



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente
Área de Oncologia

**Avaliação da Expressão de Podoplanina e de TGF- β RI em
Células Tumoriais Circulantes Provenientes de Pacientes com
Câncer Gástrico e sua Correlação com Eventos
Tromboembólicos**

ADRIANO BRIGATTI JARMELO

Dissertação apresentada à
Fundação Antônio Prudente para
obtenção do título de Mestre em
Ciências na área de Oncologia.

Orientadora: Dra. Ludmilla
Thomé Domingos Chinen

São Paulo
2024

Jarmelo, Adriano.

Avaliação da Expressão de Podoplanina e de TGF- β RI em Células Tumorais Circulantes Provenientes de Pacientes com Câncer Gástrico e sua Correlação com Eventos Tromboembólicos. / Adriano Jarmelo. São Paulo, 2024.

58f.

Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Ludmilla Thomé Domingos Chinen.

1. Células tumorais circulantes, 2. Tromboembolismo venoso, 3. Podoplanina e TGF β -RI

CDU 616

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Adriano Brigatti Jarmelo

Título: Avaliação da Expressão de Podoplanina e de TGF- β RI em Células Tumoriais Circulantes
Provenientes de Pacientes com Câncer Gástrico e sua Correlação com Eventos
Tromboembólicos

Aprovado em: 06 / 06 / 2024

Banca Examinadora

Orientador: Ludmilla Thomé Domingos Chinen
Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Tiago Goss dos Santos
Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Patrícia Xander Batista
Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Membro da banca: Fábio Ribeiro da Silva
Instituição: Universidade de Guarulhos

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

À amiga Anna Paula Carreta Ruano por toda contribuição dispensada desde a minha chegada ao CIPE até a fase final deste projeto.

Aos amigos, em especial aos do grupo “CTC lovers” e aos amigos do coração Marcel, João, Marci, Rosani e Fábio, pelas palavras de incentivo durante esta etapa de minha vida.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O tromboembolismo venoso (TEV) é uma complicação comum em pacientes com câncer ativo, no qual apresenta risco de 4 a 7 vezes maior do que na população geral (Khorana et al. 2020). Nesses pacientes, o TEV está associado com uma taxa de recorrência anual de 21%, levando à necessidade de uso de anticoagulante por um período prolongado que por sua vez aumentaria o risco de sangramento em 12% e interrupção do tratamento quimioterápico (Slagter et al. 2020). As neoplasias com maior incidência de TEV são as de pâncreas e estômago em estádios mais avançados. Não existem métodos validados capazes de prever TEV no paciente oncológico (Khorana et al. 2020). As Células Tumorais Circulantes (CTCs) e Microêmbolos Tumorais Circulantes (MTC) – *circulating tumor microemboli* (CTMs) podem estar envolvidos na ativação da coagulação (Chemie et al., 2021). **OBJETIVOS:** Avaliar, antes da neoadjuvância, a correlação entre os níveis de CTCs/MTC com a trombose e com a sobrevida global, e; verificar a expressão de podoplanina (PDPN) e do Receptor tipo I do fator de crescimento transformador beta - *Transforming growth factor beta receptor* (TGF- β RI) nas CTCs/ MTC e sua correlação com a presença de eventos tromboembólicos. **MATERIAIS E MÉTODO:** Este foi um estudo retrospectivo, realizado com amostras de pacientes com câncer gástrico localmente avançado, coletadas no A. C. Camargo Cancer Center, remanescentes de um projeto previamente aprovado (CEP 2134/15). O material utilizado para o estudo foi proveniente de 19 pacientes. As CTCs/ MTC foram caracterizadas por análise citopatológica e de imunocitoquímica; os dados clínicos dos pacientes coletados, foram atualizados. **RESULTADOS:** Nas amostras dos pacientes com CTCs que expressaram a marcação de PDPN, pudemos observar uma diminuição da sobrevida global (SG). Em 10 pacientes com a presença da proteína podoplanina tiveram uma SG pior do que pacientes que não tiveram a expressão. (20 meses vs. 4,8 meses aproximadamente) e com o aumento dos eventos tromboembólicos quando comparado com as amostras dos pacientes com marcação negativa para PDPN. No entanto, as amostras de pacientes com a expressão positiva para o receptor do tipo I de TGF- β RI tiveram uma maior SG quando comparados com pacientes que apresentaram CTCs não marcadas para TGF- β RI. Em 5 pacientes que apresentaram CTCs com a expressão de TGF- β tiveram uma SG melhor que os 14 pacientes que não apresentavam CTC marcada para esta proteína (17 meses v.s. 4,8 meses aproximadamente) a contar do primeiro óbito. O tempo médio de SG foi de 10,9 meses. **CONCLUSÃO:** Nas amostras deste estudo, a marcação de CTC

e MTC com as proteínas podoplanina e TGF β -RI evidenciaram o impacto na SG dos pacientes. A expressão da podoplanina tanto em CTCs quanto em MTC, evidenciou uma diminuição da sobrevida global (SG) com o aumento dos eventos tromboembólicos. Já a expressão do TGF- β parece não ser um marcador preditivo de diminuição de sobrevida global pois pacientes com CTCs marcadas positivamente tiveram maior SG quando comparados com as CTCs não marcadas.

PALAVRAS-CHAVE: Células tumorais circulantes, Tromboembolismo venoso, Podoplanina, TGF β -RI, Câncer gástrico, Microêmbolos tumorais circulantes.

ABSTRAT

INTRODUCTION: Venous thromboembolism (VTE) is a common complication in patients with active cancer, presenting a risk of 4 to 7 times higher than the general population (Khorana et al. 2020). In these patients, VTE is associated with an annual recurrence rate of 21%, leading to the need for prolonged anticoagulant use, which in turn increases the risk of bleeding by 12% and interruption of chemotherapy treatment (Slagter et al. 2020). Neoplasms with a higher incidence of VTE include pancreatic and gastric cancers in more advanced stages. There are no validated methods capable of predicting VTE in cancer patients (Khorana et al. 2020). Circulating Tumor Cells (CTCs) and Circulating Tumor Microemboli (CTMs) may be involved in coagulation activation (Chemie et al., 2021). **OBJECTIVES:** We evaluated, before neoadjuvant therapy, the correlation between CTCs/CTM levels with thrombosis and overall survival and assessed the expression of podoplanin (PDPN) and Transforming Growth Factor Beta Receptor Type I (TGF- β RI) in CTCs/CTM and their correlation with the presence of thromboembolic events. **MATERIALS AND METHOD:** This was a retrospective study conducted with samples from patients with locally advanced gastric cancer, collected at A. C. Camargo Cancer Center, remaining from a previously approved project (CEP 2134/15). The material used for the study was obtained from 19 patients. CTCs/CTMs were characterized by cytopathological and immunocytochemical analysis; clinical data from patients were collected and update.

RESULTS: In samples from patients with CTCs expressing PDPN, we observed a decrease in overall survival with increasing thromboembolic events compared to samples from patients with negative PDPN. In 10 patients with the presence of the podoplanin protein, they had a worse overhall survival (OS) than patients who did not have the expression. (20 months vs. 4.8 months approximately) and with an increase in thromboembolic events when compared to samples from patients with negative staining for PDPN. However, samples from patients expressing TGF- β type I receptor had a higher expectation of overall survival when compared to patients with CTCs marked for TGF- β . 5 patients who had CTCs with TGF- β expression had a better OS than the 14 patients who did not have CTCs marked for this protein (17 months vs. 4.8 months approximately) from the first death. The median OS time was 10.9 months.

CONCLUSION: In the samples of this study, the labeling of CTC and MTC with the proteins podoplanin and TGF β -RI showed the impact on the patients' OS. The expression of podoplanin in both CTCs and MTC showed a decrease in overall survival (OS) with an increase in

thromboembolic events. TGF- β expression does not appear to be a predictive marker for reduced overall survival, as patients with positively labeled CTCs had longer OS when compared to unlabeled CTCs.

KEYWORDS: Circulating tumor cells, Venous thromboembolism, Podoplanin, TGF β -RI, Gastric cancer, circulating tumor microemboli.

LISTA DE ABREVIATURAS

CG	Câncer Gástrico
M1	Metástase à distância
MAT	Microambiente tumoral
TPV	Trombose venosa profunda
CE	Câncer de estômago
CID 10	Classificação internacional de doença
CTC	Célula tumoral circulante
CTM	Do inglês, <i>Circulating tumor microemboli</i>
FAP	Do inglês, <i>Familial adenomatous polyposis</i>
FOLFOX	Protocolo quimioterápico composto por oxaliplatina, leucovorina e fluorouracila
ISET	do inglês, <i>Isolation by Size of Tumor Cells</i>
JEC	Junção esôfago gástrica
M	Presença de metástase
PD	Progressão da doença
PDPN	Podoplanina
PSD	Solução salina tamponada com fosfato
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
TEV	Trombo embolismo venoso
TGFβ-R	do inglês, <i>Transforming growth factor beta receptor</i>
TBS	Do inglês, <i>Tris buffered saline</i>

LISTA DE SIGLAS

INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
ABC Cardiol	Associação Brasileira de Cardiologia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vantagens e desvantagens da biópsia tradicional e biópsia líquida.....	5
Figura 2	Cascata metastática.....	9
Figura 3	Funções da podoplanina na cascata tumor-metastática.....	12
Figura 4	Representação esquemática da podoplanina (PDPN) estrutura e funções.	14
Figura 5	Marcação positiva e negativa para a podoplanina.....	20
Figura 6	CTC Marcação positiva para podoplanina.....	28
Figura 7	CTC Marcação positiva para TGF- β -RI.....	30
Figura 8	CTC Marcação positiva (dupla marcação) PDPN e TGF- β -RI.....	31
Figura 9	Presença da expressão de PDPN em micro êmbolos tumorais circulantes.	33
Gráfico 1	Presença da expressão da podoplanina em CTC.....	27
Gráfico 2	Presença da expressão de TGF- β em CTC.....	29
Gráfico 3	Presença da expressão da dupla marcação Podoplanina e TGF- β em CTC.....	30
Gráfico 4	Presença da expressão da PDPN em micro embolo (ME).....	32
Gráfico 5	Presença da expressão da dupla marcação (PDPN e TGF- β) em CTC.....	33
Gráfico 6	Total de CTC/mL.....	34
Gráfico 7	Presença de TEV início do tratamento.....	35
Gráfico 8	Presença de TEV durante tratamento.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis clínico-patológicas em pacientes com câncer gástrico localmente avançado.....	24
Tabela 2	CTC e MTC com marcação para PDPN e/ou TGF- β RI.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CÂNCER GÁSTRICO.....	1
1.2. BIÓPSIA LÍQUIDA	4
1.2.1. ctDNA.....	5
1.2.2. miRNA CIRCULANTES	6
1.2.3. VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	6
1.2.4. CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES.....	7
1.3. CONCEITO E VISÃO GERAL DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES.....	7
1.4. TROMBOSE E CÂNCER	10
1.5. PODOPLANINA	11
1.5.1. EXTRUTURA DA PODOPLANINA.....	13
1.6. RECEPTOR TIPO I DO FATOR DE CRESCIMENTO TRASFORMADOR BETA - TGFβ-RI	15
2. OBJETIVO	16
2.1. OBJETIVO DO ESTUDO	16
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	17
3.1. COLETA DAS AMOSTRAS	17
3.2. CRITÉRIOS GERAIS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	17
3.3. DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES	18
3.4. IMUNOCITOQUÍMICA	19
3.5. CULTURA CELULAR – PADRONIZAÇÃO DO ANTI-CORPO ANTI PODOPLANINA	17
3.6. REALIZAÇÃO DA IMUNOCITOQUÍMICA – CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO ANTI PODOPLANINA.....	20
3.7. REALIZAÇÃO DA IMUNOCITOQUÍMICA – CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO PARA TGFβ-RI	22
4. RESULTADOS	23
4.1. PACIENTES.....	23
4.2. ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA PARA PDPN E/OU TGFβ-RI.....	24
4.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PODOPLANINA E TGFβ-R-I EM CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES E MICROEMBOLOS TUMORAIS CIRCULANTES E A CORRELAÇÃO COM EVENTO TROMBOEMBÓLICO.	27
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS	42
ANEXO 1. CARTA DE SOLICITAÇÃO DE EMENDA AO PROJETO (GENÔMICA DE ADENOCARCINOMAS GÁSTRICO	47

1. INTRODUÇÃO.

1.1. CÂNCER GÁSTRICO

O estômago é um órgão que apresenta o formato da letra “J” está localizado abaixo do músculo diafragma entre o esôfago e o duodeno e é especializado em acumular e digerir os alimentos que ingerimos (KAHRILAS, 2019).

Localizado na cavidade abdominal, o estômago é dividido em 4 partes distintas: cárdia, fundo, corpo e piloro. O bolo alimentar, proveniente do esôfago, adentra a luz do estômago através do óstio cárdico, dando início ao processo de digestão química. Este processo envolve a atuação de diversas enzimas presentes no suco gástrico, como a lipase, pepsina, caseína e o ácido clorídrico. Este último desempenha um papel crucial, pois não apenas exerce uma ação antisséptica sobre o bolo alimentar, mas também mantém um pH ótimo, geralmente em torno de 1,2. Esse ambiente ácido é essencial para a ativação do pepsinogênio em sua forma ativa, conhecida como pepsina, que desempenha um papel fundamental no processo de digestão de proteínas (KAHRILAS, 2019).

Além do processo de digestão, o estômago também está envolvido em uma pequena parte no processo de absorção de alimentos.

Do ponto de vista microscópico, o estômago é constituído por quatro camadas histológicas denominadas de mucosa, submucosa, muscular externa e serosa (STANDRING, 2016).

O câncer gástrico (CG) é também chamado de câncer de estômago (CE) sendo classificado como CID10. C.16 (classificação internacional de doença). Apesar de sua prevalência, tem apresentado queda significativa nos últimos anos, porém, ainda é a 5ª neoplasia maligna mais frequente e a terceira causa de morte por câncer em todo mundo (SIEGEL et al., 2020). A relação casos-novos/mortalidade é pior do que as neoplasias mais incidentes no mundo (BARDOT et al., 2014; INCA, 2023). A cada ano, 800 mil pessoas são diagnosticadas com CG e cerca de 723 mil morrem pela doença (NAGINI, 2012).

