibindo a apoptose das células T reguladoras. O Ligante de Morte Celular Programada 1 (PD-L1) é uma proteína transmembranar considerada um fator co-inibidor da resposta imune, pode se combinar com PD-1 para reduzir a proliferação de células PD-1 positivas, inibir sua secreção de citocinas e induzem a apoptose (Doroshov et al., 2021). PD-L1 também desempenha um papel importante em várias doenças malignas, onde pode atenuar a resposta imune do hospedeiro às células tumorais. Com base

nessas perspectivas, O eixo PD-1 / PD-L1 é responsável pelo escape imunológico do câncer e tem um grande efeito na terapia do câncer (Han et al., 2020).

A inibição da sinalização PD-1 / PD-L1 é uma estratégia viável para normalizar o microambiente tumoral desregulado. Até agora, os tratamentos α -PD-1 / PD-L1 exibiram atividades antitumorais potentes em vários tipos de câncer, como melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer gástrico, câncer de fígado, câncer urotelial, linfoma e todos Cânceres MSI-high (Yi et al., 2021).

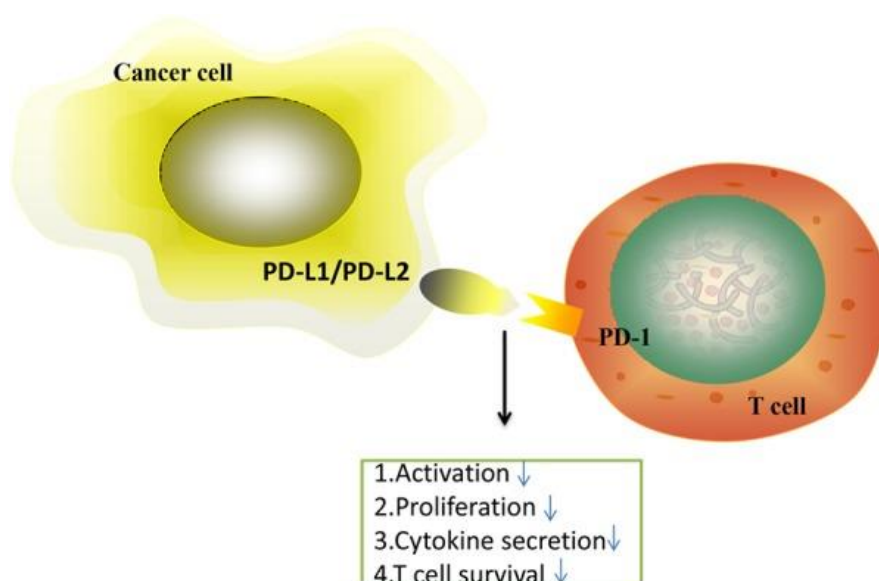


Figura 3- O eixo PD-1 / PD-L1 inibe a ativação, proliferação e sobrevivência de células T e sua secreção citotóxica.

1.5 RAD23B

É uma proteína humana de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) causados principalmente por danos através da UV. A proteína RAD23B, juntamente com o xeroderma pigmentoso do grupo C (XPC), forma um complexo envolvido na via NER do genoma global. O domínio STI1 (ligação da chaperona de choque térmico) perto do terminal C de Rad23B é importante para sua interação estreita com a proteína XPC (Li et al., 2021). O XPC é necessário para a etapa inicial de reconhecimento de danos, consistindo em seis fatores principais do NER - XPC-RAD23B, TFIIH, XPA, RPA, XPG e ERCC1-XPF - repara com eficiência grandes lesões desestabilizadoras da hélice embora seja muito ineficiente para reparar algumas não lesões desestabilizadoras, notavelmente CPDs. No entanto, os CPDs são reparados nas células, embora com

eficiência relativamente baixa, e seu reparo depende de UV-DDB, o que facilita o acesso de XPC na cromatina nas células (Um et al., 2018). Como demonstrado na imagem a baixo:

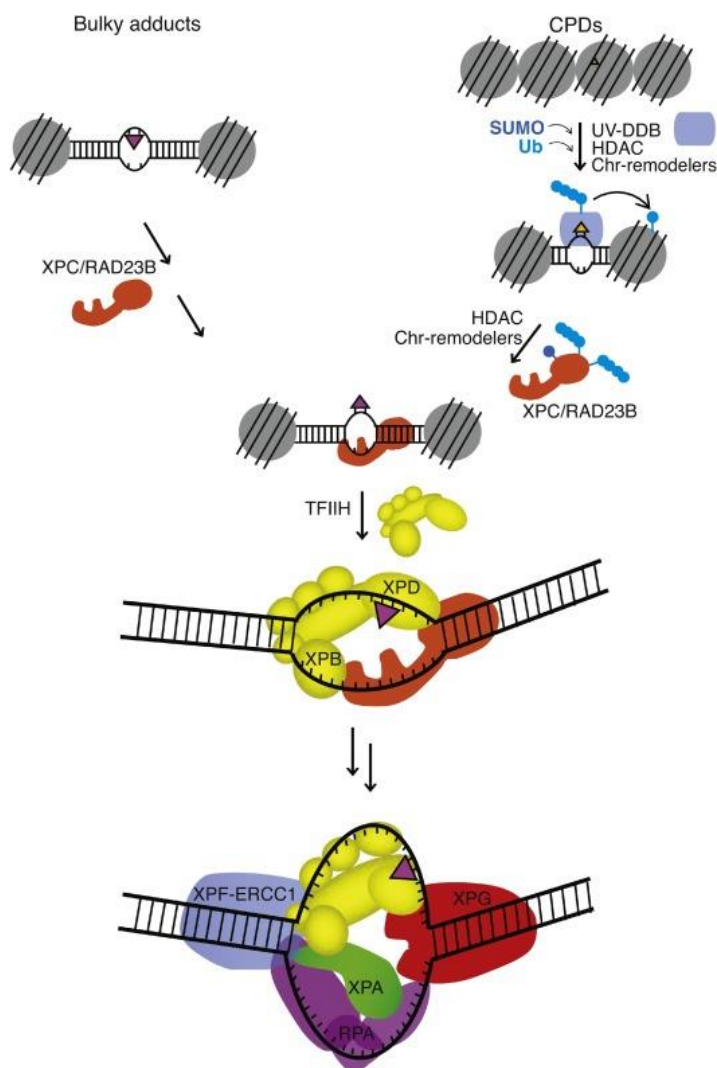


Figura 4: Modelo dos mecanismos de reconhecimento de danos no NER

1.6 TYMS (Thymidylate Synthase)

A timidilato sintase (TS) é uma enzima chave na criação da timina, um bloco de construção do DNA. A atividade da timidilato sintase nas células é geralmente muito baixa. Quantidades elevadas podem ser expressas em sistemas de expressão apropriados, geralmente em *E. coli*. A TS de diferentes fontes, como humanos, camundongos, ratos, fungos, bactérias e vírus, foram clonados e sequenciados e foi

observado que sua expressão TS é regulada de forma complexa, envolvendo vários níveis de controle, incluindo transcrição, pós-transcrição, tradução e pós-tradução DiPaolo e Chu (Ferrari et al., 2018). A expressão de TS em tumores correlaciona-se com a resposta à quimioterapia com inibidores de TS o fluorouracil compete com o substrato natural para se ligar ao sítio ativo TS. Quando ligado ao TS, o fluorouracil inibe sua atividade, interrompendo a síntese de DNA (El-Naggar et al., 2017).

