



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Urologia

Células Tumorais Circulantes como Biomarcador no Carcinoma de Células Renais – Revisão das Técnicas de Detecção

Diana Inês Caldeira Lopes

AGOSTO'2018



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Urologia

Células Tumorais Circulantes como Biomarcador no Carcinoma de Células Renais – Revisão das Técnicas de Detecção

Diana Inês Caldeira Lopes

Orientado por:

Dr. Tito Palmela Leitão

AGOSTO'2018

Resumo

O Carcinoma de Células Renais (CCR) corresponde a 2-3 % dos tumores sólidos e representa a condição urológica maligna mais letal. A sua incidência tem aumentado e atualmente a sobrevida global a 5 anos é de apenas 49%.

O diagnóstico do CCR é na sua maioria acidental, tendo as manifestações clínicas e a avaliação laboratorial um papel limitado. Isto aliado à sua rápida disseminação hematogénea faz com que 25% dos indivíduos apresente metástases no momento do diagnóstico.

Quando o diagnóstico é feito precocemente, o tratamento preferencial é a cirurgia, sendo o único com potencial curativo. Nos restantes casos, está indicada a realização de terapia sistémica, com aumento da sobrevida, mas importantes efeitos adversos. Ambos exigem monitorização, que atualmente carece de indicações padronizadas.

Deste modo, é necessário o investimento em alternativas aos métodos de diagnóstico, à abordagem e à monitorização da doença.

As células tumorais circulantes (CTC) enquanto biomarcador têm sido alvo de intensa investigação em vários tipos de neoplasias pois acredita-se que poderão constituir uma ferramenta clínica valiosa no que concerne ao diagnóstico precoce, estadiamento, monitorização, prognóstico e seleção de terapêuticas apropriadas. A sua deteção é desafiante, requerendo um conhecimento aprofundado das suas características morfológicas e moleculares por forma a desenvolver métodos com elevada especificidade e sensibilidade. Atualmente, existe uma grande variedade de métodos de deteção de CTC, baseando-se a maioria em propriedades das células epiteliais. Contudo, no CCR estas técnicas revelam-se pouco eficazes, pois no decorrer do processo de metastização as CTC perdem características epiteliais e passam a expressar características mesenquimatosas. Esta revisão destaca dois estudos que abordam duas técnicas diferentes de deteção de CTC mais adequadas ao CCR. No entanto, é premente o investimento na otimização dos métodos de isolamento existentes, permitindo a utilização das CTC na prática clínica com o intuito de uma abordagem mais individualizada do CCR.

Palavras-chave: carcinoma de células renais, biomarcador, células tumorais circulantes

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML

Abstract

Renal Cell Carcinoma corresponds to 2-3% of solid tumors and represents the most lethal malignant urologic condition. Its incidence has increased and currently the overall survival is only 49%, 5 years after.

The diagnosis of CCR is mostly accidental and clinical manifestations and laboratory evaluation play a limited role. This combined with its rapid hematogenous' dissemination is responsible for the metastatic presentation on 25% of individuals by the time of diagnosis.

When the diagnosis is done early, the preferential treatment is the surgery, being the only potentially curative. In the other cases, it is indicated the realization of systemic therapy, with increased survival, but important adverse effects. Both require monitoring, which currently lacks standardized indications.

In this way, investment in the disease's alternative diagnostic methods, approach and monitoring is necessary.

Circulating Tumour Cells (CTC) as a biomarker has been the subject of intense research into various types of cancer because it is believed that they may constitute a valuable clinical tool regarding early diagnosis, staging, monitoring, prognosis and selection of appropriate therapies. Its detection is challenging, requiring an in-depth knowledge of its morphological and molecular characteristics in order to develop methods with high specificity and sensitivity. Currently, there is a wide variety of CTC detection methods, based mostly on epithelial cell properties. However, in CCR these techniques are not very effective, because in the course of the metastatic development, the CTC lose epithelial characteristics and begin to express mesenchymatous' characteristics.

This review highlights two studies that address two innovative CTC detection techniques more appropriate to CCR. However, investment in the optimization the current isolation methods is urgent, allowing the use of CTC in clinical practice with the aim of a more individualized approach to CCR.

Key Words: renal cell carcinoma, biomarker, circulating tumor cells

The final work expresses the opinion of the autor and not the FML.

ÍNDICE

Resumo	1
Abstract	2
Lista de Abreviaturas	4
Introdução	5
Metodologia	6
Epidemiologia do Carcinoma de Células Renais	7
Fatores de Risco para Carcinoma de Células Renais	8
Patofisiologia e Genética do Carcinoma de Células Renais	8
Diagnóstico do Carcinoma de Células Renais	10
Tratamento do Carcinoma de Células Renais	12
Seguimento Pós-Operatório no Carcinoma de Células Renais	14
Células Tumorais Circulantes como Biomarcadores	15
Células Tumorais Circulantes no Carcinoma de Células Renais	22
Conclusão	25
Agradecimentos	27
Bibliografia	28

Lista de Abreviaturas

CTC Células Tumorais Circulantes

CCR Carcinoma de Células Renais

CCRcc CCR de células claras

CCRp CCR papilar

CCRc CCR cromóforo

TC Tomografia Computorizada

RM Ressonância Magnética

PSA Antígeno específico da próstata

CEA Antígeno carcinoembrionico

TEM Transição epitélio-mesênquima

CTD Células tumorais disseminadas

FDA Food and Drug Administration

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF A Vascular Endothelial Growth Factor A

VEGFR Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

PDGFR Platelet Derived Growth Factor Receptor

MAPK Mitogen Activated Protein Kinases

ERK Extracellular signal-regulated kinases

PD-1 Programmed cell death protein 1

mTOR mammalian target of rapamycin

CK cytokeratin

TGF- β Transforming growth factor beta

IL-6 Interleucina 6

PCR Polymerase Chain Reaction

RT PCR Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

FISH Fluorescence In Situ Hybridization

Introdução

O Carcinoma de Células Renais (CCR) apresenta uma incidência e prevalência preocupantes, com tendência crescente nos últimos anos. É a condição urológica maligna com maior mortalidade associada, com predominância no gênero masculino, sendo que o estágio clínico no momento do diagnóstico influencia significativamente o prognóstico. Nos últimos anos os métodos diagnósticos bem como as opções terapêuticas médicas e cirúrgicas têm sofrido alterações. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo a realização de uma revisão de literatura acerca da epidemiologia, fatores de risco, patofisiologia e genética, diagnóstico clínico e imagiológico e opções terapêuticas por forma a atualizar o conhecimento nestes domínios.

Com este trabalho numa primeira fase será abordado o CCR enquanto patologia, destacando aquelas que são as principais limitações encontradas na prática clínica relativamente ao diagnóstico, abordagem terapêutica e *follow up*. Numa segunda fase, será explorado em particular o papel das Células Tumorais Circulantes enquanto biomarcador no CCR.

Metodologia

O presente trabalho constitui uma revisão bibliográfica sobre as Células Tumorais Circulantes no Carcinoma de Células Renais, baseando-se na evidência científica disponível e informação mais atual. A escolha do tema foi determinada primariamente pela necessidade de rever o estado da arte.

Foi efetuada uma pesquisa de publicações em língua inglesa no período entre 1988 e 2018 indexadas à Medline/Pubmed, relativas ao Carcinoma de Células Renais e Células Tumorais Circulantes, utilizando palavras-chave em língua inglesa: *renal cell carcinoma*, *biomarker*, *circulating tumor cells*. Os artigos foram analisados e selecionados de acordo com a pertinência da informação para posterior inclusão e citação neste trabalho.

Epidemiologia do Carcinoma de Células Renais

O Carcinoma de Células Renais (CCR) corresponde a 2-3% de todos os tumores sólidos (1) e representa a condição urológica maligna mais letal (2).

Ao longo das últimas décadas a incidência do CCR aumentou cerca de 2%, sendo maior nos países desenvolvidos (1). Em 2013, mais de 350 000 indivíduos foram diagnosticados e estima-se que por ano ocorram mais de 140 000 mortes devido a esta patologia (3). Relativamente à distribuição por géneros, predomina no sexo masculino, na relação de 1,5:1, sendo o seu diagnóstico mais frequente na sétima década de vida (4).

Ao longo das últimas três décadas registou-se uma melhoria nas taxas de sobrevida relativas (3): na Europa, a mortalidade atingiu um pico de 4,8 em 100 000 entre 1990 e 1994 diminuindo para 4,1 em 100 000 (-13%) entre 2000 a 2004 (4); nos EUA, a taxa de sobrevida relativa a 5 anos aumentou de 50% de 1975 a 1977 para 57% de 1987 a 1989 e atingiu 73% em 2003-2009 (5).