Em cada ano do triênio de 2023 a 2025, estima-se que o Brasil terá aproximadamente em média 21.430 novos casos de câncer gástrico, o que equivale a uma taxa de incidência estimada de 9,94 casos por 100 mil habitantes. Dentre esses casos, 13.340 serão diagnosticados em homens e 8.140 em mulheres. É importante destacar que, excluindo os tumores de pele não-melanoma, o câncer gástrico ocupa a posição de segundo tipo de câncer

mais comum em homens nas regiões Norte (com uma taxa de incidência de 12,55 por 100 mil) e Nordeste (com uma taxa de incidência de 12,14 por 100 mil) do país (INCA, 2023).

A mortalidade pelo CG vem caindo em praticamente todo o mundo, incluindo América Latina (LANCET ONCOL, 2020). No Brasil, apesar deste declínio, a mortalidade por CG ainda se mantém em patamares inaceitáveis, pois, enquanto a sobrevida no primeiro ano da doença é de 32%, ao final de 5 anos é de apenas 9% (INCA, 2023). Nos Estados Unidos esta é de 28,3% aos 5 anos (LANCET ONCOL, 2020). Algumas grandes cidades brasileiras com alta prevalência de CG - tais como Belém (PA), que chega a um índice acima de 20 por 100 mil - apresentam queda na mortalidade com velocidade inferior à média nacional (INCA, 2023).

O CG é uma doença altamente heterogênea que compromete majoritariamente os homens entre 60 e 70 anos de idade e que pode ser classificado segundo o estadiamento em (localizado e avançado), a localização anatômica em (proximal ou distal) e os seus subtipos histológicos que, pela classificação de Lauren, se dividem em: I) tipo Intestinal, com um padrão glandular bem definido; II) tipo Difuso infiltrativo, caracterizado por uma menor coesão entre as células; e III) tipo Misto, que exibe características intermediárias entre os dois subtipos apresentados anteriormente. O adenocarcinoma é o principal causador dos 90% de casos de CG nos EUA e América Latina. Outros tipos de tumores como os linfomas (3%) e os sarcomas (raros) também podem comprometer o estômago. Outro tipo de tumor que também pode afetar o estômago é conhecido como GIST (*Tumor Estromal Gastrintestinal*) (FUCHS E MAYER, 1995).

Fatores hereditários e não hereditários estão claramente associados ao desenvolvimento do CG como: I) a infecção gástrica pela bactéria *Helicobacter pylori*; II) Os hábitos e estilos de vida, que estão cada vez mais claros na carcinogênese do CG, como p.ex.: consumo de alimentos com baixo teor em fibras, dietas com alto teor de sal e/ou realçadores de sabor como o glutamato monossódico, aumento no consumo de carnes embutidas ou processadas com conservantes do tipo aminas aromáticas, métodos de conservação de alimentos como a defumação que podem conter altas concentrações de benzopirenos, sem contar a exposição à drogas e ao tabaco; III) indivíduos do sexo masculino e a idade avançada são fatores de pré-disposição ao CG; IV) a presença de alguns transtornos gástricos como a gastrite atrófica, metaplasia intestinal da mucosa gástrica, a presença de pólipos adenomatosos no estômago, gastrite hipertrófica gigante; e V) histórico de síndromes da pré-disposição hereditária ao câncer como por exemplo, Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e o próprio CG (KAHRILAS,

2019; STANDRING, 2016).

Um dos maiores desafios da clínica do CG é ocorrência da sintomatologia inespecífica o que torna raro o seu diagnóstico precoce. O diagnóstico, quando feito nas fases avançadas da doença, contribui para o baixo índice de sobrevida do paciente.

A ausência de sinais e sintomas ou a presença de sintomas vagos contribuem para o diagnóstico avançado da doença, até a presença de metástases à distância (M1). A dor pode variar de epigástrica leve, para os casos iniciais, até mais severa em casos avançados, podendo estar associada a perda de peso, que são efeitos comuns no CG. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Em casos de doença avançada, sintomas mais específicos podem indicar a localização do câncer gástrico, tais como: I) Tumores localizados na junção esofagogástrica (JEG) podem se manifestar através de disfagia, dificuldade de deglutição. II) A combinação de plenitude gástrica e vômitos após as refeições pode sugerir a invasão de tumores distais que se estendem até a região do piloro. III) Sintomas como náuseas, saciedade precoce e a falta de distensibilidade do órgão podem estar relacionados a tumores que se expandem por todo o antro do estômago. IV) Mesmo sintomas menos frequentes, como a hematêmese (vômito com sangue) e a melena (fezes escuras, sinal de sangramento no trato digestivo), podem ser observados como sinais de câncer gástrico (INCA, 2023; Ministério da Saúde, 2018).

A localização do tumor, seu estadiamento, o número de linfonodos ressecados e acometidos, bem como a presença ou ausência de metástases à distância, são fatores cruciais para determinar o prognóstico do câncer gástrico. É inegável que o tratamento para o câncer gástrico teve avanços significativos nos últimos tempos, contribuindo para um aumento na sobrevida global (SG) e na sobrevida livre de doença (SLD) (Ministério da Saúde, 2018).

Além disso, uma das modalidades de tratamento que vem ganhando espaço na terapia do paciente portador de CG é o tratamento multimodal, caracterizado pela associação do tratamento cirúrgico com outras terapias como por exemplo a quimioterapia antineoplásica (QT), que pode ser neoadjuvante, adjuvante, perioperatória e, também, a associação com o tratamento radioterápico (RT) e a imunoterapia (Associação Brasileira de Câncer Gástrico, 2021).

A constante evolução dos fármacos que, propiciam ao paciente uma melhor tolerância ao tratamento com QT com menos efeitos colaterais, associado ou não a RT e/ou imunoterapia, não substitui, ainda, o tratamento cirúrgico quando é oferecido de forma apropriada. Neste

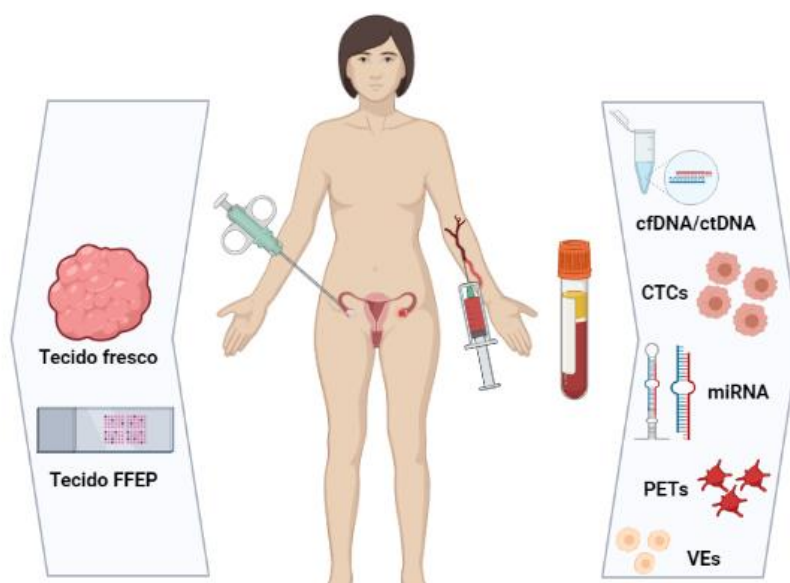
contexto, a única possibilidade de cura fica restrita aos tumores em estágios iniciais passíveis de sofrerem ressecção por procedimento de endoscopia com margens livres associada à linfadenectomia regradada (Associação Brasileira de Câncer Gástrico, 2021).

1.2. BIÓPSIA LÍQUIDA

Mesmo com os avanços no diagnóstico e tratamento de tumores sólidos as metástases a distância continuam sendo uma das principais causas de morte relacionadas ao câncer. A análise do tumor primário através do procedimento clássico de biópsia convencional é uma prática padrão que atualmente, na oncologia, pode fornecer informações imprecisas sobre a característica das metástases (Keller L , Pantel K . 2019).

As células metastáticas podem apresentar características genômicas particulares que podem não estar expressas no tumor primário, além de apresentarem uma heterogeneidade entre si (Keller L, Pantel K . 2019).

O conceito de biópsia líquida é a análise em tempo real de células tumorais ou produtos, também chamados de compartimentos de células tumorais como por exemplo, ácidos nucleicos circulantes livres de células tumorais como ctDNA, cfRNA, miRNA, vesículas extracelulares ou proteínas) liberados no sangue ou em outros fluídos corporais como líquido, urina, saliva dentre outros, através de lesões tumorais primárias ou metastáticas ou por processos de necrose e apoptose tumoral. A biópsia líquida permite o desenvolvimento de novos métodos para detecção precoce de câncer primário ou recidiva da doença e ainda auxilia no processo do monitoramento e da eficácia da terapia contra o câncer e determinando alvos terapêuticos e mecanismos de resistência para adaptar a terapia às necessidades específicas de um paciente de forma individualizada (Pantel, 2020).



Fonte: Biorender – autoria de Alexia Brawn - ano 2023

Figura 1. Vantagens e desvantagens da biópsia tradicional e biópsia líquida: As biópsias tradicionais são procedimentos invasivos que trazem informações limitadas do material analisado, exigem maior tempo de recuperação do paciente, as análises são limitadas à médicos patologistas e representam uma baixa heterogeneidade do tumor. As biópsias líquidas são menos invasivas, exigem um menor tempo de recuperação dos pacientes, não oferecem riscos ou complicações durante e pós coleta, representam uma alta ou total heterogeneidade tumoral.

1.2.1. ctDNA

Vários estudos focam no uso do DNA tumoral circulante (ctDNA), que permite uma avaliação molecular não invasiva e serial dos tumores de forma geral (Riediger A, et al. 2018).

O ctDNA reflete a presença e a atividade de células tumorais durante eventos de necrose, apoptose e migração de células tumorais pelo organismo. Com isso, o DNA tumoral liberado na circulação pode ser usado para monitorar a progressão da doença e a resposta ao tratamento. Como o ctDNA compreende apenas uma pequena fração do DNA livre de células circulantes (cfDNA) total, técnicas de sequenciamento de última geração (NGS) altamente sensíveis e análises de dados especializadas são necessárias para medir a presença e o nível de ctDNA. Somente recentemente, estas técnicas se tornaram disponíveis para avaliar o ctDNA com sensibilidade aceitável para aplicação no monitoramento do tratamento do câncer (Marjolijn J.L. et al, 2023)

1.2.2. miRNAs CIRCULANTES

A descoberta de micro RNAs (miRNA) no câncer abriu novas perspectivas para pesquisadores nos últimos anos. Micro RNAs são um conjunto de pequenos RNAs endógenos, altamente conservados e não codificantes que controlam a expressão de cerca de 30% dos genes em níveis pós-transcricionais. Normalmente, os microRNAs impedem a tradução e a estabilidade dos RNAs mensageiros (mRNA), controlam genes associados a processos celulares, como inflamação, regulação do ciclo celular, resposta ao estresse, diferenciação, apoptose e migração. Descobertas convincentes revelaram que mutações ou interrupções de miRNA correspondem a diversos cânceres humanos e sugerem que os miRNAs podem funcionar como supressores de tumores ou oncogenes (Nigam et al, 2023).

1.2.3. VESÍCULAS EXTRACELULARES

Vesículas extracelulares (VEs), por meio de sua carga complexa, podem refletir o estado de uma célula de origem e alterar as funções e fenótipos de outras células (WITWER et al, 2024).

As vesículas extracelulares produzidas por células cancerígenas funcionam como uma forma única de comunicação intercelular promovendo o crescimento e a sobrevivência celular, ajudam a moldar o microambiente tumoral e aumentar a atividade invasiva e metastática. Existem várias classes de VEs de acordo com os seus tamanhos e com as diferentes proteínas de membrana e seus conteúdos internos. As mais estudadas são as microvesículas (MVs) e exossomos, e elas diferem na forma como são formadas (Raposo, 2018).

As MVs são geradas pela brotação externa e fissão da membrana plasmática da célula. Por outro lado, os exossomos são derivados como corpos multi-vesiculares que se fundem com a membrana plasmática e liberam seus conteúdos. O que torna as VEs especialmente interessantes é como elas mediam seus efeitos. Foi demonstrado que tanto as MVs quanto os exossomos contêm uma ampla variedade de carga bioativa, incluindo proteínas de superfície celular, citosólicas e nucleares, bem como transcrições de RNA, micro-RNAs (miRNAs) e até mesmo fragmentos de DNA. VEs, e sua carga associada, podem ser transferidos para outras células cancerígenas, bem como para tipos de células normais,

fazendo com que as células receptoras passem por mudanças fenotípicas que promovem diferentes aspectos da progressão do câncer (Antonyak et al, 2021).

1.2.4. CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES (CTCs)

As células tumorais quando atingem a circulação sanguínea são conhecidas como células tumorais circulantes (CTCs). As CTCs apresentam características fenotípicas e genotípicas únicas, que permitem que sobrevivam dentro da circulação e subsequentemente migrem da corrente sanguínea para os órgãos e tecidos a fim de formar um tumor secundário. As CTCs têm sido amplamente utilizadas como uma fonte não invasiva de células cancerosas para a análise de fenótipos e genótipos tumorais (usando o sangue como uma biópsia líquida), mas sua caracterização detalhada também é a chave para compreender a biologia dos processos metastáticos. Sabe-se que número de CTCs que podem ser detectados no sangue, a qualquer momento, em um paciente com câncer parece ser relativo ao número de eventos metastáticos. No entanto, o isolamento eficaz das CTCs na circulação, através de técnicas e quantificação precisa, têm se mostrado difíceis devido às restrições associadas à análise seletiva destas células, também conhecidas por “células raras” (Norris, L. *et al.* 2021).

A utilização de metodologias baseadas em exclusão de tamanho inclui tecnologias de microfiltração, que envolvem a passagem de sangue por filtros com poros de 8µm para o isolamento e estudo das CTCs (Pantel, 2020).