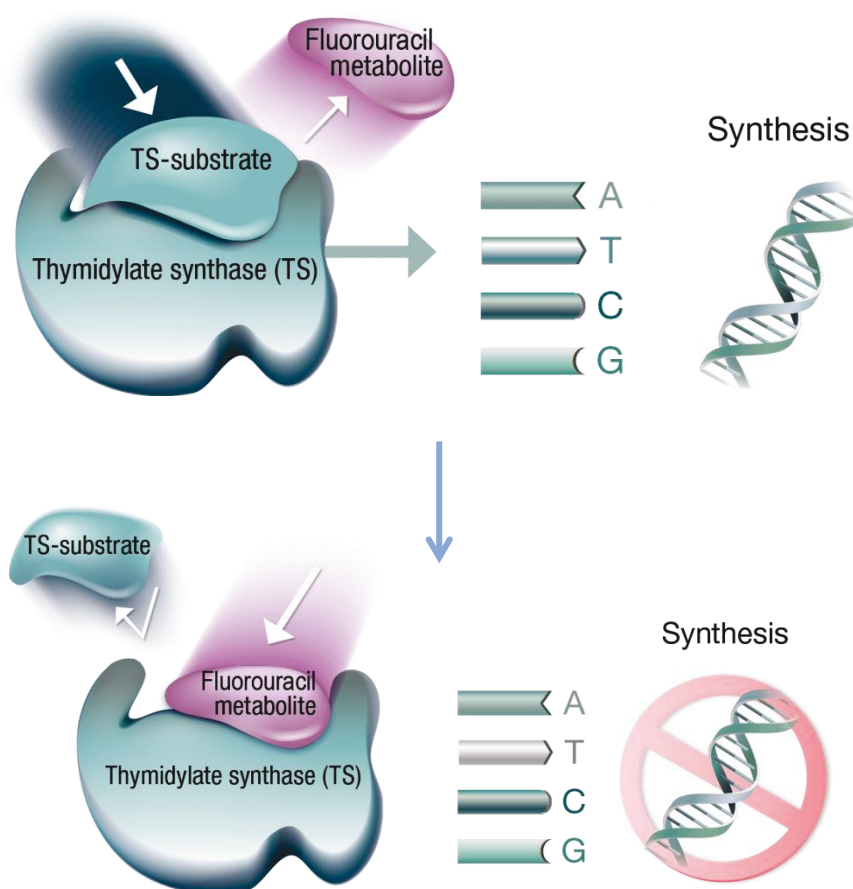


Figura 5: Ativação da TS e a competição do 6-Fluorouracil com o substrato.

1.7 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES (CTC)

As Células Tumorais Circulantes (CTCs) são células raras provenientes do tumor primário ou sítio metastático que podem ser destacadas no processo de entrada na

circulação sanguínea, e são conhecidas por desempenhar um papel importante no processo de metástase. Estas células têm características intrínsecas específicas de invasão e sobrevivência na circulação sanguínea (Pantel e Alix-Panabières 2013). O primeiro registro das CTCs foi realizado em 1869, pelo médico residente australiano Thomas Ashworth. Ele percebeu que na veia safena de um paciente havia células parecidas com as encontradas em um tumor que o mesmo paciente apresentou na parede anterior do seu tórax e abdômen (Asworth, 1869).

As CTCs têm a capacidade de formar microêmbolos que são aglomerados de três ou mais CTCs, que quando unidas, são capazes de resistir à morte na circulação sanguínea. Além disso, esses aglomerados ainda podem estar associados com leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e plaquetas, que as auxiliam no processo de escape do sistema imunológico (Krebs et al. 2014).

As células do tumor primário que caem na corrente sanguínea podem passar por um processo chamado de transição epitélio-mesênquima (TEM). São células que apresentam uma elevada capacidade de sobrevivência em ambientes inóspitos, o que lhes permite colonizar locais distintos ao da sua origem (Paterlini et al. 2007). Existe a hipótese de que as CTCs possam ser uma população celular semelhante às células iniciadoras tumorais ou células germinativas tumorais (CGT), que se originam pela diferenciação, através da TEM do tumor primário, constituído por tecido diferenciado (Mendes 2016).

As CTCs são vulneráveis à agressão imunológica, especialmente por células *Natural Killers*. 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 (Lambert et al. 2017).

As CTCs, assim como os tumores dos quais provêm, são o alvo natural dos tratamentos anti-tumorais, portanto sua persistência na circulação sanguínea pode fornecer informações importantes sobre ineficácia do tratamento antes que as metástases se desenvolvam (Rhim et al. 2012). Portanto, o estudo de CTCs mostrou ser um bom biomarcador para avaliação precoce da evolução do tumor em muitos estudos (Abdallah et al. 2015; Pantel e Alix-Panabières 2017).

1.8 ISOLAMENTOS DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

Devido à comprovação das CTCs como fator prognóstico em diversos tumores, como de mama, melanoma, pulmão, ovário, pâncreas e próstata (Ma et al. 2013), a necessidade de detecção de CTCs tornou-se cada vez mais urgente, muitas abordagens foram usadas para isolar CTCs de sangue total, incluindo separação usando pérolas imunomagnéticas e substratos nanoestruturados conjugados com anticorpos de superfície de células cancerosas, embora poucos deles tenham sido aplicados com sucesso na clínica (Van der Toom 2018). Um resumo das tecnologias disponíveis pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 3 - Tecnologias disponíveis para isolamento de CTCs

Dispositivo	Tecnologia	Tipo de tumor	Valor Clínico	Observações
Nanopartículas Magnéticas				
CellSearch (Menarini Silicon Biosystems)	Nanopartículas de ferrofluido revestidas com EpCAM para a seleção de células EpCAM +. As células capturadas são confirmadas por coloração IF de CK 8,18,19 e ausência de CD45	-Tumores metastáticos de mama, prótata e colorretal	-Prognóstico Tratamento	Aprovado pela FDA - uso de anticorpos (dependência de marcadores) -Baixa pureza do CTC capturado - Sensibilidade: 27%, 32%, 70% - Especificidade: 89%, 99,7%, 93% - Técnica de captura mais clinicamente validada
AdnaTest (Adnagen)	Esferas magnéticas revestidas com um coquetel de anticorpos (EpCAM, MUC-1, etc.). As CTC capturadas são então analisadas por painéis de genes RT-PCR multiplex	-Mama, próstata, ovário, cólon	-Prognóstico –auxílio na definição de regime de tratamento	Analisa amostras de sangue e medula óssea -Análise de RNA após-enriquecimento por RT-PCR -Alta sensibilidade -Alta contaminação com leucócitos -Limite de detecção:> 2 CTCs / 7,5 mL a -Sensibilidade: 73%
Sistema MACS (Miltenyi Biotec)	Enriquecimento imunomagnético de CTC por anticorpos de superfície contra marcados	-Câncer de pulmão não pequenas células (NSCLC) -mama (HER2+)	-Prognóstico	Identifica CTCs EpCAM negativos, mas não CK negativos. Pode funcionar com depleção de leucócitos (enriquecimento negativo por anti CD45)
MagSweeper (Illumina)	Isolamento imunomagnético de CTC por anticorpos contra EpCAM e marcadores de superfície celular de amostras de sangue não fracionadas	-Mama,-Próstata, Colorretal	-Perfil genético - Descoberta de drogas	Alta pureza de CTC capturado (quase 100%) -Processamento de alto rendimento (9mL/h) -Detecta 1-3 CTCs / mL -Sensibilidade: 100%
Microfluídica				
Microssistemas Senoidais Modulares (BioFluidica)	Combinação de três módulos para seleção, contagem e enumeração de CTCs. O chip é composto por 320 microcanais sinusoidais revestidos com anticorpos para a captura de CTC seguida de identificação fenotípica.	-Pancreático	Diagnóstico	Sensor elétrico para contagem e determinação da viabilidade -Celular enumeração é baseada no sensor de impedância -Alta pureza (> 86%) com um excelente rendimento de recuperados -Processos 7,5 mL / h
GEDI	Imunocaptura diferencial aprimorada geometricamente, em que os anticorpos contra HER2 e PSMA são imobilizados com alta especificidade de captura de sangue não processado	-Mama -Próstata	auxílio na definição de regime de tratamento -Correlação entre CTC e tumor primário	Alta especificidade de captura - Detecta até 27 CTCs / mL alta pureza (cerca de 26%) - Sensibilidade: 94%