A sobrevida global a 5 anos no CCR é 49% - registando-se um aumento desta desde 2006 devido ao maior número de diagnósticos incidentais e à introdução dos Inibidores da Tirosina Cinase no seu tratamento (1) – e de 90-95% nos doentes com estádios I e II (6). Cerca de 20% dos doentes apresenta um estágio avançado no momento do diagnóstico e no caso de doença localizada verifica-se que 30% apresentam recorrência e metástases após a ressecção do tumor (3).

As taxas de mortalidade estão estáveis ou a diminuir na maioria dos países ocidentais, mas o declínio é mais pronunciado no Ocidente do Continente Europeu e no Norte do Americano em comparação, respetivamente, ao Oriente e ao Sul (7).

Fatores de Risco para Carcinoma de Células Renais

O tabagismo, a hipertensão (HTA) e obesidade são fatores de risco consensuais para o CCR. Não obstante, não podemos ignorar o facto de que doentes com estas comorbilidades realizarem com maior frequência exames imagiológicos, o que pode refletir-se num aumento do diagnóstico incidental de massas renais (3). Outros fatores de risco, menos suportados pela literatura, serão: um familiar em primeiro grau com CCR (1); hábitos dietéticos específicos (carnes vermelhas (8), vegetais da família das crucíferas); exposição ocupacional a determinados carcinogéneos; toma recorrente de paracetamol e anti-inflamatórios não esteroides; nefrolitíase e hepatite viral. Já o consumo moderado de álcool, por razões desconhecidas, aparenta ter um efeito protetor (1).

Alguns grupos de risco identificados são: portadores da Doença de Von Hippel Lindau - mais de 70% desenvolverá CCR geralmente em idade jovem (1); indivíduos com Doença Renal em Estádio Terminal – que apresentam um risco 5-35 vezes superior ao da população em geral para o desenvolvimento da doença (9) e transplantados renais – estes com um risco 10-100 vezes superior de vir a desenvolver CCR quer no rim nativo, quer no enxerto (10).

Patofisiologia e Genética do Carcinoma de Células Renais

O CCR abrange um grupo heterogéneo de tumores com alterações genéticas e moleculares que os diferenciam, características estas que condicionam o prognóstico, aconselhamento do doente e tratamento (11).

Os três tipos histológicos de CCR mais frequentes são: CCR de células claras (CCRcc), CCR papilar (CCRp) tipo I e II e o CCR cromóforo (CC Rc). Em conjunto correspondem a 85-90% de todos tumores malignos do rim (3). O CCRcc é dos três o que apresenta pior prognóstico, seguido pelo CCRp e pelo CC Rc (1).

Outros cancros menos comuns incluem o adenoma papilar, o carcinoma de células claras quístico multinodular, o tumor híbrido cromóforo e oncocítico, o carcinoma dos ductos colectores de Bellini, o carcinoma renal medular ou o carcinoma associado ao neuroblastoma. (12).

A maior parte das massas renais encontra-se inicialmente confinada a um órgão, mas a rápida disseminação hematogénea faz com que 25% dos indivíduos com CCR apresente metástases no momento do diagnóstico (2) - Pulmão, osso e cérebro são os locais mais frequentes.

O CCR pode ser esporádico ou hereditário (5 a 8%), mas ambas as formas estão geralmente associadas a alterações estruturais no braço curto do cromossoma 3 (13).

Mutações somáticas ou alterações epigenéticas do VHL, um gene supressor de tumores, são identificadas em mais de 80% dos CCRcc.

Estudos de sequenciação identificaram outros genes envolvidos no processo patogénico: PBRM1, BAP1, SETD2, TCEB1, KDM5C, contudo, os estudos realizados com o objetivo de perceber o efeito destas mutações na clínica apresentam limitações metodológicas entre as quais amostras pequenas, seguimento pós-operatório de curta duração e ausência de avaliação de múltiplos marcadores na mesma coorte (3).

As formas hereditárias de CCR incluem o Síndrome de von Hippel-Lindau (VHL 3p25–26), o CCR papilar hereditário (MET 7q31–34), o Síndrome de Birt-Hogg-Dubé (FLCN 17p11), a Leiomiomatose Hereditária (FH 1q42–43) e a Esclerose Tuberosa (TSC1 9q34 ou TSC2 16p13) (3).

Diagnóstico do Carcinoma de Células Renais

Tanto o exame físico como a avaliação laboratorial apresentam um papel limitado no diagnóstico do CCR. As alterações provocadas nos parâmetros laboratoriais são inespecíficas e não existe nenhuma variação patognomónica (3).

Atualmente, apenas 30% dos doentes são diagnosticados com base nos sintomas (3) e só 6 a 10% apresentam a “tríade clássica” de dor no flanco, hematúria e massa abdominal palpável - frequentemente associada a histologia agressiva e doença avançada (14). Destes, 30% apresentam Síndrome Paraneoplásico (Hipercalcémia, Síndrome de Stauffer, Neuropatia ou Amiloidose) (1), associação que parece ser independente do estágio do tumor. (3)

A crescente utilização dos exames imagiológicos – Ecografia, Tomografia Computorizada (TC), Ressonância Magnética (RM) - na prática clínica é responsável pelo aumento do número de tumores detetados incidentalmente. Estes, geralmente, são mais pequenos e estão associados a uma maior sobrevida, independentemente do grau e estágio do tumor (15).

Embora o CCR seja frequentemente detetado através de ecografia abdominal, esta técnica apresenta limitações de especificidade e sensibilidade (3). Estudos revelam que as taxas de deteção da ecografia dependem do tamanho da massa renal, permitindo detetar 85–100% dos tumores > 3 cm, mas apenas 67–82% dos tumores 2–3 cm (16). A TC, com e sem contraste - a captação ou não de contraste é um importante parâmetro de avaliação/diagnóstico - e a RM são as técnicas de imagem de eleição para diagnóstico e estadiamento, permitindo: confirmar achados ecográficos suspeitos; caracterizar massas renais e avaliar a existência de possíveis metástases abdominais; avaliar a extensão do tumor e o envolvimento vascular (3).

Atualmente estão a ser desenvolvidas outras técnicas imagiológicas para deteção e caracterização do CCR, das quais se destacam as técnicas avançadas de RM de difusão e perfusão (17) e a PET-CT com Iodo 124 associada a Anidrase Carbónica 9 (AC9) (18).

A biópsia assume um papel controverso na abordagem a doentes com CCR. Esta técnica apresenta elevada acuidade na deteção de malignidade (38 a 100%) e baixa morbidade associada(19). A sua utilização tem dado resposta, a título de exemplo, à crescente preocupação em seleccionar abordagens conservadoras no caso de pequenas massas renais e à escolha da terapêutica dirigida no caso de doença metastizada (19). Não obstante, apresenta algumas limitações no diagnóstico histológico de alguns tipos de CCR: no

Quístico Multilocular constituído por quistos e pequenos aglomerados de células tumorais localizados nos septos, torna-se difícil a obtenção de tecido tumoral bem como no Papilar de Células Claras, que contem pequenas áreas sólidas, podendo ser difícil distingui-lo do CCRcc (11).

Tratamento do Carcinoma de Células Renais

Embora recentemente se tenham verificado grandes progressos na compreensão da biologia do CCR, a cirurgia continua a ser a primeira opção quando a intenção é curar o doente (2). Contudo, apesar da nefrectomia radical ter sido historicamente o tratamento padrão na abordagem de tumores renais, a deteção de lesões renais de pequenas dimensões (20) e a evidência crescente de que a Doença Renal Crónica induzida pela cirurgia pode contribuir para o aumento da morbidade dos doentes (21) levou a uma adoção de abordagens mais conservadoras (22). Ao contrário do que acontece com a Nefrectomia Radical, com a Nefrectomia Parcial, apenas o tumor é excisado e é poupado o máximo de parênquima renal normal. Atualmente, a Nefrectomia Parcial Laparoscópica é a primeira opção sempre que uma parte do rim saudável pode ser poupada de forma segura. Esta opção cirúrgica tem sido cada vez mais utilizada desde que se verificou que apresenta um controlo oncológico semelhante ao da Nefrectomia Radical (23), com o benefício adicional da preservação renal (24). Para além disso, parece haver um efeito protetor a longo prazo relativamente à nefrectomia radical no que respeita ao risco de eventos cardiovasculares após a cirurgia (HTA de novo, Doença Coronária, Vasculopatia e Doença Cerebrovascular) (21,25,26), bem como a doenças metabólicas (1). Neste sentido salienta-se os melhores resultados deste procedimento sendo que os doentes com CCR confinado ao rim submetidos a cirurgia apresentam uma sobrevida específica de cancro nos 10 anos a seguir à cirurgia de 85-96% (27) evitando o aparecimento de comorbilidades associadas à nefrectomia radical. Presentemente cerca de metade dos casos são submetidos a Nefrectomia Parcial.