1.3. CONCEITO E VISÃO GERAL DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

As células tumorais circulantes (CTCs) foram relatadas pela primeira vez por Ashworth em 1869 e posteriormente demonstradas por Engell em 1955 (Yang, C. 2019). Estas células são liberadas do tumor primário e/ou metastático durante o processo de formação do tumor e apresentam a capacidade de invadir vasos sanguíneos disseminando-se pelo sangue podendo causar metástases em vários órgãos (Lozar, T. Gersak, K. Kuhar, CG. Jesenko, T. 2019). As CTCs são chamadas de células raras, por se apresentarem em um número muito pequeno quando comparadas com as milhares de células sanguíneas presentes na circulação. As CTCs podem

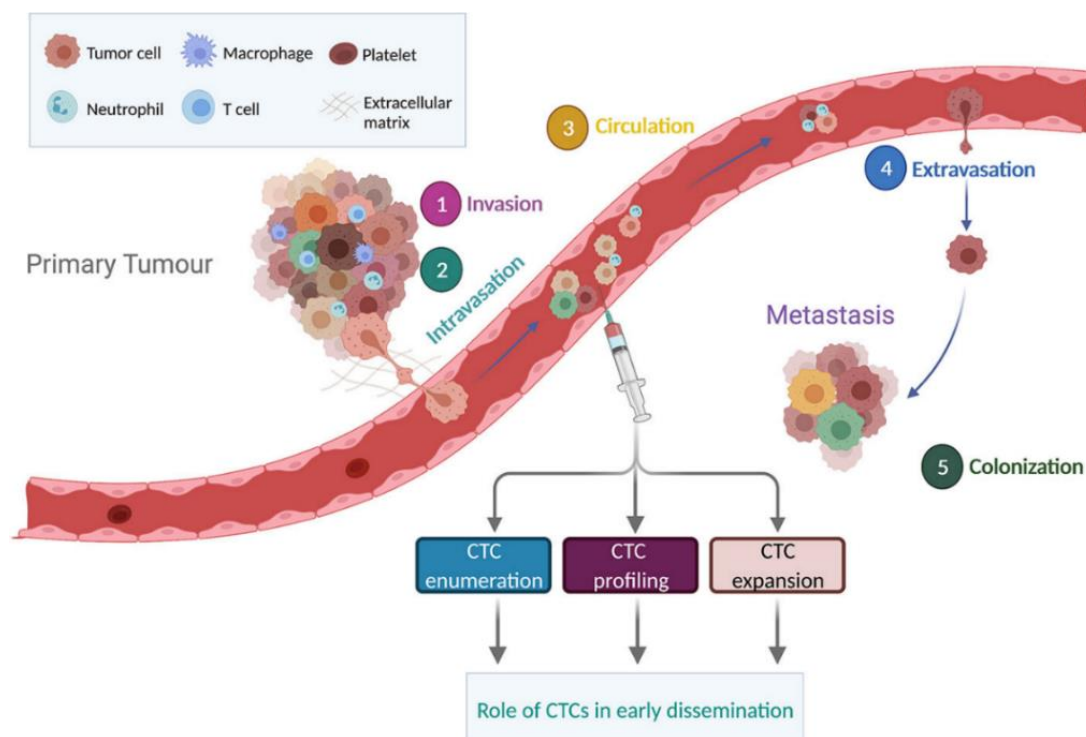
ser detectadas e contadas após sua separação das células sanguíneas utilizando vários métodos de enriquecimento (Boya, M. Chu, C-H, Liu, R. Ozkaya-Ahmadov, T. Fatih Sarioglu, A. et al. 2020).

O método de detecção de CTCs desenvolvido por Bréchot et al., através da tecnologia ISET® (*Isolation by Size of Tumor cells; Rarecells, France*), tem ganhado muita força na literatura, por ser baseado nas propriedades físicas das CTCs e por isolá-las de forma independente de marcação. Até o momento, várias metodologias vêm sendo desenvolvidas para buscar o isolamento e a identificação de CTCs baseadas nas suas propriedades físicas e/ou biológicas (Yang, C. 2019). O entendimento da utilização clínica das CTCs pode contribuir para a compreensão da previsão da sobrevida do paciente, personalização das escolhas terapêuticas, monitoramento da resposta/resistência ao tratamento e avaliação de metástases à distância em vários tipos de câncer inclusive o câncer gástrico (Moon, D. Lindsay, D. Hong, S. Wang, A. 2019). Como uma forma de rastrear o câncer, alguns estudos mostram que a detecção de CTCs no sangue de indivíduos, sem evidência da doença, poderia permitir o rastreamento e tratamento precoce do câncer. Esta abordagem foi estudada no câncer do pulmão: Em um estudo desenvolvido Ilie *et al.* 168 pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica foram submetidos a exames de tomografia computadorizada de monitoramento anual para o rastreamento do para câncer de pulmão, todos os 5 pacientes com contagem positiva de CTC desenvolveram câncer de pulmão durante o período de vigilância. Neste estudo, as CTCs foram detectadas em um período de 1 a 4 anos antes dos sinais radiológicos de malignidade na tomografia computadorizada (Vasseur et al., 2021).

O aglomerado de CTCs, chamado de microêmbolo tumoral circulante (MTC), tem sido descrito também como fator prognóstico. MTC parece não ser apenas um agregado de CTCs mas sim, são constituídos outras células com características fenotípicas e moleculares distintas das CTCs, o que aumenta seu potencial de metástase e resistência à apoptose. Ao atingirem a corrente sanguínea, CTCs isoladas ou agrupadas interagem com os componentes do sistema circulatório. As plaquetas são uma das primeiras células que as CTCs encontram durante o processo de metástase. O escudo plaquetário que se forma sobre as CTCs quando estas entram inicialmente na circulação, proporciona-lhes proteção física contra cisalhamento (Ward et al., 2021)

Um estudo conduzido por nosso grupo, demonstrou que a presença de MTC estava relacionada com pior prognóstico em câncer de cabeça e pescoço em 52 pacientes com

doença localmente avançada (Fanelli et al., 2017). Além disto, muitas CTCs isoladas e agregadas em MTC expressavam TGF- β RI, citocina produzida pelas plaquetas e envolvida no crescimento tumoral.



Fonte: Chemie et al. (2021)

Figura 2. Visão geral da cascata metastática: O processo metastático inclui invasão, intravasamento, circulação, extravasamento e colonização. As CTCs que se desprendem do tumor primário podem viajar sozinhas ou em grupos. A enumeração, o perfil molecular e a expansão de CTCs em tumores não metastáticos poderiam fornecer uma melhor compreensão sobre o significado da disseminação precoce das CTC

A massa tumoral primária é heterogênea constituída por vários clones de células neoplásicas. O clone metastático consegue realizar a transição epitélio-mesênquima com a mudança de fenótipo e com a liberação de enzimas como metaloproteinases, caderinas dentre outras. (Figura 1). As CTCs podem atingir o leito venoso de forma isolada (*single cell*) ou agrupadas (microembolos tumorais circulantes - MTC). O processo metastático compreende a intravasão, circulação, extravasão e colonização. As CTCs obtidas e estudadas

do sangue periférico, podem fornecer através de seu perfil molecular e a quantidade de células encontradas na circulação informações importantes a respeito da disseminação precoce do câncer.

Sendo assim, a interação entre plaquetas e CTCs é crucial nesse processo. As plaquetas podem facilitar a sobrevivência e extravasamento das CTCs, auxiliando na formação de microtrombos que protegem as CTCs da vigilância imunológica e das forças de cisalhamento no fluxo sanguíneo. A ativação plaquetária pelas CTCs pode promover a liberação de fatores pró-coagulantes, contribuindo para o desenvolvimento de trombose. A presença de CTCs na circulação pode servir como marcador de um fenótipo tumoral agressivo, com maior probabilidade de metástase e eventos trombóticos. Portanto, compreender a interação entre plaquetas e CTCs é essencial para elucidar os mecanismos subjacentes à progressão do câncer e à formação de trombose, potencialmente levando ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Chemie et al., 2021).

1.4. TROMBOSE E CÂNCER

Uma das principais causas de morte não oncológica em pacientes portadores de câncer é a trombose (Khorana et al. 2020).

O tromboembolismo venoso (TEV) manifesta-se como o tromboembolismo pulmonar (TEP) e/ou trombose venosa profunda (TVP), fazendo parte de um mesmo espectro de doença (ABC Cardiol, 2022).

Múltiplos fatores de risco podem ser as causas para o desenvolvimento de TEV como por exemplo o câncer. Embora a trombose relacionada ao câncer possa ser tratada com anticoagulação, os benefícios do tratamento devem ser avaliados quando comparados ao risco aumentado de sangramento. Embora existam modelos de risco para TEV primário e recorrente, são necessários preditores adicionais para melhorar o desempenho do modelo e a discriminação de pacientes de alto risco (Khorana et al. 2020)

O risco de TEV em pacientes com câncer é da ordem de 4 a 7 vezes maior do que na população em geral, muitas vezes manifestando-se nos primeiros meses após o diagnóstico da doença oncológica. Os fatores de risco conhecidos para TEV incluem tipo de câncer, estágio, regime de tratamento e comorbidades, sendo que os cânceres de pâncreas, cérebro

e estômago apresentam as taxas de incidência mais altas. Múltiplos fatores de risco podem refletir a etiologia da trombose oncológica (Khorana et al. 2020).

Um dos fatores que aumentam pré-disposição do paciente com câncer ao risco de TEV é o tratamento quimioterápico, com uma taxa de incidência anual de 10%. Protocolos de tratamento de câncer gástrico a base de derivados de platina aumenta os riscos do paciente em desenvolver TEV. A incidência foi relatada como sendo de 16% em pacientes dentro de 12 meses após o início da quimioterapia. Slagter et al. (2020), através de seus estudos, puderam mostrar que 10% dos pacientes com câncer gástrico desenvolveram TEV durante a quimioterapia pré-operatória. De forma geral, pacientes com doença oncológica avançada apresentam maiores índices de desenvolvimento de TEV quando comparados com pacientes com doença localizada. Além do tratamento quimioterápico outros fatores como cirurgias, hospitalização, terapias anti-angiogênicas, agentes estimulantes da eritropoiese e contagem elevada de plaquetas pré-quimioterapia contribuem para o risco de se desenvolver uma trombose (Renni et al., 2017).

Cada tumor apresenta propriedades pró-trombóticas específicas que são benéficas para o processo de crescimento tumoral e sua disseminação. O mecanismo da coagulação pode ser ativado pelas células neoplásicas através de várias substâncias como as inibidoras de fibrinólise, cisteína protease, citocinas, pró-coagulantes, pró-inflamatórios e pró-angiogênicos, por interação direta com endotélio vascular, leucócitos e plaquetas (Renni et al., 2017).

1.5. PODOPLANINA

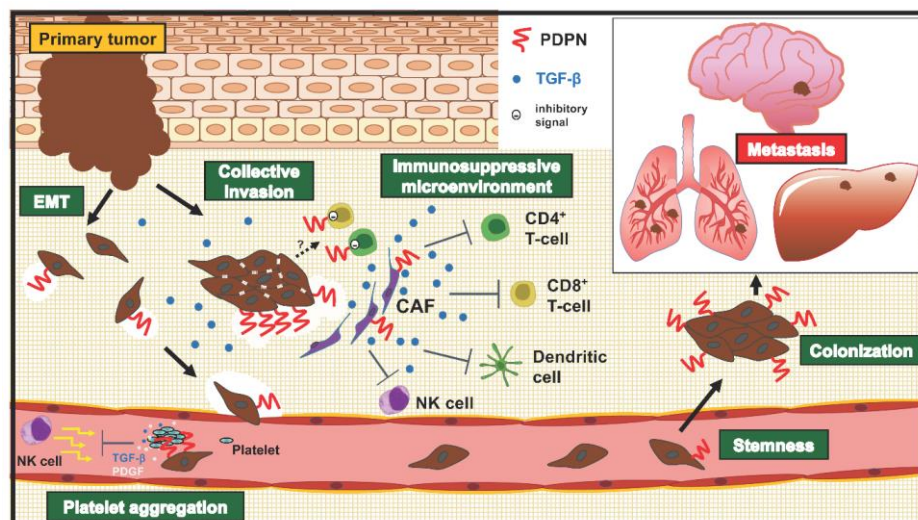
O termo podoplanina (PDPN) é oriundo da descoberta de sua expressão em podócitos renais, que são células localizadas na região glomerular renal, altamente especializadas em impedir a filtração de proteínas do sangue para a urina (Hiroyuki. S, Kaneko. K.M., Yukinari, K. 2023).

A PDPN é uma glicoproteína do tipo mucina encontrada na superfície da membrana celular. O seu papel fisiológico ainda não é muito bem estabelecido, mas sabe-se que tem uma importante atuação nos processos envolvidos com a proliferação, desenvolvimento e na evolução normal de células saudáveis de sistemas como o linfático, excretor, respiratório e

vascular podendo ser encontrada também em células da camada basal da epiderme, osteoblastos e fibras musculares esqueléticas além de participar de processos como a da coagulação sanguínea, angiogênese, inflamação (Hiroyuki. S, Kaneko. K.M., Yukinari, K. 2023). A PDPN, também desempenha um papel importante no desenvolvimento de tumores. O aumento da expressão da PDPN é uma característica observada em células tumorais além de estar relacionado diretamente com o mecanismo de malignidade tumoral. (Suzuki et al., 2023)

A PDPN tem a capacidade de fazer a ativação da agregação plaquetária através da sua ligação com o receptor de lectina C do tipo 2 (CLEC-2) e ainda, tem como papel modular transduções de sinais que controlam a divisão celular e outros processos como a diferenciação, migração, invasão, o mecanismo de transição epitélio-mesênquima, ou seja, participa em todos os processos que contribuem para a severidade e a progressão maligna tumoral (Hiroyuki. S, Kaneko. K.M., Yukinari, K., 2023).

No microambiente tumoral a PDPN é regulada positivamente no estroma tumoral com o envolvimento de fibroblastos associados ao câncer (FACs) e a participação de células de competência imune. (Suzuki et al., 2023).