Cont/ Tabela 2

Dispositivo	Tecnologia	Tipo de tumor	Valor Clínico	Observações
Chip em espiral (HB)	Dispositivo de mistura microfluídica de alto rendimento que permite a captura eficiente de CTC em superfícies revestidas com anticorpos	-Próstata	Análise histológica	Os estudos mínimos foram avaliados e todos são pré-clínicos -Processos 4,8 mL / h -Pode detectar até 12 CTCs / mL -A pureza do CTC capturado é de cerca de 14%
Chip GEM	Estrutura do chip de mistura aprimorada geometricamente que permite a captura aprimorada de CTC em superfícies revestidas com anticorpos	-Pâncreas	Monitoramento da resposta ao tratamento -Diagnóstico	Uso de anticorpos ou coquetel de anticorpos -Alta eficiência de seleção -Processos 3,6 mL / h
OncoCEE (enriquecimento e extração celular) (Biocept)	Chip microfluídico com superfícies internas funcionalizadas com um coquetel de anticorpos contra marcados associados a tumor e marcadores mesenquimais.	-Mama	Prognóstico e Diagnóstico, auxílio na definição de regime de tratamento	Alta probabilidade de captura de CTC -A análise de CK + e CK- CTC é viável -Sensibilidade: 95% -Especificidade: 92%
LiquidBiopsy® (Cynvenio)	Chip microfluídico com superfícies revestidas com anticorpos para seleção positiva de CTC com análise direta automatizada de DNA	-Mama -Pulmão	Perfil genético da CTC	Processa 5mL / h -20% de precisão de erro e 25% de precisão de erro -Alta pureza das células detectadas -O fluxo da bainha diminui a ligação não específica
Chip de óxido de grafeno (GO)	Nanofolhas de óxidos de grafeno funcionalizados com anticorpos de captura contra marcadores de superfície celular de CTC com alta sensibilidade	-Mama -Pâncreas -Pulmão	Prognóstico	Alto rendimento de captura -Processos 1-3 mL / h -Estudos mínimos foram avaliados e todos são pré-clínicos -Sensibilidade: 73 ± 32,4 a 3-5 células por mL de sangue
Modalidade dupla				
Ephesia (chip CTC)	Partículas micromagnéticas funcionalizadas com anticorpos EpCAM são montadas em uma plataforma microfluídica (colunas)	-Mama -NSCLC -Prostata -Colorretal	-Prognóstico -Diagnóstico	Alta especificidade de captura -Processos mais de 3 mL / h -Viabilidade das células capturadas mantida a 98% -Sensibilidade: 99,1% -Especificidade: 100%

Cont/ Tabela 2

Dispositivo	Tecnologia	Tipo de tumor	Valor Clínico	Observações
IsoFlux (Fluxion)	Uma plataforma microfluídica de fluxo controlado e sistema de grânulos de captura imunomagnética	-Mama -Próstata	-Diagnóstico	50% taxa de captura -Capacidade para detectar alterações genéticas
Separador magnético quadrupolo	Enriquecimento de CTC negativo combinando estresse de fluxo viscoso e força magnética para a recuperação de CTC não rotulado	-Mama	-Prognóstico -Tratamento	Detecta heterogeneidade entre CTC por IF -A análise de multiparâmetros é necessária -Os estudos mínimos foram avaliados e todos são pré-clínicos
CTC-iChip	Deslocamento lateral determinístico, focagem inercial e magnetoforese para isolamento rápido de leucócitos usando anticorpos anti-CD45 e anti-CD66B (enriquecimento negativo) ou esferas ativadas por EpCAM para enriquecimento CTC (enriquecimento positivo)	-Câncer positivo para EpCAM -Câncer negativo para EpCAM	Diagnóstico	Desenvolvido na Janssen Diagnostics (em andamento) - Enriquecimento positivo e negativo - Combina a separação baseada no tamanho de WBCs - Processos 8 mL / h - Baixa pureza de CTC capturado (cerca de 8%) - Limite de detecção: <30 CTCs / 7,5 mL
IsoFlux (Fluxion)	Uma plataforma microfluídica de fluxo controlado e sistema de grânulos de captura imunomagnética	-Mama -Próstata	-Diagnóstico	50% taxa de captura -Capacidade para detectar alterações genéticas
Filtração				
ISET ® (Diagnóstico Rarecells)	Isolamento e enriquecimento baseado em filtração (filtros de polycarbonato)	-Pulmão (não pequenas células) -Mama -Melanoma -Carcinoma hepatocelular	-Prognóstico -auxílio na definição de regime de tratamento	Captura de eficiência em comparação com CellSearch - <i>label-livre</i> (sem necessidade de utilização de anticorpos) -Detecção limite: 1 CTC / mL -Sensitivity: 76,37% um -Specificity: 82,39%
Sistema MetaCell ® (MetaCell Ltd.)	Enriquecimento baseado em tamanho e separação	-Esofágico -Pulmão -Pâncreas	-Diagnóstico -Prognóstico	Permite análise pós-captura e cultura de células

Cont/ Tabela 2

Dispositivo	Tecnologia	Tipo de tumor	Valor Clínico	Observações
ScreenCell[®] Cyto	Separação por exclusão de tamanho baseada em filtro e enriquecimento de CTC	-Melanoma	-Diagnósticos -auxílio na definição de regime de tratamento	Análise de pós-captura e cultura de células - Permite exames microscópicos de CTC coletados - Estudos mínimos foram avaliados e todos são pré-clínicos
CellSieve (Creatv MicroTech)	Isolamento e enriquecimento com base em micofiltro	-Mama -Próstata	-Prognóstico -Diagnóstico	Isolamento de alta eficiência em comparação com a tecnologia CellSearch -Post capture histo- e imunofenotípica caracterização de CTC
Separação por gradiente de densidade				
Coquetel de enriquecimento RosetteSep[™] CTC / Depleção EasyStep CD45 (STEMCELL Technologies)	Seleção de imunodensidade negativa para CTC usando complexos de anticorpos tetraméricos que reconhecem CD45, CD66b e glicoforina em células brancas e hemácias respectivamente	-Pâncreas -Mama	Prognóstico	As células indesejadas são direcionadas para remoção com Complexos de Anticorpos Tetraméricos que peletizam com hemácias
OncoQuick (Greiner BioOne, Frickenhansen, Alemanha)	Separação de eritrócitos e alguns leucócitos de CTC por filtração por membrana porosa seguida por centrifugação de grau de densidade para enriquecimento de CTC	-Câncer gastrointestinal - Câncer de mama avançado	-Prognóstico	Tecnologia dupla para separação de CTC com base no tamanho e densidade flutuante -Recuperação de alta taxa de células tumorais em comparação com outras técnicas de gradiente de densidade -O processamento de captura pós-CTC é possível
Cyttel	Seleção imunomagnética negativa de WBC (anticorpo CD45) seguida por centrifugação em gradiente e esfregaço de lâmina de CTC isolada	-Pulmão (não pequenas células)	-Prognóstico, auxílio na definição de regime de tratamento	Alta taxa de detecção (identificação bimodal de CTC: seleção negativa seguida de hibridização <i>in situ</i>)
AccuCyte – CyteFinder (RareCyte)	Imagem rápida automatizada de células raras únicas, CTC neste caso, precedida por separação de células baseada em densidade	Adenocarcinoma	Prognóstico	Plataforma de tecnologia dupla para análise de célula única - detecção de alta sensibilidade de CTC positivo para CD -capacidade de analisar RNA pós-captura e enriquecimento - estudos mínimos foram avaliados e todos são pré-clínicos

Cont/ Tabela 2

Dispositivo	Tecnologia	Tipo de tumor	Valor Clínico	Observações
Dieletroforese				
DEPArray™ (Silicon Biosystems)	Move “gaiolas” dieletroforéticas para captura de células juntamente com sequenciamento Sanger	-Mama	Monitoramento de tumor e tratamento -Prognóstico	Isolamento de CTCs individuais para análise de genes <i>downstream</i>
ApoStream® (ApoCell)	Detecção de CTC com base em fracionamento de fluxo de campo dieletrofórico (DEP-FFF) em uma câmara microfluídica	-Mama	-N / D	Detecção independente da expressão de EpCAM; útil para análise de viabilidade e processos de cultura mais de 10 mL / h - Os estudos foram avaliados em configurações pré-clínicas

Fonte: adaptada de Habli et al.(2020)

Em comparação com as tecnologias acima mencionadas, a tecnologia *Rarecells Diagnostics, France*)-ISET oferece uma série de vantagens, incluindo retenção da morfologia celular, isolamento não dependente de antígeno, capacidade de capturar CTCs induzidas por transição epitélio-mesênquima (TEM), alta sensibilidade com alta especificidade (Chen et al. 2017). O isolamento de CTCs com base no tamanho, em que as células tumorais derivadas do epitélio são consideradas maiores e mais rígidas do que a maioria se tornou uma técnica amplamente utilizada devido à sua operação padronizada e taxa de recuperação notória (Sun et al. 2018).

O sistema ISET permite a identificação de CTCs com diferentes fenótipos. A separação baseada no tamanho baseia-se na suposição de que as CTCs são maiores do que os outros componentes do sangue. As células são enriquecidas por filtração através de membranas filtrantes com poros de 8 µm de diâmetro e as células enriquecidas são subsequentemente coradas no filtro e caracterizadas por imunofluorescência ou imunocitoquímica (ICC) (Van et al. 2018).