Outros exemplos de abordagens conservadoras no CCR são a vigilância ativa e técnicas minimamente invasivas como a Crioterapia e a Ablação por Radiofrequência. Inicialmente, eram usadas apenas em pacientes com um só rim ou naqueles que não podiam ser submetidos a um procedimento *major* (28–32). Atualmente, o recurso a estas técnicas tem vindo a aumentar, duplicando (4 para 8%) nos EUA entre 1998 e 2008 (33).

Como suporte para o recurso à vigilância ativa são apontados os seguintes factos: 1) 20% das massas renais pequenas são benignas e apresentam uma taxa de crescimento mediana geralmente lenta (2/3 mm/ano)(34); 2) o risco de progressão para metastização é muito reduzido (< 1%), sendo o risco de mortalidade específica de cancro praticamente nulo em pacientes bem selecionados (35–37); 3) a importância de outras causas de mortalidade

num doente com CCR localizado particularmente quando se tratam de doentes idosos (38). Contudo, algumas limitações têm sido identificadas: os *cutoffs* relativos ao tamanho e taxa de crescimento do tumor que devem indicar a necessidade de intervenção, em doentes que se encontrem em vigilância ativa, não se encontram bem definidos; a utilização regular de Ecografia, TC ou RM por um período de meses a anos tem gerado alguma discussão essencialmente no que diz respeito ao risco de exposição a radiação e elevados custos (35,36,39).

Em caso de doença avançada ou metastizada, a abordagem terapêutica passa pela terapia sistémica associada e em casos selecionados em combinação com a nefrectomia citorrredutora, metastesectomia ou radioterapia esteriosstática.

São opções na terapia sistémica a imunoterapia, a quimioterapia e a terapêutica:

- 1) Dirigida às vias do VEGF/VEGFR/PDGFR/MAPK/MEK/ERK/c-Kit (Lenvatinib, Cabozantinib, Axitinib, Pazopanib, Sunitinib, Sorafenib);
- 2) Anticorpos monoclonais (Bevacizumab – VEGFA, Nivolumab – PD-1 e Ipilimumab – CTLA-4)
- 3) Inibidores do mTOR (Temsirrolimus, Everolimus).

Esta terapêutica representa o principal avanço no tratamento do CCR metastizado na última década, com destaque para os agentes dirigidos VEGF/PDGFR/mTOR. Embora estes fármacos venham a apresentar um perfil de toxicidade cada vez melhor face às restantes opções de terapia sistémica, são esperados alguns efeitos adversos, tais como: fadiga, hipertensão, náuseas, diarreia, disfonia e eritrodisestesia palmo-plantar (40), com um terço dos doentes com efeitos adversos grau 3 ou 4 (3).

Denote-se que a terapia sistémica utilizada nos doentes com CCR metastizado permite apenas prolongar a vida do doente, e não atingir a cura, reforçando assim, a necessidade do diagnóstico precoce no sentido de otimizar a sobrevida (2).

Seguimento Pós-Operatório no Carcinoma de Células Renais

O seguimento pós-operatório permite ao urologista avaliar: complicações pós-operatórias, função renal, recorrência local, recorrência no rim contralateral e desenvolvimento de metástases (1).

Se por um lado é sabido que os doentes com seguimento pós-operatório aparentam ter sobrevida global mais longa do que os demais (41), por outro, questões práticas como os intervalos, as modalidades de imagem e a duração não se encontram perfeitamente definidas, dependendo sobretudo do médico responsável e de fatores do doente (11).

As prioridades na investigação no que diz respeito ao seguimento pós-operatório prendem-se com a necessidade de determinar quando é que o *follow up* pode otimizar a sobrevivência do doente e qual o *timing* em que o reestadiamento tem maior probabilidade de detetar uma recorrência (1).

Células Tumorais Circulantes como Biomarcadores

O interesse no recurso aos meios complementares de diagnóstico não invasivos e os avanços tecnológicos na área da biologia molecular levaram à identificação de uma ampla gama de potenciais biomarcadores na circulação sanguínea e na urina (proteínas, microRNA, *circulating cell free DNA*, CTC). O biomarcador ideal é caracterizado por uma elevada sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (42).

Os biomarcadores podem ser classificados de acordo com a sua função como prognósticos ou preditivos. Os prognósticos permitem estimar a probabilidade de recidiva, progressão ou morte pela doença, independente de qualquer intervenção terapêutica e os preditivos o benefício terapêutico ou resistência a certos tratamentos.

Dois exemplos clássicos da aplicação de biomarcadores na prática clínica são: o antígeno específico da próstata (PSA) e antígeno carcinoembrionário (CEA), utilizados no diagnóstico e detecção dos câncros da próstata e colorrectal, respetivamente (42).

Para efeitos desta revisão aprofundaremos as Células Tumorais Circulantes (CTC), um biomarcador multifuncional minimamente invasivo (43).

As CTC são responsáveis pela formação de metástases, estando estas associadas a 90% das mortes relacionadas com o cancro (44). Podem ter origem no tumor primário ou em metástases (45), conduzindo eventualmente a disseminação sistémica em locais distantes através da invasão da corrente sanguínea e vasos linfáticos. São comumente encontradas na circulação sanguínea de doentes com vários tipos de tumores sólidos, não se verificando o mesmo em indivíduos saudáveis (46).

As CTC distinguem-se dos restantes elementos em circulação, pois possuem propriedades físicas únicas: maiores dimensões; e diferenças de densidade, carga, deformabilidade e propriedades migratórias (47). Para além disso, uma vez que as CTC têm origem a partir de câncros epiteliais, muitas delas expressam marcadores de superfície de células epiteliais, incluindo EpCAM e CK (46).

A capacidade de metastização de um tumor torna-se evidente quando uma célula ou um agregado de células (*clusters*) adquirem a capacidade de separar-se e afastar-se da massa tumoral primária, migrar através do tecido adjacente e, por fim, entrar na corrente sanguínea ou linfática. O processo através do qual as CTC atingem a corrente sanguínea a partir do tumor primário ainda não está perfeitamente esclarecido. No entanto, a evidência existente aponta para que esse ocorra de uma de duas formas, ativa ou passiva. (48).

As células que migram de uma forma ativa sofrem alterações, adquirindo propriedades que lhes permitem mover-se através da matriz extracelular e penetrar a membrana basal e a parede endotelial dos vasos (49).

Por sua vez, para explicar a migração passiva das CTC existem vários mecanismos: 1) forças mecânicas como as desencadeadas pelo crescimento tumoral, forçando as células a deslocarem-se (50,51); 2) vasos tumorais fenestrados, consequência da intensa angiogénese tumoral por aumento da produção de VEGF (52); 3) trajetos (*micro-tracks*) formados por outras CTC através de proteólise ou 4) através de estruturas teciduais pré-existentes (53). A importância do tipo de migração prende-se com a transformação do fenótipo da célula tumoral, pois se por um lado temos “CTC acidentais” que mantêm o seu fenótipo original, por outro, temos células que sofrem uma transformação fenotípica conhecida como transição epitélio-mesênquima (TEM)(54).

A TEM é um processo pelo qual as células epiteliais passam a ter características mesenquimais, perdendo os marcadores de superfície epiteliais, o que pode acontecer em diversas situações: embriogénese, cicatrização e regeneração de tecidos (55), mantendo as células carcinomatosas esta capacidade (56).

A sinalização parácrina por TGF- β , WNT, PDGEF ou IL-6 e a exposição a nicotina, álcool e radiação ultravioleta são fatores desencadeantes da TEM (56–58), que ativam determinados fatores de transcrição (*Snail*, *Twist* e *Zeb*) responsáveis por manter o fenótipo mesenquimal através de sinalização autócrina (56).

Durante a TEM as células tumorais perdem as junções célula-célula e sofrem alterações do citoesqueleto, o que resulta na perda de marcadores característicos de células epiteliais (p.e. EpCAM e E-caderina), alterações da queratina e, por fim, na expressão de marcadores mesenquimais (p.e. vimentina) (59).

Estas subpopulações de CTC que possuem características de células mesenquimatosas são difíceis de detetar em circulação pois a acrescer ao facto dos métodos convencionais de deteção de CTC se basearem na utilização de marcadores epiteliais, as células hematopoiéticas também têm origem mesenquimal (48).

O número de CTC em circulação é muito reduzido, estimando-se que haja 1 célula tumoral por cada bilião de células sanguíneas normais em doentes com cancro metastizado (46). Na corrente sanguínea, as CTC enfrentam uma série de obstáculos que dificultam a sua sobrevivência: forças de cisalhamento (*shearing forces*), colisão com células sanguíneas, anóquias e a atividade do sistema imunitário. As CTC capazes de resistir a todas as ameaças existentes em circulação, passam à fase seguinte que consiste na

adesão ao endotélio dos capilares e migração transendotelial (60) para formar micrometástases ou reservatórios de CTC, denominando-se neste caso células tumorais disseminadas (CTD) (Figura 1).