Fonte: Suzuki, Kaneko e Kato (2022)

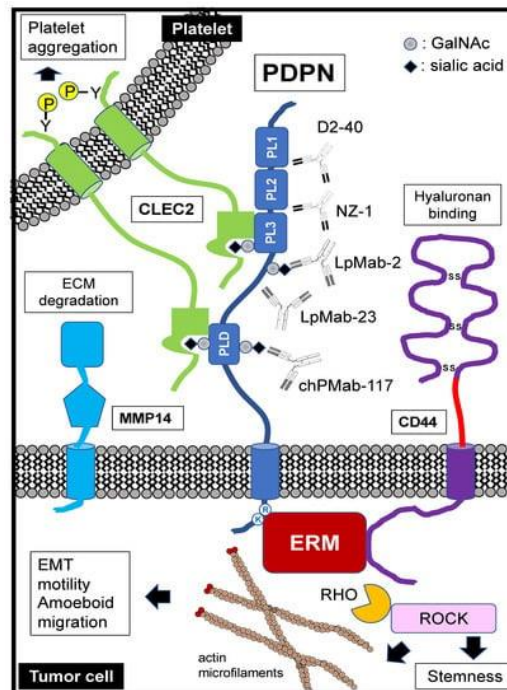
Figura 3. Funções da PDPN na cascata tumor-metastática: A agregação plaquetária mediada por PDPN promove a sobrevivência ao estresse de cisalhamento e aos ataques imunológicos na circulação. Além disso, fatores derivados de plaquetas (PDGFs) e TGF-β também promovem a sobrevivência e plasticidade das células tumorais. PDPN confere uma severidade na atividade da CTC ajudando a promover a colonização em um órgão distante.

A Podoplanina (PDPN) é uma glicoproteína do tipo mucina que promove a agregação plaquetária e atua como um facilitador para a indução de células tumorais na metástase hematogênica. As CTCs intravasadas ficam sob a influência do estresse de cisalhamento do fluxo sanguíneo e ataques de células imunológicas. Para superar e sobreviver na circulação, a PDPN induz a agregação plaquetária ligando-se ao receptor de lectina C do tipo 2 (CLEC-2) nas plaquetas, o que promove a embolização e a evasão das células do sistema imunológico (Figura 2). As plaquetas ativadas também liberam fatores, incluindo fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs) e fator de crescimento transformador β (TGF- β). Os PDGFs ativam a proliferação celular e a sinalização de sobrevivência através das vias Ras-ERK e PI3K-AKT, respectivamente. O TGF- β é uma proteína multifuncional que promove a migração / invasão e plasticidade de células tumorais por meio da ativação do programa EMT. Esses fatores ajudam as células tumorais a extravasarem e proliferar em locais metastáticos.

1.5.1. EXTRUTURA DA PODOPLANINA.

A PDPN apresenta uma porção extracelular (N- Terminal) altamente glicosilada, composta por 130 aminoácidos que é seguida por uma cadeia transmembrana e posteriormente por uma cauda curta, localizada intracelularmente, composta por uma cadeia com aproximadamente 10 aminoácidos. A porção N-Terminal, apresenta uma sequência de domínios PLAG1-3 (PL1, PL2, PL3) (Estimulante de agregação plaquetária) cada um com um sítio de glicosilação. Quando estes domínios são ativados por reações de fosforilação eles se ligam aos receptores de CLEC-2 encontrados na superfície das plaquetas desencadeando a agregação plaquetária. (Suzuki et al., 2023).

A porção intracelular da PDPN apresenta afinidade a proteínas das famílias das enzimas que são responsáveis pelo ancoramento dos filamentos de actina à membrana plasmática e com isso a PDPN participa do rearranjo do citoesqueleto, promovendo a migração celular e invasão. (Karini et al., (2018); Hiroyuki. S, Kaneko. K.M., Yukinari, K., (2023).



Fonte: Suzuki, Kaneko e Kato (2022)

FIGURA 4. Representação esquemática da podoplanina (PDPN) estrutura e funções. PDPN é uma glicoproteína transmembrana tipo I que consiste em um domínio extracelular, uma porção transmembrana e uma cauda citoplasmática curta. O domínio extracelular PDPN contém domínios PLAG1-3 (PL1, PL2 e PL3) e domínio semelhante a PLAG (PLD). O receptor de lectina 2 tipo C (CLEC-2), um receptor de plaquetas, reconhece tanto o domínio PLAG3 sinalizado quanto o PLD com os peptídeos PDPN adjacentes, induzindo a fosforilação da tirosina CLEC-2 e a agregação plaquetária.

A atividade da PDPN pode ser induzida por promotores tumorais tais como o TPA (acetato de tetradecanoilforbol) e os oncogenes RAS e Src. O aumento dos níveis expressivos da PDPN é observado em alguns tipos de neoplasias malignas como o carcinoma de células escamosas da cavidade oral, laringe, esôfago, pele, pulmão dentre outros. No entanto, estes tumores também apresentavam uma menor expressão de moléculas de adesão do tipo caderina o que justifica uma maior motilidade e frequência de migração tumoral contribuindo para os

mecanismos de metástases e maior agressividade tumoral. (Hiroyuki. S, Kaneko. K.M., Yukinari, K., 2023).

1.6. RECEPTOR TIPO I DO FATOR DE CRESCIMENTO TRASFORMADOR BETA - TGF β -RI

O fator de crescimento transformador- β (TGF β) é uma citocina pró-inflamatória de dupla funcionalidade caracterizada por realizar o controle de uma série de atividades celulares em condições fisiológicas e patológicas durante o desenvolvimento normal das células e inclusive no processo de carcinogênese. De acordo com as diferentes condições ambientais e os tipos de células, os efeitos fisiológicos do TGF- β podem ocorrer de forma heterogênea. O efeito antiproliferativo do TGF β inibe, ainda em estágios iniciais, a tumorigênese. Contudo, já em estágios posteriores o seu efeito é o contrário, ao invés de inibir, estimula a progressão tumoral mediando a progressão metastática e a resistência a quimioterapia. (Manini 2013)

Estudos recentes apoiam fortemente que o TGF- β é um indutor do mecanismo de invasão e metástase de células tumorais em estágios avançados. A superexpressão dos receptores de TGF- β do tipo I é frequentemente observada em estágios avançados de câncer de pâncreas, por exemplo. O TGF β liberado pelas células tumorais, pelos fibroblastos e outras células que pertençam ao microambiente tumoral, contribuem para a supressão das células imunes criando um meio que contribua para o desenvolvimento do tumor.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO DO ESTUDO

Este trabalho foi submetido como emenda à um projeto desenvolvido no ano de 2015, previamente aprovado (CEP 2134/15 – CAEE 50523015.6.0000.5432 sob o título de Genômica de Adenocarcinomas Gástricos), com o objetivo de avaliar, antes da neoadjuvância, a correlação entre os níveis de CTCs/MTC com a trombose e com a sobrevida global e verificar a expressão de podoplanina (PDPN) e do Receptor tipo I do fator de crescimento transformador beta - *Transforming growth factor beta receptor* (TGF- β RI) nas CTCs/MTC e sua correlação com a presença de eventos tromboembólicos.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas foram remanescentes de pacientes provenientes do projeto Genômica de Adenocarcinomas Gástricos e consistiam em membranas de polycarbonato do sistema ISET® (Isolation by Size of Tumor cells; Rarecells Diagnostics, Paris, France). Essas membranas foram empregadas na filtração de amostras de sangue de 60 pacientes com câncer gástrico localmente avançado, coletadas no A. C. Camargo Cancer Center, em São Paulo, Brasil. As membranas selecionadas de cada paciente, continham no mínimo 2 regiões de material filtrado (*spots*). Trabalhamos com membranas utilizadas para as filtrações da 1ª e da 2ª coleta de sangue de cada paciente.

Logo, utilizamos no total 20 spots da 1ª coleta e 22 spots de amostras obtidas da 2ª coleta.

O intervalo de tempo da 1ª para a 2ª coleta foi de 180 dias e neste período os pacientes foram tratados com quimioterapia e monitorados para a investigação do aparecimento de trombose.

A perda da qualidade das membranas devido ao longo tempo de conservação e a ausência de CTCs e remanescentes em algumas amostras, permitiu-nos a trabalhar com o material de apenas 19 pacientes.

3.2. CRITÉRIOS GERAIS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para este projeto foram incluídos pacientes do sexo masculino e feminino portadores de câncer gástrico localmente avançado e que não tiveram feito cirurgia 4 semanas antes do estudo e nem realizado tratamento de quimioterapia prévia 4 semanas antes do início do estudo.

Foram excluídos do projeto os pacientes que tiveram realizado cirurgia ou procedimento cirúrgico nas últimas 4 semanas antes do início do estudo; pacientes que tiveram realizado quimioterapia prévia nas últimas três semanas; pacientes com história prévia de outro carcinoma invasivo e com alto risco de recorrência nos últimos dois anos. Além disso, descartamos do estudo as membranas que estavam com mau estado de conservação e que não foram encontradas CTCs e MTCs nos spots analisados.

3.3. DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

Para o preparo das membranas, do estudo anterior, foi necessário a coleta de 8 mL de sangue de cada paciente em tubos contendo o anticoagulante EDTA. As amostras ficaram armazenadas em temperatura ambiente por um período de até 4 horas, em constante homogeneização. Cada amostra foi previamente transferida para um tubo falcon e completada uma solução preparada para pronto-uso de tampão e formaldeído (71mL de tampão e 1,6mL de formaldeído, com pH ajustado para aproximadamente 7,3) até um volume total de 40mL em cada tubo falcon. Esta solução foi incubada por 10 minutos no homogeneizador. Durante a homogeneização, o aparelho ISET® foi preparado para o processo de filtração das amostras. Uma (pré-lavagem) com PBS foi feita tendo a pressão ajustada para -10KPa. Após o preparo do aparelho, um bloco de acrílico contendo na sua porção inferior a membrana porosa de polycarbonato e marcado com as iniciais do paciente, foi encaixado no aparelho e a amostra foi distribuída uniformemente e cada compartimento do bloco e filtrada a uma pressão de -10KPa, logo a filtração uma pequena porção de PBS foi despejada em cada compartimento do bloco para completar o processo de filtração. Após filtração, o bloco foi retirado do aparelho e a membrana foi seca em ar ambiente por 10 minutos no escuro. Após secagem, a membrana foi embrulhada em papel laminado e congelada a -20 °C.

A tecnologia ISET® permite isolar as CTCs e MTCs de forma intacta do sangue periférico por um meio de filtração direta sem a necessidade de utilização de marcação com anticorpos. Por esta metodologia podemos diferenciar o tamanho de uma CTC quando comparadas com um leucócito, que são menores. Essa separação é possível graças a utilização de uma membrana de polycarbonato com poros de formato cilíndrico com 8µm de diâmetro. A célula que fica retida na membrana e que apresentar as seguintes características como: tamanho nuclear igual ou maior que 16µm, irregularidade no contorno nuclear, presença de citoplasma visível, alta proporção de tamanho núcleo-citoplasma (> 0,8) e marcação positiva para CD54 é considerado CTC. (KHOJA et al. 2012; KREBS et al. 2012).

Com a utilização de um microscópio óptico comum (Axioskop 40 -Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (Sony Cyber-shot DSC-S75) foi possível fotografar as membranas e registrar as imagens das CTCs.

3.4. IMUNOCITOQUÍMICA

O ensaio de imunocitoquímica é uma técnica empregada para a identificação de proteínas específicas na membrana citoplasmática das células utilizando substâncias marcadoras com a capacidade de se ligarem aos anticorpos sem que estes percam a sua capacidade de se acoplarem a um antígeno.

Os spots de interesse foram submetidos ao processo de coloração a partir das membranas de policarbonato e colocados em uma placa contendo 24 poços (*wells*). Em cada “poço” contendo um spot, adicionamos 1mL de Retrieval Solution 1x (Dako *Target Retrieval Solution*). Logo após, realizamos a recuperação antigênica das células com o aquecimento por banho-maria no forno de micro-ondas das membranas que foram mergulhadas no Retrieval, por 1 minuto e 40 segundos aproximadamente, após esta etapa deixamos a placa esfriar e o processo foi repetido por 3 vezes consecutivas. Posteriormente secamos os poços retirando o Retrieval com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Cada spot foi hidratado com 160µL de TBS (Tris-Buffered Saline) por 20 minutos. Após o decorrido o tempo removemos o TBS com o auxílio da pipeta. Adicionamos 160 µL de TBS 1 x 0,2% Triton X – 100 em cada spot e incubou-se por exatamente 5 minutos.

Decorrido o tempo, lavamos os spots com TBS 1X e secamos os poços.

Em cada poço adicionamos 100 µL do bloqueador de peroxidase endógena e incubado no escuro em temperatura ambiente por 5 minutos.

Posteriormente, lavamos os spots com TBS 1X e realizamos novamente a secagem dos spots. Para finalizar o processo, foi adicionamos 100µL do anti-corpo de interesse, previamente diluído com TBS e soro fetal bovino 10%. Incubar “overnight” (da noite para o dia) no escuro e em temperatura ambiente.

3.5. CULTURA CELULAR – PADRONIZAÇÃO DO ANTI-CORPO ANTI PODOPLANINA

Para a padronização do anticorpo anti podoplanina (anti PDPN), foi pesquisado no site *The Human Protein Atlas*[®], a linhagem celular tumoral comercial que melhor poderia expressar a marcação da PDPN.

Para o controle positivo, escolhemos a linhagem HEK293 (rim) e como controle negativo foi escolhido a MCF7 (adenocarcinoma mamário), ambas linhagens foram obtidas no banco

de células tumorais do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center.

As linhagens, contidas em *vials*, estavam preservadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas por 5 minutos em isopor com gelo. O conteúdo de cada *vial* foi transferido para tubos de Falcon identificados e submetidos à centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de células foi ressuspensionado em 1mL de meio de cultura DMEN High. O conteúdo de cada tubo de Falcon foi repicado em garrafas de cultura tamanho pequeno e, a elas, foram acrescentadas 4,5mL de meio DMEM High e 70μL de penicilina. Ambas as garrafas foram colocadas para incubação em estufa a 5% de CO₂, 37°C com tampa levemente rosqueada. Todos os dias os meios eram observados quanto a expansão da linhagem e a mudança de cor do meio. No surgimento de mudanças de cor (rosado para amarelado) o meio era renovado.