Voltando ao CEC de canal anal, sabemos que é curado em aproximadamente 70% dos casos com o tratamento definitivo de quimio-radioterapia. Porém, entre 20 a 30% dos pacientes apresentam recorrência da doença, sendo tratados, como forma de resgate, com amputação anorretal – o que causa um grande impacto na qualidade de vida do paciente. Além do estadiamento e infecção por HIV, marcadores de resistência ao tratamento com quimio-radioterapia são pouco conhecidos. A infecção pelo HPV foi sugerida como fator de melhor prognóstico em CEC anal (Parwaiz 2019). Contudo, este é um tema controverso, já que mais de 90% dos pacientes com CEC anal apresentam a infecção pelo HPV e presença do vírus no tecido tumoral. Portanto, novas técnicas e marcadores para estimar o prognóstico desses pacientes se fazem necessários. Nesse contexto, a pesquisa quantitativa e qualitativa (com pesquisa de marcadores preditivos) de CTC para identificar doença residual mínima após o tratamento definitivo pode auxiliar na estratificação do prognóstico de pacientes com CEC anal, bem como identificação de marcadores preditivos de eficácia a quimio-radioterapia, auxiliando no desenho de novas estratégias terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de CTCs em pacientes com câncer de canal anal e verificar se é possível identificar a presença do vírus HPV nestas células.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Quantificar as CTCs das coletas de primeiro e segundo momento;
- Avaliar expressão protéica de p16 (marcador indireto da infecção pelo vírus HPV), PD-L1 (*Programmed Death ligant 1*), RAD23B (confere a resistência ao tratamento com radioterapia), ERCC1 (relacionado a via de reparo por excisão de nucleotídeos), TYMS (confere a resistência ao tratamento a 5-FU), nas CTCs nos dois momentos e possível associação com resposta ao tratamento
- Avaliar os achados das análises quantitativas de CTCs e de presença de HPV nas CTCs e possível associação com resposta ao tratamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Este foi um estudo de coorte prospectivo. Toda a identificação ocorreu por meio de códigos, preservando a identidade do paciente. O período das coletas ocorreram entre 01/07/2019 a 23/11/2020.

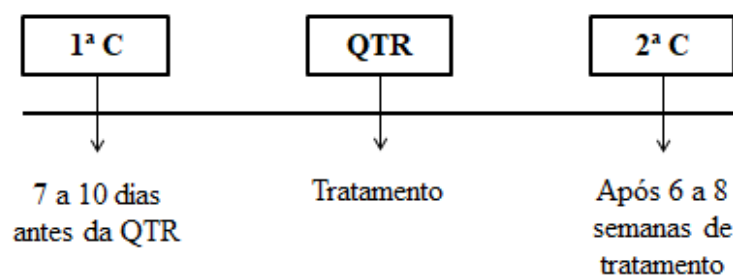
Critérios de Inclusão foram:

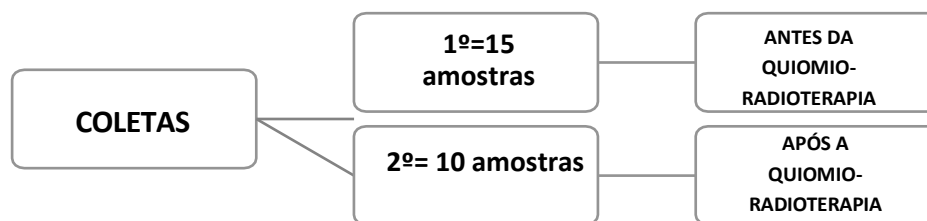
- Idade igual ou superior a 18 anos;
- Pacientes com carcinoma epidermóide do canal anal (EC I a III) confirmados por análise histopatológica;
- Pacientes candidatos a iniciar tratamento com quimio-radioterapia definitiva com intenção curativa.

Critérios de Exclusão:

- Pacientes com outro tumor ativo, de qualquer tipo.

Para os pacientes com câncer de canal anal estádios I a III, foram realizadas duas coletas de amostras de sangue por paciente, num total de 25 amostras: a primeira coleta foi realizada de 7 a 10 dias antes da quimio-radioterapia definitiva, com platina e 5-Fluorouracil (*baseline*) e a segunda (*1ª follow-up*) em 6 a 8 semanas após a quimio-radioterapia. Este período foi escolhido por ser o primeiro momento de avaliação de resposta ao tratamento.





As variáveis clínicas avaliadas em nosso estudo foram: Idade, estadiamento, o tamanho do tumor, a infiltração linfonodal, presença de metástases e desfecho clínico.

3.2 CONTAGEM DE CTCs

Amostras de sangue com (10 mL) foram coletadas em tubos contendo EDTA, mantidos à temperatura ambiente e processados dentro de 4 horas, diluídos a 1:10 em um tampão de lise de eritrócitos e filtrados pela tecnologia ISET. Após a filtração, as membranas foram lavadas com PBS, secas *overnight* e estocadas a -20°C até a análise. Antes de serem colocadas em lâminas, as membranas foram hidratadas. Depois disso, foi realizada a captura antigênica (com anticorpos anti-p16, anti-CD45, anti-TYMS, anti-PD-L1, anti- RAD23b e anti-ERCC1). Posteriormente a reação foi visualizada com DAB. As lâminas foram visualizadas em microscópio de luz branca. As CTCs foram caracterizadas baseadas nos seguintes critérios: tamanho nuclear maior ou igual a 10µm, irregularidade no formato nuclear, presença de citoplasma visível, alta proporção núcleo-citoplasma (> 0.8) (Krebs et al. 2012).

3.3 EXPRESSÃO PROTÉICA NAS CTCs

Para a realização das imunocitoquímicas, os *spots* das membranas foram cortados e colocados em placas de 24 poços. Cada *spot* foi hidratado com 160µl de TBS por 10 min. As células foram então permeabilizadas em 160 µl de TBS 0,2% Triton X-100 por 5 min à temperatura ambiente. Após uma nova lavagem com TBS, as membranas foram incubadas por 15 min, no escuro e à temperatura ambiente com uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio e lavadas novamente com TBS. Em seguida, o anticorpo foi aplicado ao *spot* e

incubado por uma hora (Anticorpos citados abaixo na tabela 1). A membrana foi lavada novamente com TBS, incubada por 30 min em *Dual long system HRP* (Dako MT) e revelado pelo cromógeno DAB (Dako MT) por 5 min. Para finalizar os *spots* foram corados com hematoxilina por um min e aderidos às lâminas por meio aquoso.

Tabela 4 - Padronizações dos anticorpos utilizados para verificação da expressão protéica nas CTCs dos pacientes com câncer de canal anal.

Anticorpo	Diluição	Código	Fabricante	Controle positivo (linhagem celular)
p16	1:100	MA5-17054	INVITROGEN	HEK923
PDL_1	1:300	AB205921	ABCAM	HCT8
RAD23B	1:500	AB86781	ABCAM	PC3
ERCC1	1:100	SAB4500795	SIGMA	A549
TYMS	1:250	WHO0007298M1	SIGMA	A549
CD-45	1:300	AB10554	ABCAM	leucócitos

Tabela 5 - Descrição dos controles negativos dos marcadores utilizados no estudo.