Estudos anteriores revelaram que a medula óssea é frequentemente o local de eleição para a formação de depósitos de CTC, mesmo quando o tumor primário não apresenta metastização preferencial para o osso (p.e. cancro do pulmão ou colorrectal) (61–63). Na medula óssea, as CTD permanecem num aparente estado de latência até que um estímulo adequado promova a proliferação celular (64,65).

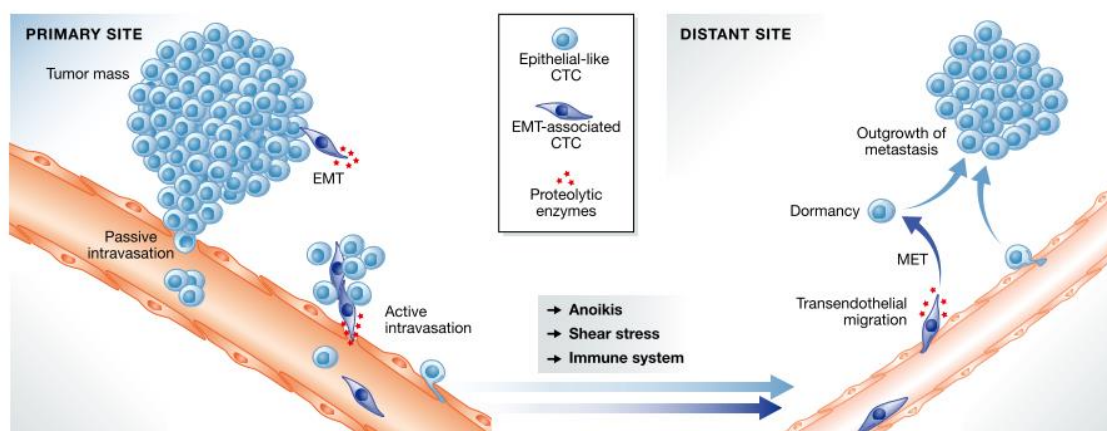


Fig. 1 Cascata de Metastização (66)

Na prática clínica, as CTC poderão ser ferramentas valiosas no que concerne ao diagnóstico precoce, estadiamento, monitorização de recorrência, prognóstico e seleção das terapêuticas apropriadas (46), bem como aprofundar o conhecimento acerca do processo de metastização tumoral (67). A Food and Drug Administration (FDA) já aprovou a contagem de CTC, através do método CellSearch™, como um marcador de prognóstico nos câncros da mama, colorrectal e da próstata metastizados (43).

A análise de CTC é um processo que compreende três etapas:

- 1) Enriquecimento;
- 2) Detecção;
- 3) Caracterização.

O enriquecimento tem como objetivo ultrapassar a escassez de CTC no sangue periférico e aumentar a sensibilidade do ensaio. As amostras de sangue são processadas recorrendo

a técnicas que exploram as características morfológicas das CTC (tamanho e densidade) ou a técnicas de separação imunomagnética. Ambos os métodos apresentam o inconveniente de provocarem algum dano/morte celular. A separação de CTC com base na centrifugação por gradiente de densidade consiste na utilização de um meio estéril de centrifugação por gradiente de densidade (*Ficoll*, *Lymphoprep*). Quando o sangue é colocado sobre o *Ficoll* e centrifugado, as partículas de maior densidade – eritrócitos e neutrófilos – precipitam, enquanto que as menos densas – células tumorais, células mononucleares, plasma – permanecem no *Ficoll*. Caso se opte pela utilização de *OncoQuick*, os tubos utilizados contêm uma barreira porosa sob a qual se encontra o gradiente, impedindo a mistura entre o mesmo e o sangue. Deste modo, o *OncoQuick* é uma excelente alternativa ao *Ficoll*, facilitando a separação e posterior avaliação da fração de células enriquecida (68).

O enriquecimento com base no tamanho celular assenta no princípio de que a maioria dos leucócitos em circulação apresenta um tamanho que varia entre 8 e 11 μm , razão pela qual podem ser facilmente removidos da amostra por filtração através de uma membrana de policarbonato com poros de cerca de 8 μm . Se por um lado, este método permite efetuar a contagem de CTC por mililitro de sangue e manter a integridade celular, por outro lado não é certo que as CTC tenham sempre mais de 8 μm , tornando a sensibilidade do ensaio questionável (69).

A seleção imunomagnética é o método mais utilizado na fase de enriquecimento e envolve bandas imunomagnéticas e um sistema ferrofluídico. As CTC são selecionadas positivamente por anticorpos acoplados a bandas magnéticas que têm como alvo antígenos epiteliais específicos – CK e EpCAM – ou antígenos de superfície específicos de células tumorais – PSA, Her2 e CEA. Esta técnica possui a vantagem de permitir a visualização das células por microscopia de fluorescência. As principais desvantagens são tratar-se de um método dispendioso e de não existirem procedimentos ou reagentes padrão, tornando a sua execução muito variável (70,71). Atualmente existem vários protocolos disponíveis, dos quais são exemplos o RareTM e o MACS[®] (72).

A deteção de CTC é realizada com base na utilização PCR ou técnicas de Imunohistoquímica. A última consiste na utilização de anticorpos monoclonais dirigidos a antígenos presentes nas CTC (p.e. EpCAM das células epiteliais) – seleção positiva – ou a antígenos conhecidos nas células sem interesse (p.e. CD45 dos leucócitos) – seleção negativa - com coloração por imunofluorescência.

Atualmente, dispomos de vários métodos combinados de enriquecimento e detecção de CTC, dos quais são exemplos: **CellSearch**, **Microfluidic devices**, **'CTC chip'**, **Epispat**, **Adnatest** e **Telomescan**.

O *CellSearch*TM é um sistema automático de enriquecimento e coloração de CTC. Até ao momento é o único teste diagnóstico aprovado pela FDA (73). O enriquecimento de CTC passa pela utilização de um ferrofluido acoplado a anticorpos de EpCAM. As CTC ligadas às partículas de ferro são removidas da amostra sanguínea por ímans. Posteriormente, as CTC são identificadas através de anticorpos fluorescentes que se ligam às CK e as células hematopoiéticas sem interesse são detetadas utilizando anticorpos anti-CD45. De seguida, a amostra é analisada por um microscópio de fluorescência capaz de classificar células epiteliais positivas para CK e negativas para CD45 - o *The Cell-Spotter Analyzer*. As células isoladas através deste sistema automático são posteriormente analisadas relativamente a expressão de mRNA e mutações de DNA, confirmando a sua origem tumoral. O sistema apresenta uma boa sensibilidade, detetando cerca de 5 CTC por 7.5ml. Os dispositivos de microfluídica (*Microfluidic devices*) têm por base uma técnica que utiliza a microscopia confocal de fluorescência. O dispositivo é composto por microcanais revestidos por partículas com propriedades magnéticas que por sua vez estão cobertas por anticorpos específicos para determinados antígenos de superfície expressos pelas CTC. A vantagem desta técnica é que é completamente automática com uma especificidade de cerca de 97% e um rendimento de captura de 90%. A integridade celular é mantida possibilitando subsequente quantificação e estudos biológicos (73,74).

O *CTC chip* é também num dispositivo microfluídico que se destaca pela sua eficiência e reprodutibilidade. O chip é constituído por 78 000 microspots contendo anticorpos EpCAM. Como o EpCAM é sobreexpresso nos carcinomas do pulmão, colorrectal, da próstata e mama e ausente nas células sanguíneas, torna o chip mais sensível. A amostra sanguínea é colocada no chip percorrendo-o sob condições de fluxo específicas, permitindo às células EpCAM+ ligarem-se aos *microspots* e serem detetadas depois por uma câmara. Utilizando este método, Nagrath et al., isolou CTC em 115/116 (99%) dos doentes. O número de CTC isoladas variou entre 5 a 1281 por mL no carcinoma pulmonar de não pequenas células, 42 a 275 no carcinoma colorrectal, 16 a 292 no carcinoma da próstata metastizado, 5 a 174 no carcinoma da mama e 9 a 831 no carcinoma do pâncreas. Não foram detetadas CTC no grupo de controlo. Assim, a sensibilidade do chip foi de 99,1% e a especificidade de 100% (75).

O *Epispot* é um método em que as células CD45+ sofrem seleção negativa e as células CXCR4+ (marcador de células epiteliais envolvido no *homing para a medula óssea*) são alvo de enriquecimento (76). CXCR 4 é um tipo de recetor de quimiocinas específico para a quimiocina CXCL12 e encontra-se expresso em mais de 23 tipos de cancro, dos quais são exemplos o cancro da mama e do ovário, melanoma e cancro da próstata. A expressão deste recetor pelas células tumorais foi relacionada com a metastização para tecidos que contêm uma elevada concentração do seu ligando, isto é, pulmão, fígado e medula óssea (77).