Após 3 dias de incubação, as linhagens foram transferidas para garrafas médias. Após 4 dias de incubação foi possível observar ao microscópio de luz invertida, que as linhagens já haviam expandido por toda a extensão da parede da garrafa. Com auxílio de 1mL de tripsina, as células foram removidas para um tubo de 15mL contendo 5mL de meio. O tubo foi centrifugado a 1500rpm por 4 min. Uma porção do precipitado foi pipetada e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Cada linhagem foi transferida para um tubo de Falcon de 50mL contendo 10mL de sangue total colhido em tubo de hemograma contendo EDTA com a quantificação desejada. O sangue contendo as células foi então diluído a 1:10 em um tampão de lise de eritrócitos e filtrados pela tecnologia ISET®. Após a filtração, as membranas foram lavadas (PBS), secas e estocadas a (-20°C) até a análise.

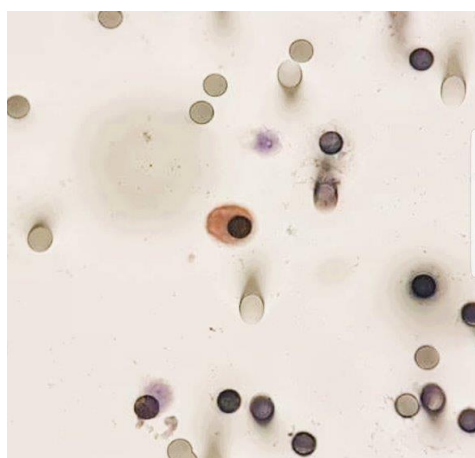
3.6. REALIZAÇÃO DA IMUNOCITOQUÍMICA – CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO ANTI PODOPLANINA

As membranas contendo controle positivo e controle negativo, foram preparadas para a reação de imunocitoquímica. Os *spots* foram recortados, hidratados em TBS em placas com 24-*wells* e posteriormente aquecidos no micro-ondas em *Retrieval Solution* para a recuperação dos epítomos da membrana das células. Após este processo, as membranas foram reidratadas em TBS e tratadas com TBS 1x 0,2% Triton por 5 min. para realizar a permeabilização da membrana celular. Os *spots* foram lavados com TBS e posteriormente foi

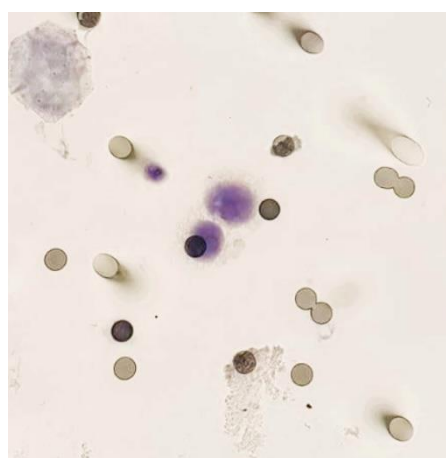
adicionado bloqueador de peroxidase endógena para impedir que ligantes inespecíficos se fixassem nas regiões dos epítomos das células. Os *spots* foram lavados com TBS.

Para a padronização do anticorpo anti podoplanina (anti-PDPL), utilizamos o anticorpo do laboratório *NeoBiotechnologies* (200µg/mL - Lot: 10630-1P210918). Para isso, previamente, titulamos o anticorpo nas concentrações 1:100, 1:300 e 1:500 diluídos com TBS e soro fetal bovino a 10%. Cada *spot* foi marcado com o anticorpo nas concentrações acima e incubados *overnight* em temperatura ambiente no escuro. No dia seguinte, os *spots* foram lavados com TBS e acrescidos de 100µL do reagente HRP (*horseradish peroxidase*) por 20 min. A seguir, o reagente foi removido com TBS e acrescentado solução de 100µL por de DAB (Diaminobenzadina) por 10 min. (DAB- substrato da peroxidase que produz um produto de cor marrom, usado como cromógeno para a visualização de estruturas antigênicas). Os spots foram lavados com água destilada 3 vezes e a eles foi adicionada uma gota de hematoxilina por 2 min. para corar o núcleo celular. Os *spots* foram lavados com água destilada e em seguida foram montados em lâminas utilizando o meio aquoso de montagem (*Mounting Medium/Dako*) e observados em microscópio óptico comum com objetiva de 60x. Após o ensaio de imunocitoquímica, e observação em microscópio, padronizamos o anticorpo anti PDPN na concentração 1:300

Figura 5. Membrana ISET® com células tumorais com marcação positiva e negativa para a podoplanina (PDPN).



Controle positivo PDPN – linhagem HEK293
Anticorpo anti PDPN 1:300



Controle negativo PDPN – linhagem MCF7
Anticorpo anti PDPN 1:300

3.7. REALIZAÇÃO DA IMUNOCITOQUÍMICA – CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO PARA TGF β -RI

Para a marcação de CTC e CTM com anticorpo anti TGF β -RI, utilizamos a padronização de diluição de 1:500 conforme a rotina empregada em estudos de trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo. Para este ensaio, utilizamos o anticorpo do laboratório Sigma Aldrich, Código: SAB4502958. A metodologia de marcação seguiu os mesmos procedimentos empregados nos ensaios com a PDPN.

4. RESULTADOS

4.1. PACIENTES

Amostras de 19 pacientes foram incluídas no estudo, todos com câncer gástrico localmente avançado, tratados no A.C. Camargo Cancer Center e as coletas dos dados foram obtidas a partir de um projeto remanescente previamente aprovado (CEP 2134/15). Foram excluídos do projeto os pacientes que tiveram realizado cirurgia ou procedimento cirúrgico nas últimas 4 semanas antes do início do estudo; pacientes que tiveram realizado quimioterapia prévia nas últimas três semanas; pacientes com história prévia de outro carcinoma invasivo e com alto risco de recorrência nos últimos dois anos. As foram também, descartados dos estudos as membranas que estavam com mau estado de conservação e que não foram encontradas CTCs e CTMs nos spots analisados. A idade mediana foi de 59 anos (variação de 41 a 86). Cada paciente teve a sua doença estadiada como sendo doença localizada, observada em 14 pacientes (73,15%) e doença metastática observada em 4 pacientes (21,05%). O evento TVP ocorreu durante o tratamento neoadjuvante e pode ser observado apenas em 1 paciente do estudo (5,26%) na região dos MMII proximais. O TEP ocorreu em 2 pacientes do estudo (10,52%); trombos associados ao cateter foi observado em 1 paciente (5,26%) porém, não podemos afirmar que este evento está associado exclusivamente a doença, uma vez que as técnicas de manutenção de cateter, quando não aplicadas corretamente, podem induzir o aparecimento deste evento. TVP esplênica foi observada em 1 paciente (5,26%) e tivemos perda de seguimento de um paciente justificado por óbito no início do estudo.

O esquema terapêutico com quimioterapia neoadjuvante foi realizado em 10 pacientes com os seguintes protocolos: FOLFOX (oxaliplatina, leucovorin e fluorouracila) em 8 pacientes, CF (cisplatina e fluorouracila) em 1 paciente e CARBO (carboplatina) em 1 paciente. Quanto à recorrência da doença, encontramos 14 pacientes que ficaram livres de progressão, 1 paciente teve progressão da doença para o fígado e 3 pacientes tiveram progressão da doença para o peritônio. A remoção do tumor primário foi realizada em 15 pacientes e 2 não fizeram tratamento cirúrgico. (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis clínico-patológicas em pacientes com câncer gástrico localmente avançado.

Variáveis		Número	Porcentagem (%)
Idade Mediana no início do estudo (anos)		59	
Estadiamento	doença localizada	14	73,18
	doença metastática	4	21,05
Ausência de eventos	TVP e TEP	13	68,42
TVP	proximal MMSS	0	0
	distal MMSS	0	0
	proximal MMII	1	5,26
	distal MMII	0	0
TEP		2	10,52
Trombo associado ao cateter		1	5,26
TVP esplênica		1	5,26
Tromboflebite		0	0
Perda de segmento		1	5,26
Tratamento	Folfox	8	42,1
	CF	1	5,26
	Carbo	1	5,26
Local de recorrência	Sem informação	1	5,26
	Ausência de recorrência	14	73,68
	Fígado	1	5,26
	Peritônio	3	15,78
Cirurgia tumor primário	Sim	15	78,94
	Não	2	10,52
	Sem informação	2	10,52
Mediana de CTC/mL (1º acompanhamento)	variação de 0 a 21 CTCs/mL		2,93

4.2. ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA PARA PDPN E/OU TGFβ-RI

No início do estudo, o número mediano de CTCs detectadas pelo sistema ISET foi de 1,5 CTCs/mL. Após a análise dos spots de 19 pacientes elegíveis para este estudo, observamos que a marcação positiva de PDPN em CTCs ocorreu em mais da metade dos pacientes.

Especificamente, 10 pacientes apresentaram marcação positiva para PDPN, com uma média de 5 CTCs por paciente, variando de 0 a 1 célula, e um índice de positividade de 0,27. No entanto, o número de pacientes com marcação positiva para TGF- β RI em CTCs foi relativamente menor, com apenas 5 pacientes apresentando CTCs marcadas. A média de CTCs positivas para TGF- β RI foi de 2,5 células/mL, com uma variação de 0 a 2 células, e um índice de positividade de 0.

Após a análise dos 19 pacientes elegíveis para este estudo, observamos que o número de pacientes com dupla marcação (PDPN e TGF- β RI) em CTCs foi relativamente baixo, com apenas dois pacientes apresentando essa característica. Além disso, a marcação positiva para PDPN em CTM foi observada em apenas um paciente, enquanto a marcação positiva de TGF- β RI em CTM foi ausente em todos os spots dos pacientes observados. A análise da dupla marcação (PDPN e TGF- β RI) em CTMs foi observada em apenas um paciente do estudo.

PACIENTE	Podoplanina (PDPN) (nº CTCs positivas/spot)	I.P (índice positividade) PDPN	TGF-β (nº CTCs positivas/spot)	I.P TGF-β RI	Dupla marcação CTC (PDF/TGF-β)	CTM positivo PDPN	CTM TGF-β RI	CTM DUPLA (PDPN e TGF-β)	TOTAL CTC/mL	número spots avaliados
P1	3	0.60	0	0	0	0	0	0	1.25	4,00
P2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	2,00
P3	5	1	2	0.28	0	0	0	0	3	4,00
P4	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	2,00
P5	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	2,00
P6	2	1	0	0	0	0	0	0	2	1,00
P7	1	1	0	0	1	0	0	0	1	3,00
P8	3	0.27	0	0	0	0	0	0	3.66	3,00
P9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,00
P10	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2,00
P11	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	4,00
P12	4	1	0	0	1	0	0	1	6.5	2,00
P13	6	1	0	0	0	1	0	0	3	2,00
P14	1	1	1	1	0	0	0	0	1	2,00
P15	1	0.33	0	0	0	0	0	0	1.5	2,00
P16	0	0	2	0.66	0	0	0	0	1.5	2,00
P17	0	0	2	0.33	0	0	0	0	2	3,00
P18	3	0.75	0	0	0	0	0	0	2	2,00
P19	0	0	2	1	0	0	0	0	1	2,00

Legenda: 0- NEGATIVO; 1-POSITIVO

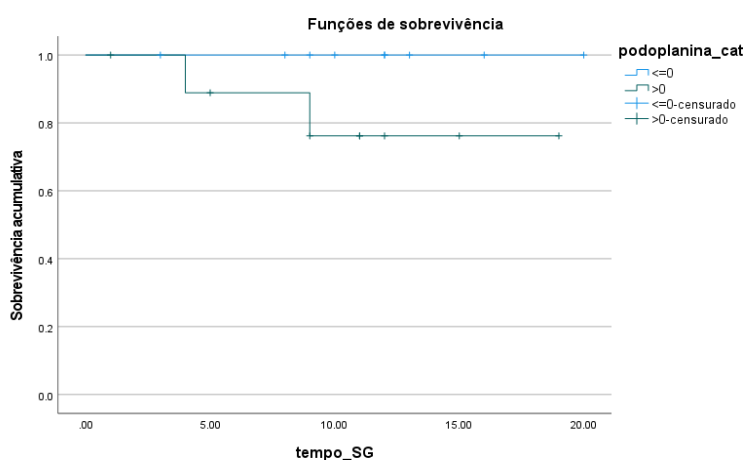
Tabela 2. CTC e CTM com marcação para PDPN e/ou TGF-β RI, número de CTC e CTM por *spot* analisado, índice de positividade da CTC e CTM e número de *spot* analisados por paciente

4.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PODOPLANINA E TGβR-I EM CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES E MICROEMBOLOS TUMORAIS CIRCULANTES E A CORRELAÇÃO COM EVENTO TROMBOEMBÓLICO.

A redução do “n” de pacientes neste estudo, impactou na análise de sobrevida livre de progressão. Tão logo, a interpretação dos resultados foi feita através de uma análise descritiva.

Gráfico 1. Presença da expressão da Podoplanina (PDPN) em CTCs. Em 10 pacientes com a presença da proteína podoplanina (média de 5 CTCs/mL) tiveram uma SG pior do que pacientes que não tiveram a expressão. (20 meses vs. 4,8 meses aproximadamente).

O tempo médio de SG foi de 12,5 meses (20 meses vs. 5 meses). A contagem de CTC não foi associada a SG.



Em um subgrupo de 10 pacientes que apresentaram expressão da proteína podoplanina, com uma média de 5 CTCs/mL, observou-se uma sobrevida global (SG) significativamente pior em comparação com pacientes que não exibiram essa expressão. Especificamente, a SG média para esse grupo foi de aproximadamente 20 meses, enquanto para aqueles sem a expressão de podoplanina foi de cerca de 4,8 meses. Isso sugere que a presença da proteína podoplanina nas CTCs está associada a uma progressão mais rápida da doença e a um prognóstico menos favorável.

Por outro lado, o tempo médio de sobrevida global para todos os pacientes foi de 12,5 meses, destacando a importância da expressão de podoplanina como um fator prognóstico significativo. Curiosamente, a contagem de CTCs não demonstrou uma associação direta com a sobrevida global nesse estudo. Isso sugere que a presença específica da proteína podoplanina nas CTCs pode ser um indicador mais sensível e relevante para prever o desfecho clínico em pacientes com câncer gástrico localmente avançado, em comparação com a contagem absoluta de CTCs. Esses achados têm implicações importantes para estratificação de risco e desenvolvimento de terapias personalizadas para esses pacientes.