Anticorpo	Diluição	Código	Fabricante	Controle negativo (linhagem celular)
p16	1:100	MA5-17054	INVITROGEN	MCF7
PDL_1	1:300	AB205921	ABCAM	MCF7
RAD23B	1:500	AB86781	ABCAM	A549
ERCC1	1:100	SAB4500795	SIGMA	MCF7
TYMS	1:250	WHO0007298M1	SIGMA	SKOV
CD-45	1:300	AB10554	ABCAM	MCF7

3.4 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU CROMOGÊNICA (CISH)

Para a realização da técnica de CISH, foram recortados os *spots* da membrana e colocados na placa de 24 poços. As células foram hidratadas com TBS 1X por 5 min (T.A), logo após houve a incubação as células com peróxido de hidrogênio por 5 min (T.A), seguido de lavagem com H₂O destilada 1X. Prosseguimos com a incubação das células com pepsina citológica por 4 min (T.A), lavamos com H₂O destilada 1X e etanol 90%. Após essa etapa foi pipetado 10 µl da sonda ZytoFast CISH para DNA em cada *spot*, as membranas foram incubadas em um hibridizador para desnaturação por 15 min a 75° C. Em seguida, a temperatura do hibridizador foi diminuída para 37° C, por uma hora, para anelamento. Logo, os *spots* foram lavados por 5min em TBS 1X T. Aplicamos 10 µl do *mouse-Anti-DIG* (AB1), seguido de incubação por 30 min a 37 ° C na câmara úmida. Os *spots* foram lavados por 1 min em TBS 1X T.A, foi aplicado 10 µl do polímero *anti-mouse-HRP* (AB2), incubado por mais 30 min a 37° C na câmara úmida, seguido de lavagem por 1 min em TBS 1X T.A. Aplicamos 10 µl DAB em cada *spot* e incubamos por 20 min a 37 ° C na câmara úmida e lavamos os *spots* 1X por 1 min em H₂O destilada. Para finalizar, os *spots* foram corados com hematoxilina por 2 min, lavados em H₂O destilada (2X) e as lâminas foram montadas em meio aquoso.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo seguiu os preceitos éticos estabelecidos pela resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CONEP) que trata de pesquisas que envolve seres humanos direta ou indiretamente, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP de nossa instituição com registro nº 2669/19 (Anexo 1).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Este estudo foi somente de caráter descritivo. Todos os cálculos de seguimento de média, mediana e frequência foram realizados por meio do software SPSS versão 25.

4 RESULTADOS

4.1 VARIÁVEIS CLÍNICO PATOLÓGICAS E SUA RELAÇÃO COM AS CTCs

Foram incluídos 15 pacientes no período de 07/2019 a 11/2020. No primeiro momento (antes da quimio-radioterapia), foram coletadas amostras dos 15 pacientes, no segundo momento após o tratamento (6 a 8 semanas) houve a coleta somente de 10 pacientes por perda de seguintes motivos: óbito, cancelamento do termo de consentimento e falha na triagem. O tempo de seguimento mediano foi de 11,28 meses (variando de 1,35 a 16,66 meses). As características clínico-patológicas dos pacientes estão descritas na Tabela 2. Dos pacientes incluídos 11 (73,33) eram mulheres e 4 (26,66%) eram homens. A idade mediana foi de 61 anos e variou entre 43-73 anos.

Tabela 6 - Características clínico-patológicas dos pacientes envolvidos neste estudo

Variáveis	Nº	%
Número total de pacientes	15	100
Idade ao entrar no estudo, em anos		
Mediana	61	
Variação	43-73	
Gênero		
Feminino	10	73,33%
Masculino	5	26,66%
Estadiamento		
I	1	6,7%
II	1	6,7%
IIA	1	6,7%
IIB	1	6,7%
IIIA	3	20%
IIIB	1	6,7%
IIIC	7	46,7%
Tamanho do tumor (T)		
T1	1	6,7%
T2	5	33,3%
T3	6	40%
T4	3	20%
Acometimento Linfonodal (N)		
N0	5	33,3%
N1	10	66,7%

4.1.1 Contagem de CTCs no primeiro momento

A mediana de CTCs encontrada no grupo estudado foi de 0,66 CTC/ml (0-3,33) na primeira coleta. Na coleta de segundo momento obtivemos uma mediana de 1,96 CTC/ml (0-7). Os níveis de CTC/ml estão disponíveis na Tabela 5.

Tabela 7 - Níveis de CTCs em cada paciente nas coletas de primeiro, segundo momento e a resposta ao tratamento.

Casos	Contagem de CTCs/mL 1C	Contagem de CTC/mL 2C	Resposta
1	3,33	2,66	RC
2	0,33	2,66	RP
3	0,33	0	RC
4	1,3	0	RC
5	1	6,33	ÓBITO
6	1	2,33	RP
7	0	0	RP
8	0,33	7	RC
9	0,33	1,6	RP
10	0	0	RC
11	0	0	RP
12	0,33		RP
13	0,66		RC
14	2,33		RC
15	0,66		RC

Abreviaturas: RC: resposta completa; RP: resposta parcial.

4.1.2 Presença do vírus HPV no tumor primário e nas células tumorais circulantes

Por meio da técnica de Hibridização *in situ* cromogênica (CISH), conseguimos identificar o vírus HPV em CTCs nas coletas de primeiro e segundo momentos.

Como a expressão de p16 encontra-se aumentada nos tumores HPV positivos, sua expressão em tumores primários é usada na rotina como “surrogate” para definir infecção por HPV (Woellner et al. 2021).

Por meio do CISH, conseguimos verificar a positividade para HPV nas CTCs em 14 pacientes dos 15 incluídos (93,3%) no estudo, na primeira coleta e em 10/15 (66,6%) pacientes na segunda coleta (Tabela 7). Na análise do tumor primário 100% dos pacientes eram positivos para HPV.

Tabela 8 - Identificação do p16 no tumor primário e do vírus HPV nas CTCs.

PAC	P16 no TUMOR	HPV CISH 1C	HPV CISH 2C	RESPOSTA CLÍNICA
1	POS	S. CÉLULA	POS	RC
2	POS	POS	POS	RP
3	POS	POS	NEG	RC
4	POS	POS	POS	RC
5	POS	POS	ÓBITO	ÓBITO
6	POS	POS	POS	RPL
7	POS	POS	POS	RP
8	POS	POS	POS	RC
9	POS	POS	POS	RP
10	POS	POS	NEG	RC
11	POS	POS	POS	RP
12	POS	POS	D	RP
13	POS	POS	D	RC
14	POS	POS	D	RC
15	POS	POS	D	RC

Abreviaturas: Neg: CTC negativas, pos: CTC positivas; RC: resposta completa; RP: resposta parcial; D: descontinuou.

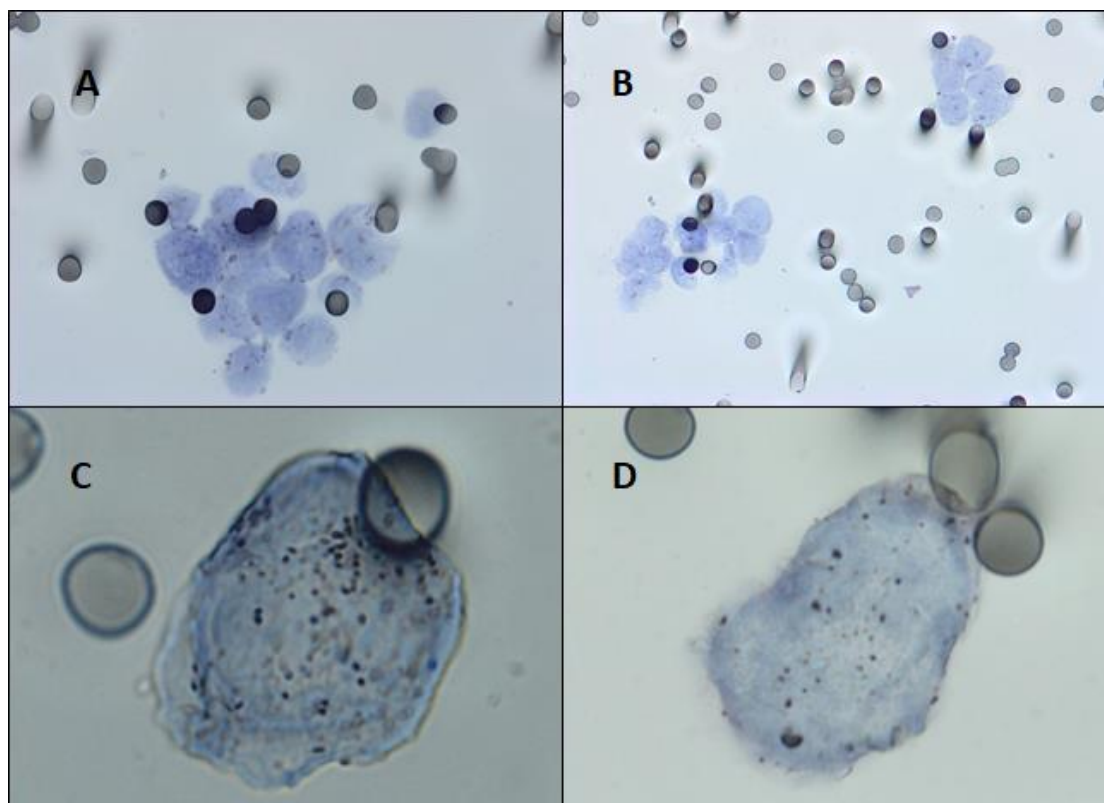


Figura 6 - Micrografia de CTCs. A e B: Controle positivo da técnica de CISH na linhagem Caski; C e D: CTCs de paciente com câncer de canal anal marcadas com a sonda para HPV.