O *Epispot* apenas deteta células viáveis, sendo capaz de distinguir CTC viáveis de apoptóticas. Apresenta elevada sensibilidade e já foi testado em vários tipos de cancro, o que sugere a sua potencial relevância clínica (76).

O *Adnatest* é um método que usa dois tipos de anticorpos para específicos de células epiteliais – MUC1 e EpCAM . A MUC-1 é uma proteína que está presente na membrana apical das células epiteliais de vários tecidos. A sua sobreexpressão, localização intracelular aberrante ou alteração da glicosilação estão associadas a carcinomas do cólon, mama, ovário, pulmão e pâncreas (78).

Como nem todas as CTC expressam ambos os anticorpos, este método aumenta o rendimento e a especificidade do isolamento de CTC. É um método muito específico (>90%) e de elevada sensibilidade (2 CTC por 5mL de sangue) (69).

O *Telomescan*® é um método que utiliza um vetor viral para detetar CTC. O vírus só consegue replicar-se em células tumorais introduzindo um marcador GFP no seu genoma, tornando-as visíveis. Este método já foi utilizado para deteção de CTC em amostras de sangue periférico de doentes com carcinoma da mama, revelando elevada especificidade e sensibilidade (79).

A especificidade da técnica de PCR baseia-se na criação de *primers* oligonucleotídicos que são específicos para o gene de interesse. O DNA, mais estável que o RNA e independente da maquinaria de transcrição, pode ser utilizado como alvo em vez do RNAm. Contudo, é possível encontrar DNA livre em circulação (p.e. proveniente de células tumorais que sofreram apoptose), originando falsos positivos. Assim, o RNAm é o principal alvo das técnicas de PCR e RT-PCR (*reverse transcriptase*-PCR) é o método mais utilizado para deteção de CTC. Com a RT-PCR, após a síntese de cDNA, o gene de interesse é amplificado, utilizando *primers* oligonucleotídicos específicos para o gene em questão. É frequentemente considerado o ensaio mais sensível para deteção de marcadores moleculares tumorais (1 célula maligna num universo de 1-10 milhões de

células normais). Também apresenta elevada especificidade dado a criação de *primers* específicos para genes de interesse. Para além disso, é um método eficiente, pois analisa todo o RNA numa só reação.

Esta técnica apresenta algumas limitações: 1) necessidade de lise celular, o que impossibilita posterior contagem e análise das CTC; 2) inexistência de marcadores tumorais específicos na maioria dos tumores sólidos; 3) variabilidade da sensibilidade do PCR uma vez que dada a sua heterogeneidade, as CTC podem não expressar de igual forma o marcador de interesse; 4) possível existência de inibidores de PCR em circulação, reduzindo a sensibilidade da reação e 5) o gene alvo pode estar *downregulated* como consequência da terapêutica. Outra limitação é que não é um processo completamente automatizado e assim pode não ser suficientemente reproduzível em amostras clínicas (69).

Para melhorar a especificidade da reação de PCR foi desenvolvida a técnica de *quantitative real-time PCR* – qPCR. Esta distingue transcritos de células tumorais de transcritos de células normais, mas não permite quantificar as células tumorais da amostra em estudo, devido a variabilidade na taxa de transcrição entre células tumorais (80).

A terceira e última etapa de caracterização molecular - utilizando RT-PCR, FISH ou sequenciação de DNA (Figura 2) (46).

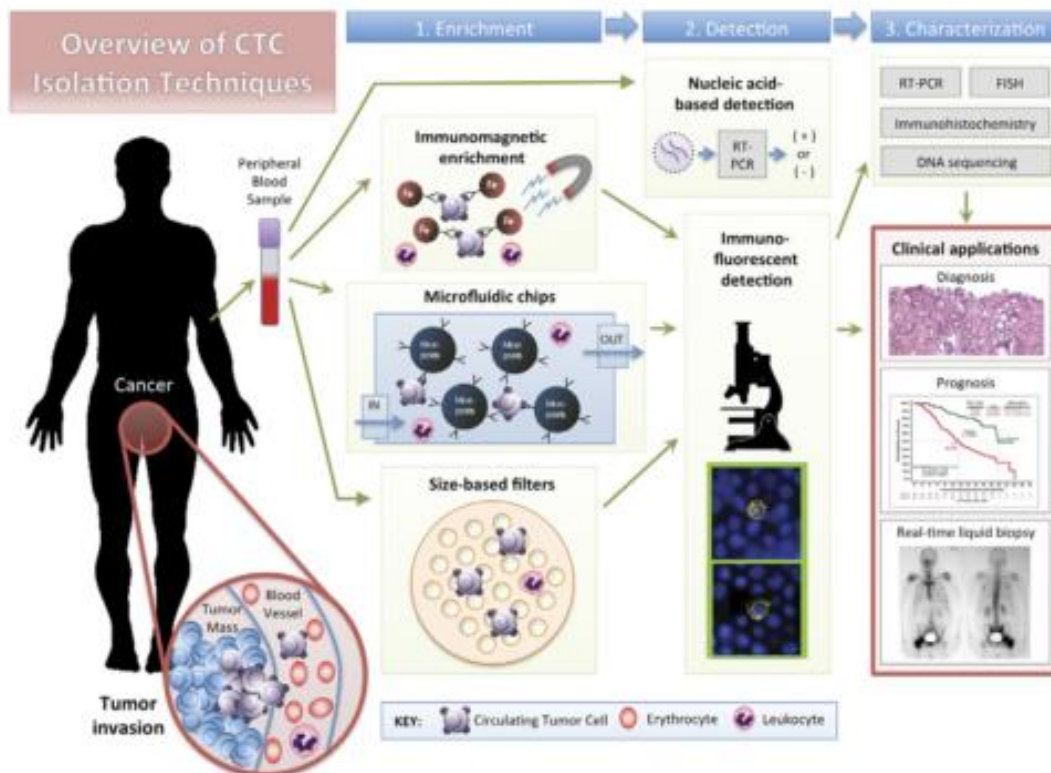


Fig. 2 Técnicas de Isolamento de CTC (46)

Células Tumorais Circulantes no Carcinoma de Células Renais

A história natural heterogênea e a propensão para a recorrência nos câncros da próstata, bexiga e rim fazem com que sejam bons candidatos à utilização das CTC (46).

A detecção de CTC no cancro geniturinário, em particular cancro da próstata e cancro da bexiga, tem sido amplamente investigada (81,82), tendo, no primeiro, sido útil no prognóstico de doentes com resistência à castração (46).

Na especificidade do CCR, a investigação demonstrou ainda pouco progresso (45) e o número de estudos é muito limitado.

Estudos publicados em 1990 por Pontes et al (45) e Hioki and Sugimura (46) usaram RT-PCR para detetar DNA tumoral circulante em doentes com CCR. Ashida et al. identificou mutações no gene VHL em células circulantes usando RT-PCR (46,83). McKiernan et al. usaram o mesmo método para detetar a expressão de AC9 no sangue periférico, um gene expresso em 91,2% dos carcinomas de CCRcc, que representam 75% dos CCR. Foram testados 37 doentes com CCR (28 com doença localizada e 9 com CCR metastizado) e verificou-se a existência de células com expressão de AC 9 em 18 deles (49%). O mesmo ensaio revelou ainda elevada especificidade, pois apenas foi detetada expressão de AC9 em 1,8% dos indivíduos saudáveis que integraram o estudo como controlo (84). Os estudos referidos anteriormente foram limitados pela reduzida taxa de detecção de mRNA celular de CCR no sangue periférico.

Métodos de detecção imunomagnética foram também utilizados para isolar CTC a partir do sangue de doentes com CCR. Em estudos de pequena dimensão, foram detetadas CTC em aproximadamente 30% a 92% dos doentes (85–87). No maior estudo realizado de CTC no CCR, Bluemke et al utilizaram o sistema de separação de células imunomagnético MACS® e a coloração imunohistoquímica de citoqueratina 8/18 para detetar CTC em 81 dos 154 doentes (52,6%). A detecção de CTC foi um fator de prognóstico independente ($p=0.014$) e foi correlacionada com: a sobrevida global (RR: 2.3; $p=0.048$), a invasão dos nódulos linfáticos ($p<0.001$) e metástases à distância ($p=0.014$) (88).

Atualmente, a EpCAM é a molécula mais utilizada como antígeno de captura para a pesquisa CTC, sendo amplamente utilizada em outras plataformas para além da CellSearch®, nomeadamente: *microchip*, *microvortex-generating herringbone-chip*, *citometria de fluxo (flow cytometry)*, *varredor magnético (magnetic sweeper)* e *dispositivos microfluídicos (microfluidic devices)* (45).