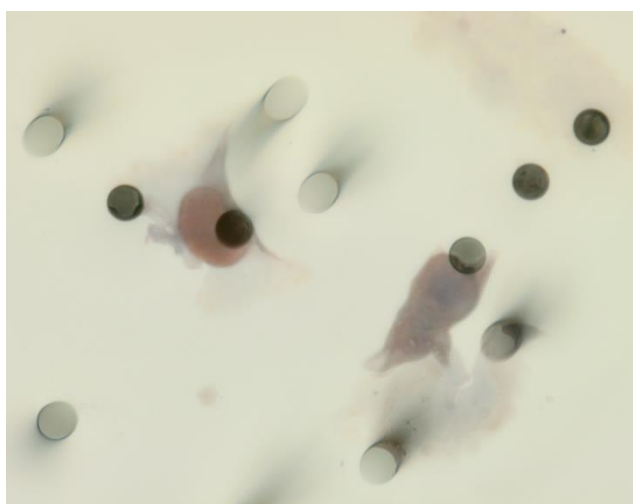
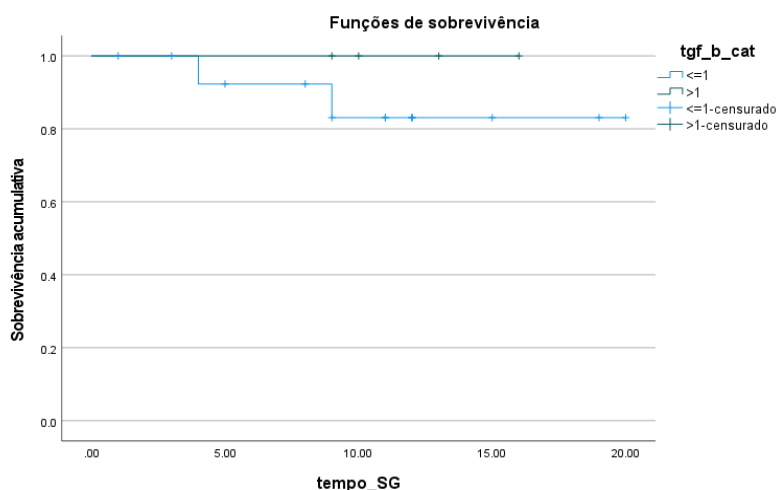


Figura 6. CTC marcação positiva para podoplanina. CTC marcada com anticorpo anti podoplanina (corante DAB).

Gráfico 2. Presença da expressão de TGF β em CTCs. Em 5 pacientes que apresentaram CTC com a expressão de TGF- β tiveram uma SG melhor que os 14 pacientes que não apresentavam CTC marcada para esta proteína (17 meses v.s. 4,8 meses aproximadamente) a contar do primeiro óbito. O tempo médio de SG foi de 10,9 meses. O TGF- β parece não ser um marcador preditivo de diminuição de sobrevida global.



Observou-se que os 5 pacientes que apresentaram CTCs com expressão de TGF- β RI apresentaram uma sobrevida global (SG) melhor em comparação com os 14 pacientes que não tinham CTCs marcadas para esta proteína. Especificamente, o tempo médio de SG para os pacientes com expressão de TGF- β RI foi de aproximadamente 17 meses, enquanto para aqueles sem essa expressão foi de cerca de 4,8 meses, a partir do primeiro óbito. Isso sugere que a presença da expressão de TGF- β RI nas CTCs pode estar associada a um prognóstico mais favorável em pacientes com câncer gástrico localmente avançado.

No entanto, é importante ressaltar que o tempo médio de SG para todos os pacientes foi de 10,9 meses, e o TGF- β parece não ser um marcador preditivo definitivo de diminuição da sobrevida global nesse contexto. Isso indica que outros fatores ou biomarcadores podem desempenhar um papel mais significativo na determinação do prognóstico desses pacientes. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar completamente o papel do TGF- β como

um indicador prognóstico em pacientes com câncer gástrico localmente avançado e sua possível relevância no desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas.

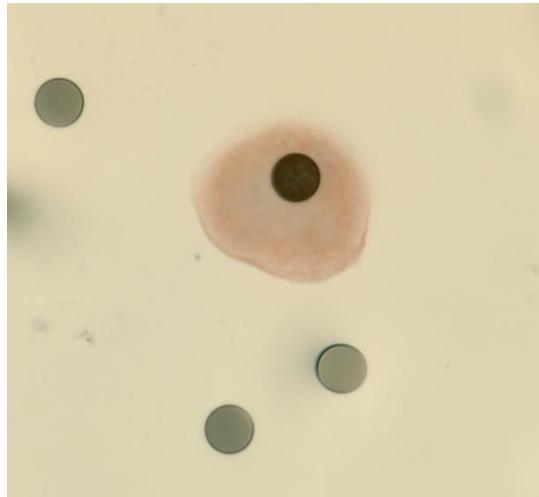
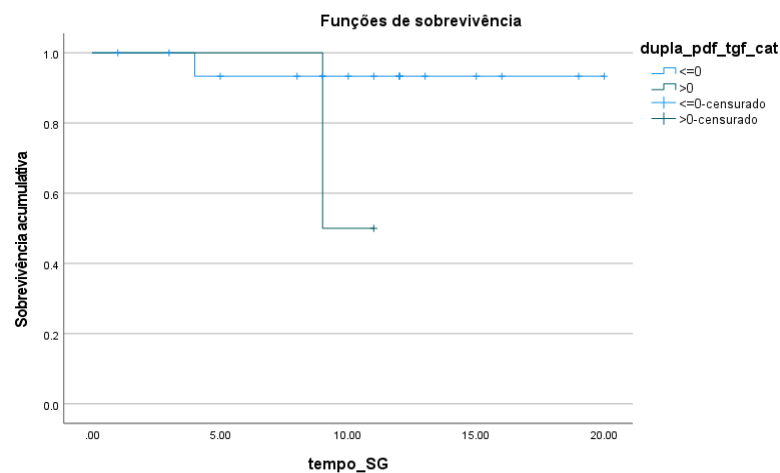


Figura 7. CTC marcação positiva para TGFβ-R1. CTC marcada com anticorpo anti TGFβ-R1 (corante Permanent Red).

Gráfico 3. Presença da expressão da dupla marcação Podoplanina (PDPN) e TGF-β em CTCs: A presença da expressão da dupla marcação (PDPN e TGF-β) nas CTCs evidenciou uma diminuição da sobrevida global (SG) dos pacientes, com 2 pacientes apresentando CTCs com dupla marcação em comparação com 17 pacientes sem marcação. O tempo médio de SG foi de 15,5 meses (aproximadamente 11 meses versus 20 meses).



No Gráfico 3, foi examinado a presença da expressão da dupla marcação Podoplanina (PDPN) e TGF- β em CTCs. Observou-se que a presença da expressão da dupla marcação (PDPN e TGF- β) em CTCs evidenciou uma diminuição significativa da sobrevida global (SG) dos pacientes. Apenas 2 pacientes apresentaram essa característica, em comparação com os 17 pacientes sem marcação. O tempo médio de SG para esse grupo foi de 15,5 meses, aproximadamente 11 meses em comparação com os 20 meses para aqueles sem essa expressão.

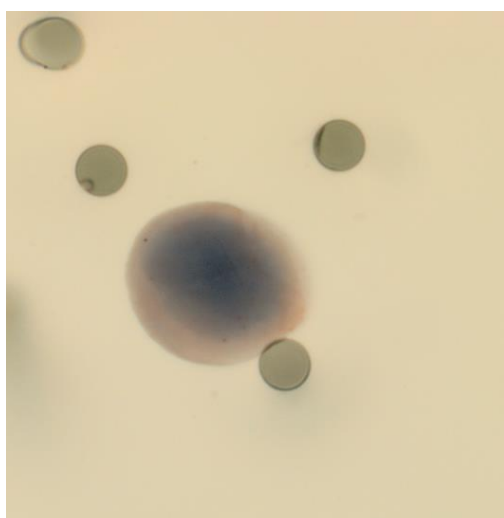
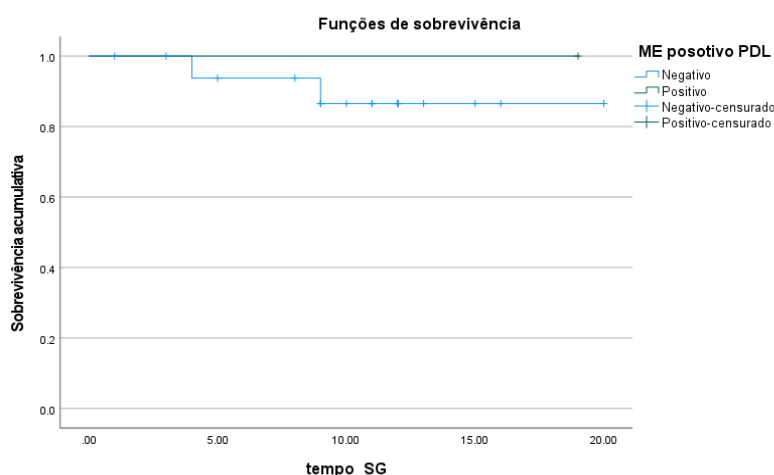


Figura 8. CTC marcação positiva (dupla marcação) para PDPN e TGF β -RI.

Gráfico 4. Presença da expressão da PDPN em microêmbolos tumorais (ME): Um paciente que apresentou a expressão de PDPN em microêmbolos tumorais teve uma sobrevida global maior quando comparado com os 18 pacientes que não apresentaram microêmbolos marcados para a PDPN. A SG média foi de 11,9 meses (aproximadamente 19 meses versus 4,8 meses aproximadamente).



No gráfico 4 foi observado que 1 paciente que apresentou expressão de PDPN em microêmbolos tumorais teve uma SG maior em comparação com os 18 pacientes que não apresentaram microêmbolos marcados para PDPN. A SG média para esse paciente foi de 11,9 meses, aproximadamente 19 meses em comparação com os 4,8 meses para aqueles sem essa expressão.

No entanto, não foram observados microêmbolos tumorais marcados com TGF- β nas amostras dos 19 pacientes do estudo, o que sugere que essa variável não tem impacto na SG dos pacientes portadores de câncer gástrico. Esses resultados indicam que a presença específica de determinadas expressões moleculares em CTCs e microêmbolos tumorais pode ser um fator prognóstico importante e influenciar o desfecho clínico em pacientes com câncer gástrico.

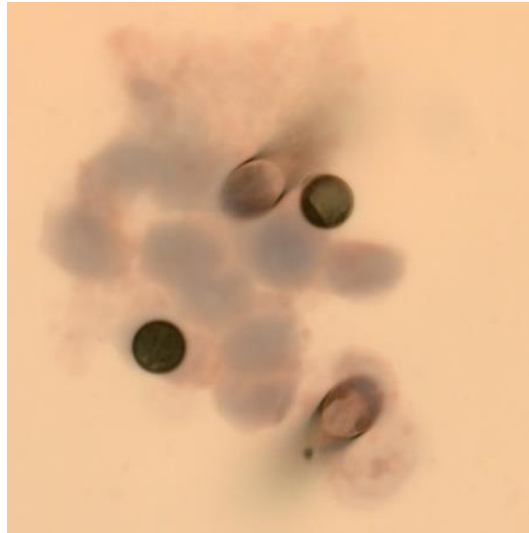
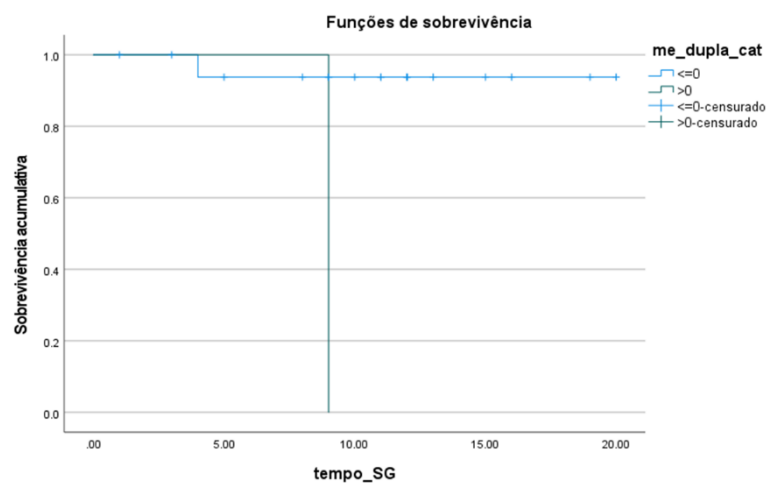


Figura 9. Micro êmbolo tumoral circulante marcação positiva para podoplanina.

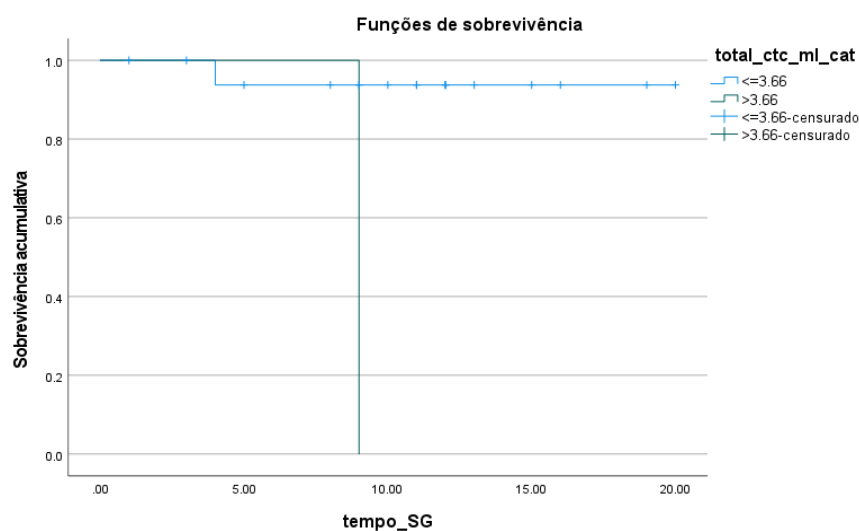
Gráfico 5. Presença da expressão da dupla marcação (PDPN e TGF- β) em micro êmbolo. Observou-se apenas 1 paciente que apresentou amostra com microêmbolos com dupla marcação de Podoplanina (PDPN) e TGF- β . A média de células tumorais circulantes (CTCs) encontrada na amostra foi de 6,5 células/mL. A sobrevida global (SG) desse paciente foi relativamente menor em comparação com os 18 pacientes que não apresentaram microêmbolos marcados, com uma média de SG de 14,5 meses (aproximadamente 9 meses versus 20 meses, respectivamente)



Foi observado apenas um paciente que apresentou amostra com microêmbolos com dupla marcação de Podoplanina (PDPN) e TGF- β . A média de células tumorais circulantes (CTCs) encontrada na amostra foi de 6,5 células/mL e a sobrevida global (SG) do paciente foi relativamente menor quando comparada com os 18 pacientes que não apresentaram microêmbolos marcados. A média da SG foi de 14,5 meses, aproximadamente 9 meses versus 20 meses para aqueles sem essa expressão.