4.1.3 Expressão protéica nas CTCs de primeiro momento e segundo momento

Avaliamos a expressão de proteínas nas CTCs supostamente envolvidas na resistência a quimio-radioterapia (Rad23b), à infecção pelo vírus HPV (p16), controle imunológico (PD-L1), enzima envolvida na resistência ao 5-FU (TYMS), via de reparo após tratamento com cisplatina (ERCC1) e CD45 como marcador de leucócitos, sendo usado somente como controle negativo, para termos certeza que as células analisadas de fato eram CTCs (Tabela 7). Na coleta de segundo momento observamos a expressão significativa da proteína do grupo de complementação cruzada de reparo de excisão de nucleotídeos (ERCC1), sendo um marcador preditivo para resistência ao tratamento com cisplatina.

Tabela 9 - Descrição da expressão protéica nas CTC dos pacientes com câncer de canal anal no primeiro momento.

Paciente	CTC/ml 1C	P16	PD-L1	Rad23B	TYMS	ERCC1	CTC/ml 2C	P16	PD-L1	Rad23B	TYMS	ERCC1	Resposta Clínica
		1C	1C	1C	1C	1C		2C	2C	2C	2C	2C	
1	3,33	neg	neg	pos	pos	pos	2,66	neg	neg	pos	neg	neg	RC
2	0,33	neg	neg	neg	neg	neg	2,66	neg	ng	neg	pos	pos	RP
3	0,33	neg	neg	neg	neg	neg	0	neg	neg	neg	neg	neg	RC
4	1,3	neg	neg	neg	neg	neg	0	neg	neg	neg	neg	neg	RC
5	1	neg	neg	neg	pos	neg	ÓBITO	neg	NC CTC	NC CTC	NC CTC	NC CTC	ÓBITO
6	1	neg	pos	pos	pos	neg	6,33	neg	neg	neg	neg	pos	RP
7	0	-	-	-	-	-	2,33	neg	neg	neg	neg	neg	RP
8	0,33	neg	neg	neg	neg	neg	0	neg	neg	neg	neg	neg	RC
9	0,33	neg	neg	neg	neg	neg	7	neg	neg	neg	neg	pos	RP
10	0	neg	neg	neg	neg	neg	1,6	neg	neg	neg	neg	Neg	RC
11	0	neg	neg	neg	neg	neg							RP
12	0,33	neg	neg	neg	neg	neg							RP
13	0,66	neg	neg	neg	neg	neg							RC
14	2,33	neg	neg	neg	neg	neg							RC
15	0,66	neg	neg	pos	neg	neg							RC

Abreviaturas: Neg: CTC negativas, pos: CTC positivas, NC: não consta CTC; RC: Resposta completa; RP: Resposta parcial.

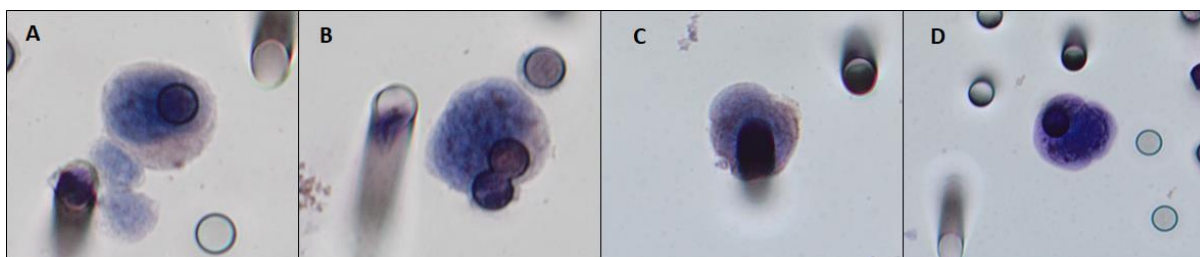


Figura 7 - Fotomicrográficas de CTCs marcadas com os anticorpos A: PD-L1, B: RAD23B, C: TYMS e D: ERCC1.

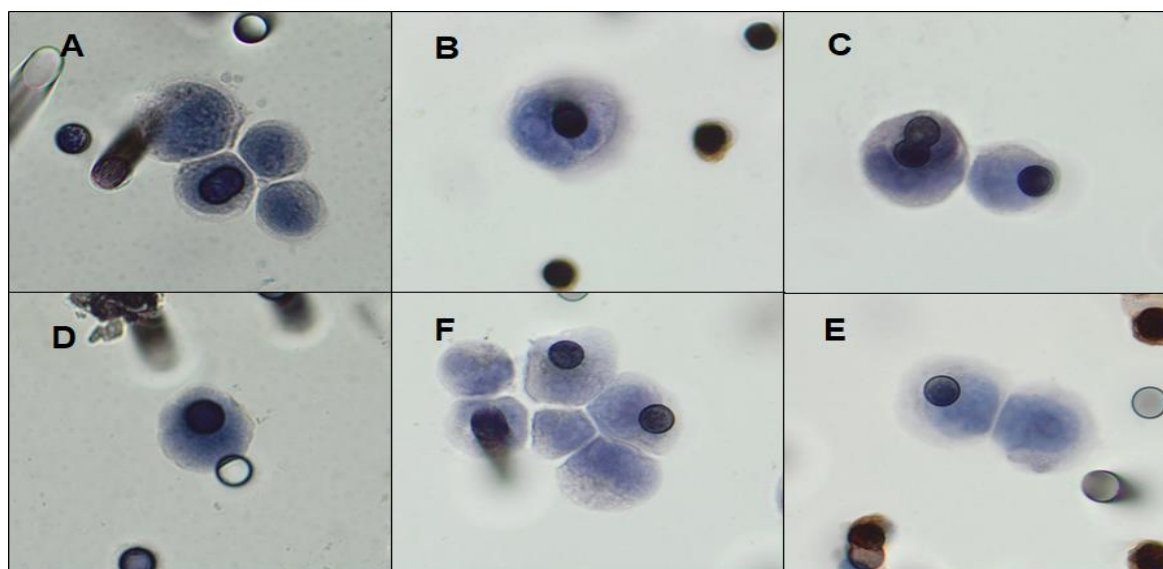


Figura 8 - Fotomicrográficas de CTCs controles negativo. A: p16 linhagem MCF 7; B: CD45 linhagem mcf7; C: ERCC1 linhagem MCF7; D: TYMS linhagem SKOV; F: RAD23B linhagem A549; E: PDL1 linhagem mcf7.

4.1.4 Análise do vírus HIV

Por meio das análises de dados dos prontuários disponibilizados pelo sistema *TASY* observamos que nenhum dos 15 pacientes incluídos no nosso estudo era HIV positivos.

5 DISCUSSÃO

Os pacientes incluídos no nosso estudo apresentavam CEC de Canal Anal não metastático, com estadiamento entre I a III. Eles foram submetidos ao protocolo de tratamento com Químio-radioterapia definitiva, com Cisplatina associada com 5Fluorouracil, sem intenção cirúrgica. Todos os pacientes incluídos do estudo eram p16 positivo no tumor primário e HPV positivo nas CTCs. Após o tratamento observamos que 76,92% tiveram resposta completa ao tratamento e 23,07% tiveram resposta parcial. De acordo com o nosso estudo todos os pacientes apresentam células tumorais circulantes.

Com esse estudo conseguimos identificar HPV nas CTCs em 100% dos casos através da técnica de CISH. Além de quantificar as CTCs, observamos que a presença da expressão de ERCC1 em alguns pacientes poder estar correlacionado com a resposta parcial ao tratamento.

Até recentemente, nosso era o primeiro estudo a avaliar CTCs em câncer anal. Porém, Carter et al. (2020) publicaram um estudo conseguindo identificar CTCs em 7/8 pacientes com câncer de canal anal localizado não metastáticos, através da técnica de citometria de fluxo. Eles observaram células nucleadas não hematológicas que expressavam marcadores de superfície de células epiteliais caracterizadas como CTCs. Contudo, diferentemente do nosso estudo, não identificaram o vírus no interior das CTCs e nem tiveram tempo de seguimento suficiente para correlacionar as CTCs com desfechos clínicos.