EpCAM é um marcador específico de células epiteliais que é altamente expresso no cancro de mama, próstata e cólon, mas não no CCR (Figura 1) (89–91) em que é expresso em apenas 30-40% dos casos. Assim, não representa um antígeno de captura ideal para a deteção de CTC em doentes com CCR (92).

A justificação para a baixa expressão de marcadores epiteliais nas CTC de CCR reside no facto de estas sofrerem TEM. Durante este processo há uma alteração das características celulares e perda de propriedades epiteliais, pelo que as células tumorais passam a apresentar um fenótipo mesenquimal (93). Urge assim, identificar marcadores de superfície apropriados que possam ser usados como antígenos de captura no CCR (46).

O estudo levado a cabo por Liu et al destaca-se pela utilização de um *microfluidic device* (*NanoVelco chip*), tendo como alvos moleculares a AC9 e CD147. A AC9 é um marcador de hipoxia tumoral amplamente expresso em vários tipos de cancro humano (94–96) e está associada a maior agressividade e a pior prognóstico (97). O CD147 é um membro altamente glicosilado da superfamília das imunoglobulinas, é expresso na superfície de muitos tumores malignos, tais como o cancro de ovário e o cancro da bexiga (98–100), é expresso igualmente em até 88,7% dos pacientes com CCR avançado (101). O CD147 também tem sido relacionado com o processo de metastização por facilitar a TEM através da ativação da via MAPK/ERK (102). A primeira etapa do estudo consistiu na validação da expressão destes dois marcadores no CCRcc, verificando-se que, quando combinados, 97.1% dos tumores eram positivos para estes marcadores e que apenas 18.6% dos tumores eram positivos para EpCAM. Numa segunda fase, a combinação de AC9 e CD147 para seleção positiva, permitiu a deteção de CTC em 72 de 76 (94,7%) doentes com CCRcc. O número de CTC isoladas foi distinto consoante o estágio clínico apresentado pelo CCRcc, com o número maior de células isoladas em estádios mais avançados. Para além disso, foi ainda avaliada a expressão de Vimentina (marcador mesenquimal), havendo uma relação do número de células positivas para este marcador com o estágio clínico do CCR, um achado sugestivo de que a diferenciação mesenquimal das CTC poderá representar um potencial fator de prognóstico em doentes com CCR (45).

Em 2017, um estudo realizado por Maertens et al efetuou uma análise comparativa entre 4 métodos diferentes de enriquecimento e deteção de CTC:

- 1) Seleção Imunomagnética com anticorpos anti-EpCAM
- 2) *Ficoll* e seleção negativa com anticorpos anti-CD45
- 3) *RosetteSep*TM

4) Parsortix – sistema que explora a deformabilidade e tamanho das CTC.

Os autores utilizaram quatro tipos de células de CCRcc fenotipicamente distintas – CAL-54; A-498; CAKI-1 e CAKI-2 – e ainda, 61 amostras clínicas de CCRcc (15 de CCR Grau 1; 29 de CCRcc Grau 2 e 17 de CCR Grau 3). Assim, verificou-se uma reduzida contaminação das amostras sanguíneas por leucócitos com a utilização do Parsortix e qualquer um dos restantes métodos apresentou uma contaminação considerável. A taxa média de recuperação de CTC foi de 66% com o Parsortix, 55% com o *Ficoll/Seleção* Negativa com anti-CD45; 30 % com o *RosetteSep*TM e 23% com a Seleção imunomagnética com anti-EpCAM.

Quando comparadas as taxas de recuperação para cada um dos tipos de CTC, o Parsortix revelou-se consideravelmente mais eficaz que a Seleção Imunomagnética com anti-EpCAM na deteção de A-498 [46% vs. 1% ($p < 0.001$)], CAKI-1 [82% vs. 21% ($p < 0.0001$)] e CAKI-2 [87% vs. 7% ($p < 0.0001$)]. Tendo por base que a única plataforma aprovada pela FDA utiliza os marcadores EpCAM e CK, os autores decidiram averiguar a sua expressão no CCRcc. Para tal, utilizaram técnicas de Imunofluorescência e observaram que quer as CTC quer as células constituintes das amostras clínicas eram positivas para o panCK, mas que apenas o subtipo CAL-54 apresentava uma fraca expressão de EpCAM e que apenas 18/61 amostras de CCRcc eram positivas para o marcador, sem qualquer tipo de correlação com o grau do tumor – Grau 1 – 24%; Grau 2 – 34% e Grau 3 – 23%). Por fim, utilizando o sistema Parsortix e TaqMan qPCR verificaram a expressão elevada de CK KRT8 pelas CTC face aos tubos de controlo. A maior limitação do estudo foi a indisponibilidade de amostras sanguíneas de doentes com CCRcc (103).

Conclusão

A incidência do CCR tem vindo a aumentar (1) e este representa a condição urológica maligna com maior mortalidade associada (2).

Apesar de ser uma condição multifatorial, importa referir que fatores de risco principais para CCR são: a HTA, o tabagismo e a obesidade (3) sendo estes importantes na sociedade em geral, mas principalmente nos países desenvolvidos. Isto leva-nos a crer que no que depende dos fatores externos a incidência do CCR manterá a tendência para aumentar.

Apesar da crescente disponibilidade de exames complementares de diagnóstico e da evolução das técnicas de intervenção no âmbito do CCR, é uma realidade que existem muitas limitações na deteção, terapêutica e seguimento dos doentes.

É neste contexto que assumem especial importância os avanços recentes na área da biologia molecular e particularmente na investigação das CTC e das suas propriedades como biomarcador tumoral.

As CTC têm sido alvo de múltiplos estudos em vários tipos de cancro. A FDA já aprovou a contagem de CTC pelo sistema CellSearch como um marcador de prognóstico nos cancros da mama, colorrectal e da próstata metastizado (43).

Não obstante, no CCR o panorama é um pouco diferente, o que se deve em parte à sua heterogeneidade e ao processo de TEM pelo qual as células passam durante o processo de metastização. Assim, as CTC de CCR deixam de expressar os marcadores de superfície epiteliais utilizados pela maioria dos métodos de deteção de CTC em vigor e passam a expressar marcadores de células mesenquimatosas (93).

O conhecimento crescente acerca da caracterização morfológica e molecular das CTC de CCR, possibilitou a realização de estudos com novos métodos mais adequados e consequente aumento da capacidade de deteção de CTC, dos quais se destaca o Parsortix utilizado por Maertens et al (103) e a combinação de AC9 e CD147 num dispositivo de microfluídica por Liu et al (45).

Estudos realizados por diferentes autores relativamente ao CCR revelaram que a deteção de CTC é um fator de prognóstico independente e correlaciona-se com sobrevida global, a invasão dos nódulos linfáticos e metástases à distância (44). Para além disso, o número de CTC isoladas foi distinto consoante o estágio clínico apresentado pelo CCR, com um número maior de células isoladas em estádios mais avançados. Por último, verificou-se uma relação entre a expressão do marcador mesenquimal vimentina com o estágio clínico

do CCR, o que é sugestivo de que a diferenciação mesenquimal das CTC poderá representar um potencial fator de prognóstico (45).

Posto isto, é necessário investir na realização de estudos para melhor caracterização das CTC no CCR por forma a otimizar os métodos de isolamento existentes e permitir que as CTC sejam utilizadas na prática clínica com o intuito de abordagem mais individualizada em todas as vertentes do CCR.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Tito Palmela Leitão, pelo apoio prestado no decorrer deste trabalho, incentivando-me sempre a superar os meus limites.

Bibliografia

1. Ljungberg, B.; Albiges, L.; Bensalah, K.; Bex, A.; Gilles RH. Guidelines on Renal Cell Carcinoma EAU. Eur Assoc Urol Updat March 2017. 2017;
2. Rossi SH, Klatter T, Usher-Smith J, Stewart GD. Epidemiology and screening for renal cancer. World J Urol [Internet]. 2018;(November 2017).
3. Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. Lancet [Internet]. 2016;387(10021):894–906.
4. Levi F, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, et al. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. BJU Int. 2008;101(8):949–58.
5. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin [Internet]. 2014;64(1):9–29.
6. Naito S, Yamamoto N, Takayama T, Muramoto M, Shinohara N, Nishiyama K, et al. Prognosis of Japanese Metastatic Renal Cell Carcinoma Patients in the Cytokine Era: A Cooperative Group Report of 1463 Patients. Eur Urol. 2010;57(2):317–26.
7. Wong MCS, Goggins WB, Yip BHK, Fung FDH, Leung C, Fang Y, et al. Incidence and mortality of kidney cancer: temporal patterns and global trends in 39 countries. Sci Rep [Internet]. 2017;7(1):15698.
8. Rohrmann S, Linseisen J, Overvad K, Würtz AML, Roswall N, Tjønneland A, et al. Meat and fish consumption and the risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. Int J Cancer. 2015;136(5):E423–31.
9. Wong G, Howard K, Webster AC, Chapman JR, Craig JC. Screening for renal cancer in recipients of kidney transplants. Nephrol Dial Transplant. 2011;26(5):1729–39.
10. Kälble T, Lucan M, Nicita G, Sells R, Revilla FJB, Wiesel M. Eau guidelines on renal transplantation. Eur Urol. 2005;47(2):156–66.
11. Williamson SR, Cheng L. Clear cell renal cell tumors: Not all that is “clear” is cancer. Urol Oncol Semin Orig Investig [Internet]. 2016;34(7):292.e17-292.e22.
12. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, et al. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: Distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. Eur Urol [Internet]. 2015;67(1):85–97.
13. Srinivasan R, Ricketts CJ, Sourbier C, Linehan WM. New Strategies in Renal Cell