Esses resultados sugerem que a presença da dupla marcação (PDPN e TGF- β) em microêmbolos tumorais podem estar associados a um prognóstico menos favorável em pacientes com câncer gástrico. A presença de micro êmbolos tumorais com essa dupla expressão podem indicar uma maior capacidade de disseminação e progressão da doença, o que pode contribuir para uma menor sobrevida global. Isso ressalta a importância da avaliação desses marcadores em microêmbolos tumorais como um potencial indicador prognóstico em pacientes com câncer gástrico, fornecendo informações valiosas para a estratificação de risco e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

Gráfico 6. Total de CTC/mL. A contagem de células tumorais circulantes (CTCs) nas amostras apresentou uma associação inversa com a sobrevida global (SG) dos pacientes com câncer gástrico. A média de CTCs foi de 1,90 células/mL, enquanto um paciente com 6,5 células/mL teve uma SG de aproximadamente 9 meses. A média da SG foi de 14,5 meses, com uma diferença significativa entre os grupos com contagens mais altas e mais baixas de CTCs (9 meses versus 20 meses aproximadamente).



Observamos uma associação entre a contagem de células tumorais circulantes (CTCs) nas amostras e a sobrevida global (SG) dos pacientes com câncer gástrico. Notavelmente, quanto maior a contagem de CTCs, pior foi a SG dos pacientes. A média de CTCs observada foi de 1,90 células/mL, sugerindo um possível indicador prognóstico para a progressão da doença.

É interessante destacar que, apesar da média de CTCs ser relativamente baixa, um paciente apresentou uma contagem significativamente mais alta, com 6,5 células/mL, e uma SG de aproximadamente 9 meses. Esse achado ressalta a heterogeneidade da doença e a variabilidade na resposta individual ao tratamento.

A média da SG foi de 14,5 meses, com uma diferença notável entre os pacientes com contagens mais altas de CTCs, que tiveram uma SG relativamente menor, em comparação com aqueles com contagens mais baixas, que apresentaram uma SG mais prolongada, em torno de 20 meses aproximadamente. Esses resultados sugerem que a contagem de CTCs pode ser um indicador valioso para estratificar o risco e prever a progressão da doença em pacientes com câncer gástrico, fornecendo insights importantes para o planejamento do tratamento e o monitoramento da resposta terapêutica.

Gráfico 7. Presença de TEV início do tratamento. Pacientes em início de tratamento que desenvolveram trombo embolismo venoso, apresentaram uma diminuição da sobrevida global. A média da SG foi de aproximadamente 7,3 anos (4,8 meses versus 9,8 meses aproximadamente).

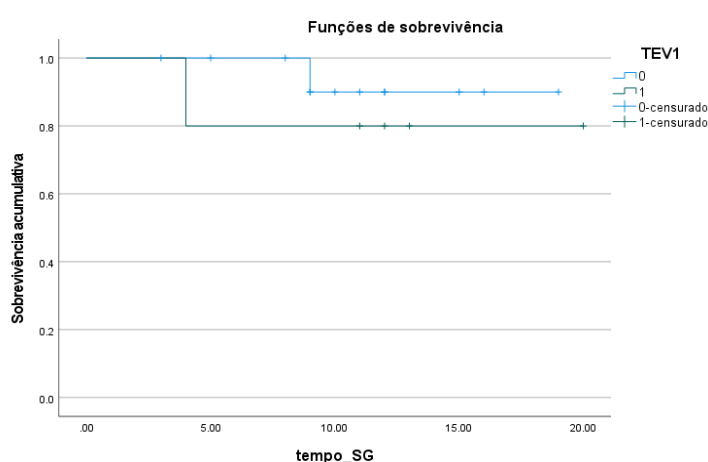
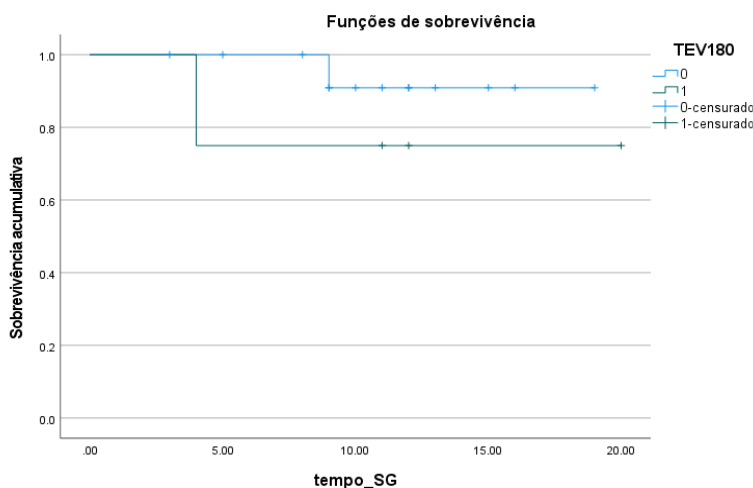


Gráfico 8. Presença de TEV durante tratamento. Pacientes durante o de tratamento que desenvolveram trombo embolismo venoso, também apresentaram uma diminuição da sobrevida global quando comparados ao grupo que não desenvolveu TEV. A média da SG foi de aproximadamente 7,3 anos (4,8 meses versus 9,8 meses aproximadamente).



Tanto os pacientes em início de tratamento quanto aqueles que já estavam em tratamento apresentaram a presença de tromboembolismo venoso (TEV) como um fator de pior prognóstico, com impacto negativo na sobrevida global (SG). Esta observação destaca a relevância do TEV como uma complicação significativa em pacientes com câncer gástrico, influenciando adversamente o desfecho clínico.

A presença de TEV pode indicar uma maior complexidade da doença e um estado pró-trombótico subjacente, que pode estar associado a um aumento do risco de complicações e mortalidade. Além disso, o TEV pode interferir diretamente no tratamento do câncer, levando a interrupções no regime terapêutico e comprometendo a eficácia do tratamento.

Portanto, essa associação entre a presença de TEV e um pior prognóstico ressalta a importância da vigilância e prevenção do TEV em pacientes com câncer gástrico, além da necessidade de estratégias de tratamento abrangentes que levem em consideração não apenas o controle do câncer, mas também a gestão de complicações trombóticas para otimizar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes.

5. DISCUSSÃO

A presença de células tumorais circulantes (CTCs) em pacientes com câncer gástrico e a expressão de proteínas como a podoplanina (PDPN) e o receptor I do fator de crescimento transformador beta (TGF- β RI) parece desempenhar um papel crucial, conforme evidenciado neste estudo, associando-se a eventos tromboembólicos e uma diminuição na expectativa de sobrevida global (SG).

A detecção de CTCs no sangue periférico tem recebido entusiasmo crescente na utilidade clínica de vários tipos de câncer. Desde a década de 1990, muitos estudos foram realizados para indicar a correlação entre CTCs e as características clínico patológicas do tumor gástrico. (Okada & cols. 2017). Nos últimos anos, as aplicações clínicas da detecção de CTCs através de várias tecnologias têm sido gradualmente envolvidas em múltiplos aspectos dos cânceres gastrointestinais, incluindo diagnóstico precoce, planeamento de tratamento, avaliação de eficiência, estratificação prognóstica e monitorização de metástases (Xiong et al, 2020)

Zhang et al (2019) desenvolveu um trabalho com 86 pacientes portadores de câncer gástrico com idade média de 53 anos com o objetivo de correlacionar as (CTCs) no sangue periférico com o potencial de recidiva tumoral e a diminuição da sobrevida global. Ao investigar a correlação entre a positividade da CTCs e as características clínicas, foi observado que a positividade da CTCs não estava significativamente correlacionada com as características clinicopatológicas. No entanto, em pacientes com câncer gástrico em estágio IV, a positividade da CTC correlacionou-se significativamente com a recidiva tumoral pós-tratamento com quimioterapia e diminuição da SG.

Neste trabalho observamos uma associação entre a contagem de células tumorais circulantes (CTCs) nas amostras e a sobrevida global (SG) dos pacientes com câncer gástrico. Quanto maior a contagem de CTCs, pior foi a SG dos pacientes. A média de CTCs observada foi de 1,90 células/mL, sugerindo um possível indicador prognóstico para a progressão da doença. A quantidade de CTCs encontradas por mL de amostra pode ser um fator preditivo para a diminuição da SG. Esses resultados sugerem que a contagem de CTCs pode ser um indicador valioso para estratificar o risco e prever a progressão da doença em pacientes com câncer gástrico.

A PDPN é uma glicoproteína que desempenha um papel importante no desenvolvimento de tumores. O aumento da expressão da PDPN está relacionado diretamente com o mecanismo de malignidade tumoral e é uma característica observada em células tumorais (Suzuki et al., 2023). A capacidade que a PDPN tem em fazer a ativação da agregação plaquetária através da sua ligação com o receptor de lectina C do tipo 2 (CLEC-2) pode estar diretamente relacionada com eventos tromboembólicos (Hiroyuki. S, Kaneko. K.M., Yukinari, K., 2023).

Neste trabalho, foi possível observar que as CTCs que expressaram a marcação de PDPN tiveram uma diminuição na SG, com média de SG de 12,5 meses. Um estudo de meta-análise desenvolvido por Yang et al. (2022) avaliou a relação entre células tumorais circulantes (CTC) e o prognóstico de pacientes com câncer gástrico. Os resultados mostraram que o tempo de sobrevida global e o tempo de sobrevida livre de progressão dos pacientes CTC-positivos foram mais curtos em comparação com os pacientes CTC-negativos.

Quando analisamos a relação de positividade da (PDPN) em CTCs *versus* eventos tromboembólicos, feito por testes não paramétricos como o teste de Teste U de Mann-Whitney, a média do evento tromboembólico foi de 0,40 ou seja, pacientes com CTCs marcadas positivamente com PDPN tiveram mais eventos tromboembólicos quando comparados com os pacientes com marcação negativa para PDPN em CTCs. Acredita-se que a agregação plaquetária induzida por células tumorais seja significativa para metástases hematogênicas. As células tumorais intravasadas recebem estresse de cisalhamento do fluxo sanguíneo e ataques de células imunológicas. (Braun, A.; Anders, HJ; Gudermann, T.; Mammadova-Bach, E., 2021). Para superar e sobreviver na circulação, o PDPN induz a agregação plaquetária ligando-se ao CLEC-2 nas plaquetas, o que promove a embolização e a evasão das células do sistema imunológico. (Takemoto, A.; Miyata, K.; Fujita, N., 2017). Isso reforça a teoria que a PDPN tem capacidade de fazer ativação plaquetária contribuindo para a formação de micro trombos na corrente sanguínea contribuindo para a formação de trombos sistêmicos. Em um trabalho desenvolvido por Chinen et al. (2021) exploraram as características morfológicas, moleculares e fenotípicas das células tumorais circulantes (CTCs) do sangue de pacientes com carcinoma pancreático e correlacionaram os achados com a resposta ao tratamento, sobrevida livre de progressão, sobrevida global (SG) e trombose venosa profunda (TVP). Microêmbolos tumorais circulantes (MTC) foram encontrados em dois dos pacientes e ambos apresentaram TVP onde puderam concluir que houve uma correlação

entre microêmbolos e TVP. Um segundo estudo bem relevante realizado por Gayden, et al. (2021), relata um achado importante da participação da PDPN no mecanismo fisiopatológico das trombooses consiste na demonstração de que em tumores com elevada expressão de PDPN, houve aumento de 5,71 vezes (IC95% 1,52 – 21,26) do risco de TEV.

Entretanto, pacientes com CTCs com marcação positiva para receptor do tipo I de TGF- β tiveram uma maior expectativa na S.G quando comparados com pacientes que apresentaram CTCs não marcadas para TGF β .

O TGF- β é uma citocina pró-inflamatória de dupla funcionalidade caracterizada por realizar o controle de uma série de atividades celulares em condições fisiológicas e patológicas durante o desenvolvimento normal das células e inclusive no processo de carcinogênese. De acordo com as diferentes condições ambientais e os tipos de células, os efeitos fisiológicos do TGF β podem ocorrer de forma heterogênea promovendo a migração/invasão e plasticidade de células tumorais por meio da ativação da transição epitélio mesênquima (Hiroyuki. S, Kaneko. K.M., Yukinari, K., 2023). Esses fatores ajudam as células tumorais a extravasarem e proliferar em locais metastáticos. O TGF- β funciona como um supressor de tumor e induz a apoptose. Este efeito é mediado pela ativação da via canônica de SMAD via acoplamento do receptor 1 TGF- β (TGF β -RI) (Grover et al. 2017).

Vários trabalhos realizados por Chinen et al., apontam para esta evidência. Quanto maior a quantidade de CTCs circulantes maiores são as chances de eventos tromboembólicos por ativação de fatores de coagulação via fator VIIa em função da presença de fatores tissulares presentes na membrana das CTCs (Witek et al., 2017).

A presença do aparecimento do evento tromboembólico seja ele no início do tratamento e/ou durante o tratamento diminui a expectativa de vida com diminuição da S.G.