Em nosso trabalho também conseguimos observar uma maior expressão do marcador ERCC1 no segundo momento da coleta, após 6 a 8 semanas do término do tratamento com químio e radioterapia, sugerindo um indicativo para o monitoramento a resposta ao tratamento com cisplatina. HE et al. (2020) demonstraram em seu estudo que a expressão de ERCC1 em pacientes com câncer de pulmão tem uma influência negativa na eficácia ao tratamento à base de cisplatina. Chebouti et al. (2017) descreveram em seu estudo que CTCs com expressão de ERCC1 podem ser biomarcadores preditivos independentes para resistência à platina e mau prognóstico de câncer de ovário. Entretanto, Friboulet et al. (2013) descreveram em seu estudo a capacidade do gene ERCC1 gerar 4 isoformas (classificadas como: 201, 202, 203 e 204) por *splicing* alternativo, destacando os vieses técnicos que podem interferir com o uso do sinal imunohistoquímico para ERCC1 como um biomarcador preditivo de quimioterapia adjuvante à base de platina. Os

anticorpos atualmente disponíveis não têm discriminação adequada para a tomada de decisão terapêutica em relação ao tratamento contendo cisplatina, o que requer a detecção específica das 4 isoformas para confirmar a sua capacidade funcional no reparo de DNA.

Muitos estudos do nosso grupo relataram a importância da biópsia líquida justamente por essa possibilidade de realizar o monitoramento do tumor do estágio inicial até o final do tratamento, focando no significado prognóstico, resistência ao tratamento e compreensão no processo de metástase. Abdallah et al em 2016 publicaram um estudo sobre a identificação de proteínas que conferem resistência ao tratamento com quimio e radioterapia para prever a resposta e melhorar seleção da terapia para os pacientes. Conseguiram apontar *Multidrug Resistance Protein 1*-MRP1 como um potencial biomarcador de resistência ao tratamento com irinotecano, quando expresso em CTCs de pacientes com mCRC. Fanelli et al. (2017) descreveram os resultados de um estudo envolvendo a relação entre a expressão de TGF β RI em CTCs e microêmbolos, correlacionando essa expressão com pior sobrevida livre de progressão. Num estudo de 2021, de Abdallah et al. usando a mesma técnica, conseguiram detectar altas taxas de CTC em pacientes com câncer colorretal localizado, a sua interação com plaquetas e a presença de microêmbolos, demonstrando a eficácia do método para diferentes tumores na identificação das CTCs.

Por termos utilizado o método de isolamento ISET, livre de marcadores epiteliais, conseguimos ter a possibilidade de identificar a presença do vírus HPV nas CTCs pela técnica de CISH. Takakura et al. (2018) publicaram um estudo que comprovou a possibilidade de identificação do vírus HPV em CTC de pacientes com tumor cervical. No seu estudo eles conseguiram identificar através de biologia molecular, reação em cadeia da polimerase (PCR) que as CTCs dos pacientes originaram-se de células cancerígenas infectadas com o vírus HPV. Economopoulou et al. (2019) conseguiram também avaliar a viabilidade da detecção da expressão de HPV16 E6 / E7 em CTCs e sua utilidade como ferramenta de prognóstico em carcinoma de células escamosas orofaríngeo associado a HPV16.

Pela análise dos nossos resultados em CTCs podemos notar que essas células têm a capacidade de mostrar o estado atual da doença além de expressar importantes marcadores como o ERCC1 e a presença do vírus HPV, que parece estar associado com 100% dos casos de pacientes com câncer de canal anal, se mostrando um marcador indicativo nesse tipo de tumor.

Este estudo teve algumas limitações como a pequena quantidade de pacientes incluídos, o prazo somente de dois anos para seu recrutamento e a pequena quantidade de DNA de CTC para identificação do vírus HPV por PCR. Esperamos, em novos estudos, aumentar o número de pacientes, continuar analisando HPV em CTCs pela técnica de CISH para monitorar doença residual mínima e se possível, tentar realizar essa avaliação em outros tratamentos, como por exemplo, os inibidores de checkpoint imunes.

6 CONCLUSÕES

- Conseguimos identificar a presença do vírus HPV na maioria das CTCs;
- Conseguimos quantificar as CTCs nas amostras de pacientes com CEC de canal anal;
- Conseguimos observar a expressão dos marcadores ERCC11, TYMS, RAD23B e PDL1 nas CTCs;
- Além disso, parâmetros obtidos nesse estudo podem ser clinicamente úteis para o melhor monitoramento dos pacientes com câncer de canal anal não metastático, especialmente na detecção do HPV tumoral.

7 REFERÊNCIAS

Abdallah EA, Fanelli MF, Buim ME, Machado Netto MC, Gasparini Junior JL, Souza E Silva V, et al. Thymidylate synthase expression in circulating tumor cells: a new tool to predict 5-fluorouracil resistance in metastatic colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2015 Sep 15;137(6):1397-405.

Abdallah EA, Fanelli MF, Souza E Silva V, Machado Netto MC, Gasparini Junior JL, Araújo DV, et al. MRP1 expression in CTCs confers resistance to irinotecan-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2016 Aug 15;139(4):890-8.

Abdallah EA, Virgílio SS, Alexcia CB, Gasparini VA, Kupper BEC, Tarique MS, et al. A higher platelet-to-lymphocyte ratio is prevalent in the presence of circulating tumor microemboli and is a potential prognostic factor for non-metastatic colon cancer. *Translational oncology*. 2020 Jan 10; 14 (1): 109- 32 2020.

Alves, Priscila Souza. "Métodos de profilaxia para infecção do HPV no Brasil: conscientizando a educação em saúde." (2021).

Carter, T. J., Jeyaneethi, J., Kumar, J., Karteris, E., Glynne-Jones, R., & Hall, M. (2020). Identification of cancer-associated circulating cells in anal cancer patients. *Cancers*, 12(8), 2229.

Chiao EY, Krown SE, Stier E, Schrag D. A population-based analysis of temporal trends in the incidence of squamous anal canal cancer in relation to the HIV epidemic. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2005 Aug 01; 40(4): 451-55.

Chebouti Issam, Kuhlmann JD, Buderath P, Weber S, Wimberger P, Bokeloh Y, et al. ERCC1-expressing circulating tumor cells as a potential diagnostic tool for monitoring response to platinum-based chemotherapy and for predicting post-therapeutic outcome of ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017 Apr 11; 8(15): 24303–24313.

Chen F, Wang S, Fang Y, Zheng L, Zhi X, Cheng B, et al. Feasibility of a novel one-stop ISET device to capture CTCs and its clinical application. *Oncotarget*. 2017 Jan 10; 8(2):3029-3041.

Chinen LTD, Mello CA, Adballah EA, Ocea LMM, Buim M, Breve NM, 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. *OncoTargets and therapy*. 2014 Jan 12; 7(1): 1609-21.

Chinen LTD, Addajjah EA, Braun AC, Flores BCTCP, Corassa M, Sanches SM, et al. Circulating tumor cells as cancer biomarkers in the clinic. *Isolation and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells*; 2017 may 31. 1(1): 1-41.

De Macêdo Diaz MT, Addajjah EA, Rariki MS, Braun AC, Dettino ALA, Nicolau UR, et al. Circulating tumor cells as marker of poor prognosis in metastatic lung cancer: a pilot study. *Applied Cancer Research*. 2018 Aug 07; 38(1): 1-8.

Doroshov, Deborah Blythe, et al. "PD-L1 como um biomarcador de resposta aos inibidores do ponto de controle imunológico." *Nature Reviews Clinical Oncology* 18.6 (2021): 345-362.

Economopoulou, P., Koutsodontis, G., Avgeris, M., Strati, A., Kroupis, C., Pateras, I., ... & Psyrri, A. (2019). HPV16 E6/E 7 expression in circulating tumor cells in oropharyngeal squamous cell cancers: A pilot study. *Plos one*, 14(5), e0215984.

El-Naggar, Abeer M., et al. "Synthesis, characterization and molecular docking studies of thiouracil derivatives as potent thymidylate synthase inhibitors and potential anticancer agents." *Molecular diversity* 21.4 (2017): 967-983.