- Carcinoma: Targeting the Genetic and Metabolic Basis of Disease. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2015;21(1):10–7.
14. Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guillé F, Lobel B. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2003;44(2):226–32.
 15. Patard J-J, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guillé F, Lobel B. Prognostic significance of the mode of detection in. *BJU Int* [Internet]. 2002;90(4):358–63.
 16. Jamis-dow CA, Jennings B. Radiology CT versus Masses : and Detection. :785–8.
 17. Jones LP. Recent Advances in Imaging Cancer of the Kidney and Urinary Tract. *Surg Oncol Clin N Am* [Internet]. 2014;23(4):863–910.
 18. Divgi CR, Uzzo RG, Gatsonis C, Bartz R, Treutner S, Yu JQ, et al. Positron emission tomography/computed tomography identification of clear cell renal cell carcinoma: Results from the REDECT trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(2):187–94.
 19. Ball MW, Bezerra SM, Gorin MA, Cowan M, Pavlovich CP, Pierorazio PM, et al. Grade Heterogeneity in Small Renal Masses: Potential Implications for Renal Mass Biopsy. *J Urol* [Internet]. 2015;193(1):36–40.
 20. Baillargeon-Gagné S, Jeldres C, Lughezzani G, Sun M, Isbarn H, Capitanio U, et al. A comparative population-based analysis of the rate of partial vs radical nephrectomy for clinically localized renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2010;105(3):359–64.
 21. Capitanio U, Terrone C, Antonelli A, Minervini A, Volpe A, Furlan M, et al. Nephron-sparing techniques independently decrease the risk of cardiovascular events relative to radical nephrectomy in patients with a T1a-T1b renal mass and normal preoperative renal function. *Eur Urol* [Internet]. 2015;67(4):683–9.
 22. Sun M, Abdollah F, Bianchi M, Trinh Q-D, Jeldres C, Thuret R, et al. Treatment Management of Small Renal Masses in the 21st Century: A Paradigm Shift. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2012;19(7):2380–7.
 23. Crépel M, Jeldres C, Perrotte P, Capitanio U, Isbarn H, Shariat SF, et al. Nephron-sparing Surgery Is Equally Effective to Radical Nephrectomy for T1BN0M0 Renal Cell Carcinoma: A Population-based Assessment. *Urology* [Internet]. 2010;75(2):271–5.
 24. Scosyrev E, Messing EM, Sylvester R, Campbell S, Van Poppel H. Renal function after nephron-sparing surgery versus radical nephrectomy: Results from EORTC randomized trial 30904. *Eur Urol* [Internet]. 2014;65(2):372–7.

25. Lane BR, Campbell SC, Demirjian S, Fergany AF. Surgically induced chronic kidney disease may be associated with a lower risk of progression and mortality than medical chronic kidney disease. *J Urol* [Internet]. 2013;189(5):1649–55.
26. Huang WC, Elkin EB, Levey AS, Jang TL, Russo P. Partial Nephrectomy Versus Radical Nephrectomy in Patients With Small Renal Tumors-Is There a Difference in Mortality and Cardiovascular Outcomes? *J Urol*. 2009;181(1):55–62.
27. Karakiewicz PI, Briganti A, Chun FKH, Trinh QD, Perrotte P, Ficarra V, et al. Multi-institutional validation of a new renal cancer-specific survival nomogram. *J Clin Oncol*. 2007;25(11):1316–22.
28. Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol* [Internet]. 2015;67(5):913–24.
29. Hoffmann NE, Bischof JC. The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology*. 2002;60(2 SUPPL. 1):40–9.
30. Katsanos K, Mailli L, Krokidis M, McGrath A, Sabharwal T, Adam A. Systematic review and meta-analysis of thermal ablation versus surgical nephrectomy for small renal tumours. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2014;37(2):427–37.
31. Raman JD, Cadeddu JA. Re: Excise, Ablate or Observe: The Small Renal Mass Dilemma-A Meta-Analysis and Review. D. A. Kunkle, B. L. Egleston and R. G. Uzzo *J Urol* 2008; 179: 1227-1234. *J Urol*. 2008;180(4):1567–8.
32. Motzer RJ, Jonasch E, Agarwal N, Beard C, Bhayani S, Bolger GB, et al. Kidney Cancer, Version 2. 2014 Featured Updates to the NCCN Guidelines. *JNCCN - J Natl Compr Cancer Network*. 2014;12(2):175–81.
33. Woldrich JM, Palazzi K, Stroup SP, Sur RL, Parsons JK, Chang D, et al. Trends in the surgical management of localized renal masses: Thermal ablation, partial and radical nephrectomy in the USA, 1998-2008. *BJU Int*. 2013;111(8):1261–8.
34. Mehrazin R, Smaldone MC, Egleston B, Tomaszewski JJ, Concodora CW, Ito TK, et al. Is anatomic complexity associated with renal tumor growth kinetics under active surveillance? *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2015;33(4):167.e7-167.e12.
35. Rendon RA. Active surveillance as the preferred management option for small renal masses. 2010;4(2):136–8.
36. Pierorazio PM, Johnson MH, Ball MW, Gorin MA, Trock BJ, Chang P, et al. Five-year Analysis of a Multi-institutional Prospective Clinical Trial of Delayed

- Intervention and Surveillance for Small Renal Masses: The DISSRM Registry. *Eur Urol* [Internet]. 2015;68(3):408–15.
37. Crispen PL, Viterbo R, Fox EB, Greenberg RE, Chen DYT, Uzzo RG. Delayed intervention of sporadic renal masses undergoing active surveillance. *Cancer*. 2008;112(5):1051–7.
 38. Kutikov A, Egleston BL, Wong Y-N, Uzzo RG. Evaluating Overall Survival and Competing Risks of Death in Patients With Localized Renal Cell Carcinoma Using a Comprehensive Nomogram. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010;28(2):311–7.
 39. Jewett MAS, Mattar K, Basiuk J, Morash CG, Pautler SE, Siemens DR, et al. Active surveillance of small renal masses: Progression patterns of early stage kidney cancer. *Eur Urol*. 2011;60(1):39–44.
 40. Ruiz JN, Belum VR, Creel P, Cohn A, Ewer M, Lacouture ME. Current practices in the management of adverse events associated with targeted therapies for advanced renal cell carcinoma: A national survey of oncologists. *Clin Genitourin Cancer* [Internet]. 2014;12(5):341–7.
 41. Beisland C, Guðbrandsdóttir G, Reisæter LAR, Bostad L, Hjelle KM. A prospective risk-stratified follow-up programme for radically treated renal cell carcinoma patients: evaluation after eight years of clinical use. *World J Urol*. 2016;34(8):1087–99.
 42. Majer W, Kluzek K, Bluysen H, Wesoly J. Potential approaches and recent advances in biomarker discovery in clear-cell Renal Cell Carcinoma. *J Cancer*. 2015;6(11):1105–13.
 43. Yap TA, Lorente D, Omlin A, Olmos D, De Bono JS. Circulating tumor cells: A multifunctional biomarker. *Clin Cancer Res*. 2014;20(10):2553–8.
 44. Bluemke K, Bilkenroth U, Meye A, Fuessel S, Lautenschlaeger C, Goebel S, et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Renal Cell Carcinoma Correlates with Prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2009;18(8):2190–4.
 45. Liu S, Tian Z, Zhang L, Hou S, Hu S, Wu J, et al. Combined cell surface carbonic anhydrase 9 and CD147 antigens enable high-efficiency capture of circulating tumor cells in clear cell renal cell carcinoma patients. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(37).
 46. Small AC, Gong Y, Oh WK, Hall SJ, Van Rijn CJM, Galsky MD. The emerging role of circulating tumor cell detection in genitourinary cancer. *J Urol*.