A ativação da coagulação sanguínea em pacientes com câncer é complexa e multifatorial, tornando os pacientes particularmente vulneráveis ao TEV. As CTCs podem usar uma variedade de substâncias para ativar os mecanismos de coagulação. Os mecanismos de trombose variam dependendo do paciente e do tipo de tumor e proporcionam efeitos específicos no processo trombótico. Portanto, o conhecimento desses mecanismos é importante para prevenir o TEV nesses pacientes. Por se tratar de um fenômeno frequente e com impacto negativo na evolução clínica, a identificação dos subgrupos de pacientes mais envolvidos no desenvolvimento do TEV permitirá intervir rapidamente para prevenção ou

tratamento mais eficaz nesta população contribuindo para uma menor morbidade e maior sobrevida (Kock et al., 2019).

6. CONCLUSÃO

- O aumento do número de CTCs nas amostras e com marcação positiva para PDPN pode estar relacionado com um pior prognóstico e diminuição da SG.
- A presença de CTCs com receptor tipo I para TGF- β , não mostrou estar relacionado com a diminuição da S.G e nem com a incidência de eventos tromboembólicos. Isso indica que outros fatores ou biomarcadores podem desempenhar um papel mais significativo na determinação do prognóstico desses pacientes.
- Tromboembolismo venoso (TEV) é um fator de pior prognóstico, com impacto negativo na sobrevida global (SG) de pacientes portadores de câncer gástrico.
- Estudos adicionais com amostras maiores de pacientes e inclusão de novos parâmetros de interpretação, devem ser desenvolvidos para reforçar os resultados relacionados a presença das proteínas PDPN e TGF β -RI em CTCs e MTC de pacientes portadores de câncer gástrico e a correlação com eventos tromboembólicos.

7. REFERÊNCIAS

Arnold M, Ferlay J, van Berge Henegouwen MI, Soerjomataram I. Global burden of oesophageal and gastric cancer by histology and subsite in 2018. *Gut*. 2020 Sep;69(9):1564-1571.

Arnold M, Rutherford MJ, Bardot A, Ferlay J, Andersson TM, Myklebust TÅ, et al. Progress in cancer survival, mortality, and incidence in seven high-income countries 1995-2014 (ICBP SURVMARK-2): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2019 Nov;20(11):1493–505.

Boya M, Chu C-H, Liu R, Ozkaya-Ahmadoy T, Fatih Sarioglu A et al. (2020) Circulating tumor cell enrichment technologies. In Schaffner F, Merlin J-L, von Bubnoff N (eds): *Tumor Liquid Biopsies* Vol. 215, pp. 25–55.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2022.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer: câncer de estômago. 2022 [citado 2021 Ago 8]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-estomago>

Braun, A.; Anders, HJ; Gudermann, T.; Mammadova-Bach, E. Interação Plaquetas-Câncer: Mecanismos Moleculares e Novos Caminhos Terapêuticos. *Frente. Oncol*. **2021**

Budakoti M, Panwar AS, Molpa D, Singh RK, Büsselberg D, Mishra AP, Coutinho HDM, Nigam M. Micro-RNA: The darkhorse of cancer. *Cell Signal*. 2021 Jul;83:109995. doi: 10.1016/j.cellsig.2021.109995. Epub 2021 Mar 27. PMID: 33785398.

Carmo LL. Estômago. Disponível em: <https://www.kenhub.com/pt/library/anatomia/estomago>

Chang WH, Cerione RA, Antonyak MA. Extracellular Vesicles and Their Roles in Cancer Progression. *Methods Mol Biol*. 2021; 2174:143-170. doi: 10.1007/978-1-0716-0759-6_10. PMID: 32813249; PMCID: PMC8008708.

Chemi F, Mohan S, Guevara T, Clipson A, Rothwell DG, Dive C. Early Dissemination of Circulating Tumor Cells: Biological and Clinical Insights. *Front Oncol*. 2021 May 7;11:672195.

Devriese LA, Voest EE, Beijnen JH, Schellens JH. Circulating tumor cells as pharmacodynamic biomarker in early clinical oncological trials. *Cancer Treat Rev*. 2011 Dec;37(8):579–89.

Fanelli MF, Oliveira TB, Braun AC, Corassa M, Abdallah 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;39(11):2283–92.

Felding-Habermann B, Habermann R, Saldívar E, Ruggeri ZM. Role of beta3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. *J Biol Chem*. 1996 Mar;271(10):5892–900.

Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968 Sep;61(1):46–52.

Goss PE, Lee BL, Badovinac-Crnjevic T, Strasser-Weippl K, Chavarri-Guerra Y, St Louis J, et al. Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. *Lancet Oncol*. 2013 Apr;14(5):391–436.

Heidrich I, Ačkar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K. Liquid biopsies: Potential and challenges. *Int J Cancer*. 2021 Feb 1;148(3):528–545. doi: 10.1002/ijc.33217. Epub 2020 Aug 10. PMID: 32683679.

Heit JA, Mohr DN, Silverstein MD, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Predictors of recurrence after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based cohort study. *Arch Intern Med*. 2000 Mar;160(6):761–8.

Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, Saikawa Y, Suda K, Ando T, Kumagai K, Irino T, Yoshikawa T, Matsuda S, Kitajima M, Kitagawa Y. Significado clínico das células tumorais circulantes no sangue de pacientes com doenças gastrointestinais cânceres. *Ann Surg Oncol*. 2008; 15:3092–3100.

Hofste, Lisa SMMSc. 1 ; Geerlings, Maartje J. Ph.D. 1 ; Kamping, Eveline JBSc. 1 ; Kouwenhoven, Nadine DHMSc. 1 ; von Rhein, Daniel Ph.D. 1 ; Jansen, Erik AMBSc. 1 ; Garms, Linda MBSc. 2 ;

Nagtegaal, Iris DMD, Ph.D. 3 ; van der Post, Rachel SMD, Ph.D. 3 ; de Wilt, Johannes HWMD, Ph.D. 2 ; Klarenbeek, Bastiaan RMD, Ph.D. 2 ; Ligtenberg, Marjolijn JL Ph.D. 1,3. Clinical validity of tumor-informed circulating tumor DNA analysis in patients undergoing surgery for colorectal metastases. *Diseases of the Colon and Rectum* 66(6):p 796-804, junho de 2023. | DOI: 10.1097/DCR.0000000000002443

Keller L , Pantel K . Desvendando a heterogeneidade do tumor por meio do perfil de células únicas de células tumorais circulantes . *Nat Rev Cancer* . 2019 ; **19** : 553 - 567 .

Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost*. 2007;5(3):632–4.

Khorana AA, Francis CW. Risk prediction of cancer-associated thrombosis: appraising the first decade and developing the future. *Thromb Res*. 2018 Apr;164 Suppl 1:S70–6.

Leblanc R, Peyruchaud O. Metastasis: new functional implications of platelets and megakaryocytes. *Blood*. 2016 Jul 7;128(1):24-31.

Lozar T, Gersak K, Cemazar M, Kuhar CG, Jesenko T (2019) The biology and clinical potential of circulating tumor cells. *Radiol Oncol* 53: 2: 131–147.

Meikle CK, Kelly CA, Garg P, Wuescher LM, Ali RA, Worth RG. Cancer and Thrombosis: The Platelet Perspective. *Front Cell Dev Biol*. 2017 Jan;4:147.

Moon D, Lindsay DP, Hong S, Wang AZ. Clinical indications for, and the future of, circulating tumor cells. *Adv Drug Deliv Rev*. (2018) 125:143–50.

Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol*. 2012 Jul;4(7):156–69.

Okabe H, Tsunoda S, Hosogi H, Hisamori S, Tanaka E, Tanaka S, Sakai Y. Células tumorais circulantes como um preditor independente de sobrevivência em câncer gástrico avançado. *Ann Surg Oncol*. 2015; 22:3954-61.

Peter J. Kahrilas (2019): Hiatus hernia, S. Grover (Ed.) UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc.

Saldova R, Reuben JM, Abd Hamid UM, Rudd PM, Cristofanilli M. Levels of specific serum N-glycans identify breast cancer patients with higher circulating tumor cell counts. *Ann Oncol*. 2011 May;22(5):1113–9.

Salvianti F, Pazzagli M, Pinzani P. Single circulating tumor cell sequencing as an advanced tool in cancer management. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(1):51–63.

Slagter AE, Sikorska K, Grootsholten C, van Laarhoven HWM, Lind P, Nordsmark M, Meershoek-Klein Kranenbarg E, van de Velde CJH, van Grieken NCT, van Sandick JW, Jansen EPM, Verheij M, Cats A. Venous thromboembolism during preoperative chemotherapy in the CRITICS gastric cancer trial. *Cancer Med*. 2020 Sep;9(18):6609-6616.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249.

Suzuki H, Kaneko MK, Kato Y. Roles of Podoplanin in Malignant Progression of Tumor. *Cells*. 2022 Feb 7;11(3):575.

Suzuki-Inoue K. Platelets and cancer-associated thrombosis: focusing on the platelet activation receptor CLEC-2 and podoplanin. *Blood*. 2019 Nov 28;134(22):1912-1918.

Tang L, Zhao S, Liu W, Parchim NF, Huang J, Tang Y, Gan P, Zhong M. Precisão diagnóstica da detecção de células tumorais circulantes no câncer gástrico: revisão sistemática e meta-análise. *Câncer BMC*. 2013; 13:314.

Timp JF, Braekkan SK, Versteeg HH, Cannegieter SC. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood*. 2013 Sep 5;122(10):1712-23.

Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:213–228. 10.1038/nrm.2017.125

Vasseur A, Kiavue N, Bidard FC, Pierga JY, Cabel L. Clinical utility of circulating tumor cells: an update. *Mol Oncol*. 2021 Jun;15(6):1647-1666. doi: 10.1002/1878-0261.12869. Epub 2020 Dec 25. PMID: 33289351; PMCID: PMC8169442.

Verso M, Agnelli G, Barni S, Gasparini G, LaBianca R. A modified Khorana risk assessment score for venous thromboembolism in cancer patients receiving chemotherapy: the Protecht score. *Intern Emerg Med*. 2012 Jun;7(3):291-2.

Volckmar AL, Sültmann H, Riediger A, et al. Um guia de campo para diagnósticos de câncer usando DNA livre de células: dos princípios à prática e aplicações clínicas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018; 57:123–139.

Ward, M.P., E. Kane, L., A. Norris, L. *et al*. Platelets, immune cells and the coagulation cascade; friend or foe of the circulating tumour cell?. *Mol Cancer* **20**, 59 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01347-1>

Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, Cai H, Di Vizio D, Driedonks TAP, Erdbrügger U, Falcon-Perez JM, Fu QL, Hill AF, Lenassi M, Lim SK, Mahoney MG, Mohanty S, Möller A, Nieuwland R, Ochiya T, Sahoo S, Torrecilhas AC, Zheng L, Zijlstra A, Abuelreich S, Bagabas R, Bergese P, Bridges EM, Brucale M, Burger D, Carney RP, Cocucci E, Crescitelli R, Hanser E, Harris AL, Haughey NJ, Hendrix A, Ivanov AR, Jovanovic-Talisman T, Kruh-Garcia NA, Ku'ulei-Lyn Faustino V, Kyburz D, Lässer C, Lennon KM, Lötvall J, Maddox AL, Martens-Uzunova ES, Mizenko RR, Newman LA, Ridolfi A, Rohde E, Rojalin T, Rowland A, Saftics A, Sandau US, Saugstad JA, Shekari F, Swift S, Ter-Ovanesyan D, Tosar JP, Useckaite Z, Valle F, Varga Z, van der Pol E, van Herwijnen MJC, Wauben MHM, Wehman AM, Williams S, Zendrini A, Zimmerman AJ; MISEV Consortium; Théry C, Witwer KW. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. 2024 Feb;13(2):e12404. doi: 10.1002/jev2.12404. Erratum in: *J Extracell Vesicles*. 2024 May;13(5):e12451. doi: 10.1002/jev2.12451. PMID: 38326288; PMCID: PMC10850029.

Witek MA, Aufforth RD, Wang H, Kamande JW, Jackson JM, Pullagurla SR, Hupert ML, Usary J, Wysham WZ, Hilliard D, Montgomery S, Bae-Jump V, Carey LA, Gehrig PA, Milowsky MI, Perou CM, Soper JT, Whang YE, Yeh JJ, Martin G, Soper SA. Discrete microfluidics for the isolation of circulating tumor cell subpopulations targeting fibroblast activation protein alpha and epithelial cell adhesion molecule. *NPJ Precis Oncol*. 2017;1:24

ANEXO 1. CARTA DE SOLICITAÇÃO DE EMENDA AO PROJETO.

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

São Paulo, 29 de março de 2022.

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

Ao Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center

Registro CEP: 2134/15

Título do Projeto: Genômica de Adenocarcinomas Gástricos.

Pesquisador responsável: Emmanuel Dias-Neto

Nome do aluno: Adriano Brigatti Jarmelo

E-mail aluno:

Classificação do projeto:

☐ Iniciação Científica ☐ Especialização ☒ Mestrado ☐ Doutorado

☐ Pós-Doutorado ☐ Departamental ☐ Outro:

Prezados Senhores,

Venho por meio desta solicitar a autorização para a realização do seguinte projeto correlacionado ao meu temático: “Avaliação da Expressão de Podoplanina e de TGF- β RI em Células Tumorais Circulantes Provenientes de Pacientes com Câncer Gástrico e sua Correlação com Eventos Tromboembólicos”, cujos objetivos são: - avaliar a correlação entre os níveis de CTCs/CTM antes da neoadjuvância com trombose e com as sobrevidas livre de progressão e global;-verificar a expressão de podoplanina e de TGF- β RI nas CTCs/CTM e sua correlação com a presença de eventos tromboembólicos.

O material já foi todo coletado, pois constitui parte do projeto supracitado e encontra-se armazenado em nosso freezer. Assim, a análise será retrospectiva, com tamanho amostral de 60 pacientes.

Este projeto será conduzido pelo Adriano B. Jarmelo, aluno de Mestrado da Dra. Ludmilla Chinen, colaboradora do projeto temático.

Atenciosamente,

Pesquisador Responsável: Emmanuel Dias-Neto, PhD

Data:30/03/2022