Fanelli MF, Oliveira TB, Braun AC, Corassa M, Addallah EA, Nicolau UR, et al. Evaluation of incidence, significance, and prognostic role of circulating tumor microemboli and transforming growth factor- β receptor I in head and neck cancer. *Head & neck*. 2017 nov 17; 39(11): 2283-92.

Ferrari, Stefania, et al. "Human thymidylate synthase inhibitors halting ovarian cancer growth." *Vitamins and hormones* 107 (2018): 473-513.

Friboulet, L., Olaussen, K. A., Pignon, J. P., Shepherd, F. A., Tsao, M. S., Graziano, S., ... & Soria, J. C. (2013). ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *New England journal of medicine*, 368(12), 1101-1110.

Gilbert DC, Williamns A, Kimberley A, Stokoe J, Linsdall S, et al. p16INK4A, p53, EGFR expression and KRAS mutation status in squamous cell cancers of the anus: correlation with outcomes following chemo-radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*. 2013 oct 01; 109(1): 146-51.

Guerra MR. "Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes." *Rev bras cancerol*. 2005 jan 01; 51(3): 227- 34.

Habli Z, Alchama W, Saab R, Kadara H, Khraiche ML. Circulating tumor cell detection technologies and clinical utility: Challenges and opportunities. *Cancers*. 2020 jun 17; 12(7): 02-30.

Han, Yanyan; LIU, Dandan; LI, Lianhong. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research*, v. 10, n. 3, p. 727, 2020.

He Y, Chen D, Yi Y, Zeng S, Liu S, Li p, et al. Histone deacetylase inhibitor sensitizes ERCC1-high non-small-cell lung cancer cells to cisplatin via regulating miR-149. *Molecular Therapy-Oncolytics*. 2020 jun 26; 17(1): 448-59.

Hoff PMG. Câncer de Canal Anal. In: *Oncologia Clínica: Terapia Baseada em Evidências*. SBSHSL-Sociedade Beneficiente de Senhoras Hospital Sírio-Libanês; 2014. p. 179-185.

Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. 9ª edição: Ed. Guanabara e Koogan, Rio de Janeiro; 2012. p. 72-99.

Krebs M, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C. Molecular analysis of circulating tumour cells—biology and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*. 2014 jan 21; 11(3): 111-29.

Lemos LA, Silveira FA, Seixas JA, Dias UR. Relação entre HPV e câncer anal e a utilização de swab anal como método de rastreio. *Revista Saber Digital*. 2020 fev 10; 13(1): 106-117.

Lin C, Franceschi S, Clifford GM. Tipos de vírus do papiloma humano da infecção ao câncer no ânus, de acordo com o sexo e o status sorológico para o HIV: uma revisão sistemática e metanálise. *The Lancet Infectious Diseases* . 2018 jan 12; 18(2): 198-206.

LI, Jun et al. RAD23B citoplasmático interage com CORO1C para promover sinergicamente a progressão e metástase do câncer colorretal. *Cancer Letters* , 2021.

Negishi R, Saito H, Iwata R, Tanaka T, Yoshino T. Performance evaluation of a high-throughput separation system for circulating tumor cells based on microcavity array. *Eng Life Sci*. 2020 Jul 14;20(11):485-493.

Ma YC, Wang L, Yu FL. Recent advances and prospects in the isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) methodology. *Technol Cancer Res Treat*. 2013 Aug 02;12(4):295-309.

Mendes, Ana Teresa Martins. Impacto da detecção das células tumorais circulantes nas neoplasias do trato urinário: próstata e bexiga. 2016.

Mu, Hong, et al. "Molecular basis for damage recognition and verification by XPC-RAD23B and TFIIH in nucleotide excision repair." *DNA repair* 71 (2018): 33-42.

Pantel K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction?. *Cancer research*. 2013 aug 07; 73(21); 6384–8.

Pantel K, Alix-Panabières C. Biópsia líquida e doença residual mínima - últimos avanços e implicações para a cura. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019 dez 07; 16(7): 409-24 2019.

Parwaiz, I., MacCabe, T. A., Thomas, M. G., & Messenger, D. E. (2019). A systematic review and meta-analysis of prognostic biomarkers in anal squamous cell carcinoma treated with primary chemoradiotherapy. *Clinical Oncology*, 31(12), e1-e13.

Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer letters*. 2007 aug 18; 253(2): 180-204.

Pernot S. Comparação das estratégias de rastreamento do câncer anal, incluindo anuscopia padrão, citologia anal e genotipagem do HPV em homens HIV positivos que fazem sexo com homens. *Revista britânica de câncer*. 2018 may 04; 1 (1):1- 12.

Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*. 2012 jan 20; 148(1): 349-61.

Serup-Hansen E, Linnemann D, Havsteen H. Human papillomavirus genotyping and p16 expression as prognostic factors for patients with American Joint Committee on Cancer stages I to III carcinoma of the anal canal. *Journal of clinical oncology*. 2014 Jul 11; 32(17): 1812-17.

Silva LS. Pesquisa de células tumorais circulantes em pacientes com câncer de próstata por método de filtração celular [Dissertação de Mestrado]. Universidade Estadual Paulista. 2018.

Sun N, Li X, Wang Z, Li Y, Pei R. High-purity capture of CTCs based on micro-beads enhanced isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) method. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 102, p. 157-163 2018.

Takakura, Masahiro et al. Detection of circulating tumor cells in cervical cancer using a conditionally replicative adenovirus targeting telomerase-positive cells. *Cancer science*. 2018 Apr 15; 109(1): 231-40.

Tamminga M, Kiki CA, Hiltermann TJN, Jayat M, Schuurin E, Bos HVD. Detection of Circulating Tumor Cells in the Diagnostic Leukapheresis Product of Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Comparing CellSearch® and ISET. *Cancers*. 2020 apr 07. 12(4): 883- 96.

Urgoiti GBR, Gustafson K, Klimowicz AC, Petrillo SK, Magliocco AM, Doll CM. The prognostic value of HPV status and p16 expression in patients with carcinoma of the anal canal. *PloS one*. 2014 oct 01. 9(10): e108790.

Van Der Toom EE. Analogous detection of circulating tumor cells using the AccuCyte®—CyteFinder® system and ISET system in patients with locally advanced and metastatic prostate cancer. *The Prostate*. 2018 jan 21; 78(4): 300-7.

Villa LL, Denny L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2020 oct 01; 94(1): S71-S80.

YI, Ming et al. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2021.

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



A.C. Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **21/05/2019**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **09/04/2019**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2669/19** intitulado: **“IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES NO CÂNCER DE CANAL ANAL E SUA INTERAÇÃO COM O VÍRUS HPV.”**

Pesquisador Responsável: Ludmilla Thomé Domingos Chinen
Aluna: Daniela de Jesus Ferreira Costa (Mestrado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 28 de maio de 2019.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caires Serrano
1ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**NOME DO ESTUDO: IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES
EM PACIENTES COM CÂNCER DE CANAL ANAL E SUA INTERAÇÃO COM O
VÍRUS HPV**

Investigador Responsável: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

Nome do (a) Voluntário (a): _____

RGH: _____

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

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

OBJETIVOS DO ESTUDO

Detectar células tumorais circulantes (que são células que se desprendem do tumor e caem na corrente sanguínea) em pacientes com câncer de canal anal e identificar a presença do vírus HPV nessas células.

- Validar a detecção de CTCs em câncer de canal anal;
- Identificar o vírus HPV em CTCs de câncer de canal anal;
- Estudar a relação do vírus HPV com as CTCs do câncer de canal anal;
- Avaliar se existe correlação entre a carga de HI, presença de HPV e a quantidade de CTCs e correlacionar os achados com a evolução clínica.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se concordar em participar deste estudo, você será submetido a duas coletas de sangue

(aproximadamente 10 mL), uma antes do início do tratamento quimioterapia/radioterapia neoadjuvante (*baseline*), e a segunda (*1ª follow-up*) antes da cirurgia.

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

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

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

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

RISCOS

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

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

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

Garantimos a assistência integral e gratuita pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa.

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

BENEFÍCIOS

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

MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES

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

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

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

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

CUSTOS

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

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

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

BASES DA PARTICIPAÇÃO

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

SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE

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

ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

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

ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PACIENTE SUJEITO À PESQUISA

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

INFORMAÇÕES SOBRE NOMES, TELEFONES E ENDEREÇOS PARA CONTATOS

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

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

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

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

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

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

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

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

Eu recebi uma via assinada deste formulário de consentimento.

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

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

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

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

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