- 2012;188(1):21–6.
47. Marrinucci D, Bethel K, Bruce RH, Curry DN, Hsieh B, Humphrey M, et al. Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells. *Hum Pathol.* 2007;38(3):514–9.
 48. Joosse SA, Pantel K. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res.* 2013;73(1):8–11.
 49. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell [Internet].* 2011;147(5):992–1009.
 50. Camara O, Kavallaris A, Nöschel H, Rengsberger M, Jörke C, Pachmann K. Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: The fate of malignant and benign mobilized cells. *World J Surg Oncol.* 2006;4:1–7.
 51. Förnvik D, Andersson I, Dustler M, Ehrnström R, Rydén L, Tingberg A, et al. No evidence for shedding of circulating tumor cells to the peripheral venous blood as a result of mammographic breast compression. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;141(2):187–95.
 52. McDonald DM, Baluk P. Significance of Blood Vessel Leakiness in Cancer Significance of Blood Vessel Leakiness in Cancer 1. 2002;(415):5381–5.
 53. Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: A five-step process. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1–2):129–35.
 54. Brabletz T. To differentiate or not-routes towards metastasis. *Nat Rev Cancer [Internet].* 2012;12(6):425–36.
 55. Nieto MA. Epithelial plasticity: A common theme in embryonic and cancer cells. *Science (80-).* 2013;342(6159).
 56. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med.* 2013;19(11):1438–49.
 57. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.* 2009;139(5):871–90.
 58. Kishi S, Bayliss PE, Hanai JI. A prospective epigenetic paradigm between cellular senescence and epithelial-mesenchymal transition in organismal development and aging. *Transl Res [Internet].* 2015;165(1):241–9.
 59. Joosse SA, Hannemann J, Spoßter J, Bauche A, Andreas A, Müller V, et al. Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: Impact on the detection of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res.* 2012;18(4):993–1003.

60. Reymond N, D'Água BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2013;13(12):858–70.
61. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2004;4(6):448–56.
62. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2005;353(8):793–802.
63. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer*. 2008;123(9):1991–2006.
64. Bragado P, Estrada Y, Parikh F, Krause S, Capobianco C, Farina HG, et al. TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α / β signalling. *Nat Cell Biol*. 2013;15(11):1351–61.
65. Touny LH El, Vieira A, Mendoza A, Khanna C, Hoenerhoff MJ, Green JE. Combined SFK/MEK inhibition prevents metastatic outgrowth of dormant tumor cells. *J Clin Invest*. 2014;124(1):156–68.
66. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2015;7(1):1–11.
67. El-Heliebi A, Kroneis T, Zöhrer E, Haybaeck J, Fischereider K, Kampel-Kettner K, et al. Are morphological criteria sufficient for the identification of circulating tumor cells in renal cancer? *J Transl Med*. 2013;11(1):1–17.
68. Zieglschmid V, Hollmann C, Gutierrez B, Albert W, Strothoff D, Gross E, et al. Combination of immunomagnetic enrichment with multiplex RT-PCR analysis for the detection of disseminated tumor cells. *Anticancer Res*. 2005;25(3 A):1803–10.
69. Gerges N, Rak J, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells. Vol. 94, *British Medical Bulletin*. 2010. p. 49–64.
70. Jacob K, Sollier C, Jabado N. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 2007;4(6):741–56. pt=Citation&list_uids=18067413
71. Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW. Circulating tumor cells (CTCs): Detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2009;35(5):463–74.
72. Naume B, Borgen E, Tøssvik S, Pavlak N, Oates D, Nesland JM. Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: Evaluation of a new enrichment method. *Cytotherapy* [Internet]. 2004;6(3):244–52.

73. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the CellSearch System. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007;13(3):920–8.
74. Cristofanilli M. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *Semin Oncol*. 2006;33(SUPPL. 9):9–14.
75. Nagrath S, Sequist L V., Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007;450(7173):1235–9.
76. Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5013–21.
77. Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X. CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(4):709–22.
78. HPA RNA-seq normal tissues - Gene ID: 4582 [Internet]. [cited 2018 Jul 31]. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4582
79. Kojima T, Hashimoto Y, Watanabe Y, Kagawa S, Uno F, Kuroda S, et al. Technical advance A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells. *Comp Gen Pharmacol*. 2009;119(10).
80. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Lett*. 2007;253(2):180–204.
81. Thalgot M, Rack B, Eiber M, Souvatzoglou M, Heck MM, Kronester C, et al. Categorical versus continuous circulating tumor cell enumeration as early surrogate marker for therapy response and prognosis during docetaxel therapy in metastatic prostate cancer patients. *BMC Cancer* [Internet]. 2015;15(1):1–10.
82. Ju M, Kao GD, Steinmetz D, Chandrasekaran S, Keefe SM, Guzzo TJ, et al. Application of a telomerase-based circulating tumor cell (CTC) assay in bladder cancer patients receiving postoperative radiation therapy. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2014;15(6):683–7.
83. Ashida S, Okuda H, Chikazawa M, Tanimura M, Sugita O, Yamamoto Y, et al. Detection of circulating cancer cells with von hippel-lindau gene mutation in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000;6(October):3817–22.
84. McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, de la Taille A, Stifelman MD, Emanuel ER, Bagiella E, Rubin MA, Katz AE, Olsson CA SI. The detection of renal

- carcinoma cells in the peripheral blood with an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for MN/CA9. *Cancer*. 1999;492–7.
85. Seideman CA, Herati AS, Pan S, Cho JS, Cinman N, Tai J, et al. Prognostic Correlation of Circulating Tumor Cells in the Setting of Urothelial and Renal Cell Carcinoma. *J Urol* [Internet]. 2009;181(4):108.
 86. Meye A, Bilkenroth U, Schmidt U, Füssel S, Robel K, Melchior AM, et al. Isolation and enrichment of urologic tumor cells in blood samples by a semi-automated CD45 depletion autoMACS protocol. *Int J Oncol*. 2002;21(3):521–30.
 87. Flaig TW, Wilson S, Van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Wolfe P, Maroni P, et al. Detection of circulating tumor cells in metastatic and clinically localized urothelial carcinoma. *Urology* [Internet]. 2011;78(4):863–7.
 88. Bluemke K, Bilkenroth U, Meye A, Fuessel S, Lautenschlaeger C, Goebel S, et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Renal Cell Carcinoma Correlates with Prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2009;18(8):2190–4.
 89. Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: An immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol*. 2011;64(5):415–20.
 90. Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer*. 2007;96(3):417–23.
 91. van der Gun BTF, Melchers LJ, Ruiters MHJ, de Leij LFMH, McLaughlin PMJ, Rots MG. EpCAM in carcinogenesis: The good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis*. 2010;31(11):1913–21.
 92. Rossi E, Fassan M, Aieta M, Zilio F, Celadin R, Borin M, et al. Dynamic changes of live/apoptotic circulating tumour cells as predictive marker of response to Sunitinib in metastatic renal cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2012;107(8):1286–94.
 93. Nel I, Gauler TC, Bublitz K, Lazaridis L, Goergens A, Giebel B, et al. Circulating tumor cell composition in renal cell carcinoma. *PLoS One*. 2016;11(4):1–14.
 94. Loncaster J, Harris a, Davidson S, Logue J, Hunter R, Wyckoff C, et al. CAIX expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumour oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res*. 2001;61(Ca IX):6394–9.
 95. Swinson DEB, Jones JL, Richardson D, Wyckoff C, Turley H, Pastorek J, et al. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is

- associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(3):473–82.
96. Wykoff CC, Beasley NJP, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, et al. Hypoxia-inducible Expression of Tumor-associated Carbonic Anhydrases 1. *Cancer Res*. 2000;(13):7075–83.
 97. Huang WJ, Jeng YM, Lai HS, Fong IU, Sheu FYB, Lai PL, et al. Expression of hypoxic marker carbonic anhydrase IX predicts poor prognosis in resectable hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(3):1–14.
 98. Davidson B, Goldberg I, Berner A, Kristensen GB, Reich R. EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(2):161–9.
 99. Als AB, Dyrskjøt L, Von Der Maase H, Koed K, Mansilla F, Toldbod HE, et al. Emmprin and survivin predict response and survival following cisplatin-containing chemotherapy in patients with advanced bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15):4407–14.
 100. Tan H, Ye K, Wang Z, Tang H. CD147 expression as a significant prognostic factor in differentiated thyroid carcinoma. *Transl Res*. 2008;152(3):143–9.
 101. Liang YX, He HC, Han ZD, Bi XC, Dai QS, Ye YK, et al. CD147 and VEGF expression in advanced renal cell carcinoma and their prognostic value. *Cancer Invest*. 2009;27(7):788–93.
 102. Xu T, Zhou M, Peng L, Kong S, Miao R, Shi Y, et al. Upregulation of CD147 promotes cell invasion , epithelial-to-mesenchymal transition and activates MAPK / ERK signaling pathway in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(11):7432–41.
 103. Maertens Y, Humberg V, Erlmeier F, Steffens S, Steinestel J, Bögemann M, et al. Comparison of isolation platforms for detection of circulating renal cell carcinoma cells. *Oncotarget [Internet]*. 2017;8(50):87710–7.