

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB

MAILSON ALVES LOPES

**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA LIBERAÇÃO DE DNA LIVRE CIRCULANTE (cfDNA)
DURANTE PROCEDIMENTO CIRÚRGICO EM PACIENTES COM CÂNCER
COLORRETAL**

Brasília - DF

2024

MAILSON ALVES LOPES

**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA LIBERAÇÃO DE DNA LIVRE CIRCULANTE (cfDNA)
DURANTE PROCEDIMENTO CIRÚRGICO EM PACIENTES COM CÂNCER
COLORRETAL**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas da Universidade de Brasília.
Orientador (a): Prof. Dr. Fabio Pittella Silva

Brasília - DF

2024

MAILSON ALVES LOPES

**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA LIBERAÇÃO DE DNA LIVRE CIRCULANTE (cfDNA)
DURANTE PROCEDIMENTO CIRÚRGICO EM PACIENTES COM CÂNCER
COLORRETAL**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas da Universidade de Brasília.
Orientador (a): Prof. Dr. Fabio Pittella Silva

Brasília, 31 de maio de 2024

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fabio Pittella Silva
Orientador

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira
Avaliador

Prof. Dr. João Nunes Matos Neto
Avaliador

AGRADECIMENTO

Tenho imensa gratidão a Deus, por me motivar a cada dia. Parafraseando Ariano Suassuna – “Se eu não acreditasse em Deus, eu seria um desesperado”.

Dedico esse sonho realizado do mestrado ao meu menino!!! Miguel - meu filho, desde que chegou na nossa casa é o dono de tudo que há de bom. Faz dos nossos dias a maior emoção existente. Te amo filho!!!

Gostaria de agradecer também minha esposa Roberta, que esteve ao meu lado o tempo todo, sempre com uma palavra de sabedoria em suas críticas.

Aos meus pais – Natal Alves Lopes e Maria Oneida Alves Lopes, que dedicaram suas vidas a criar seu único filho com o maior amor do mundo. Nunca me faltou nada, sempre tive o maior carinho do mundo.

Gostaria de agradecer também a cada integrante do laboratório – Mariana, Brunna, Flavio, Luiza, Gabriel e Daniel. Assim como outros integrantes que passaram pelo laboratório de patologia molecular e que seguiram seu caminho.

Por fim, gostaria imensamente de agradecer a pós-doutoranda Ana Gualberto que muito me ensinou sobre algo tão novo como experimentos de bancada. E a doutoranda Maria Elvira que brilhantemente ajudou na confecção do artigo científico. Sem vocês, certamente eu não conseguiria terminar a pós-graduação.

RESUMO

Aproximadamente dois terços dos pacientes com câncer colorretal (CCR) são submetidos à ressecção com intenção curativa; no entanto, 30% a 50% desses pacientes apresentam recorrência. A concentração de DNA livre de células (cfDNA) antes e depois da cirurgia pode estar relacionada com o prognóstico de pacientes com CCR, mas há informações limitadas sobre níveis de cfDNA no momento da cirurgia. Este estudo teve como objetivo avaliar a dinâmica de liberação de cfDNA durante cirurgia em pacientes com CCR. Analisamos a liberação cirúrgica de cfDNA usando amostras de plasma de 23 pacientes com CCR em três pontos principais durante a cirurgia: pré-operatório (imediatamente antes da cirurgia), intraoperatório (durante cirurgia) e pós-operatório (no final da cirurgia). A eletroforese automatizada foi usada para analisar a concentração e fragmentação do cfDNA, que foram então correlacionadas com as variáveis clínicas. Nossas descobertas indicam um aumento significativo no cfDNA liberado durante e após a cirurgia (3,2 e 2,3 vezes maior, respectivamente, $p < 0,05$). Adicionalmente, descobrimos que a concentração de cfDNA aumenta no intraoperatório em pacientes com mais de 60 anos de idade, pacientes com comorbidades, pacientes com níveis de CEA > 5 ng/mL e pacientes com tumores localmente avançados (T3, T4, N-, M-). Em conjunto, os resultados sugerem que, além da idade fisiológica e comorbidades, a manipulação cirúrgica intensa decorrente da extensão do tumor pode resultar em maior dano tecidual e maior liberação de cfDNA.

Palavras-chaves: câncer colorretal, cfDNA, cirurgia

ABSTRACT

Approximately two-thirds of patients with colorectal cancer (CRC) undergo resection with curative intent; however, 30% to 50% of these patients experience recurrence. Cell-free DNA (cfDNA) concentration before and after surgery may be related to the prognosis of patients with CRC, but there is limited information about cfDNA levels at the time of surgery. This study aimed to evaluate the dynamics of cfDNA release during surgery in patients with CRC. We analyzed surgical release of cfDNA using plasma samples from 23 CRC patients at three key points during surgery: preoperative (immediately before surgery), intraoperative (during surgery), and postoperative (at the end of surgery). Automated electrophoresis was used to analyze cfDNA concentration and fragmentation, which were then correlated with clinical variations. Our findings indicate a significant increase in cfDNA released during and after surgery (3.2- and 2.3-fold higher, respectively, $p < 0.05$). Furthermore, cfDNA concentration has been found to increase intraoperatively in patients over 60 years of age, patients with comorbidities, patients with CEA levels >5 ng/mL, and patients with locally advanced tumors (T3, T4, N -, M). -. Taken together, the results suggest that, in addition to physiological age and comorbidities, current-intensive surgical manipulation of tumor extent may result in greater tissue damage and greater cfDNA release.

Palavras-chave: colorectal cancer, cfDNA, surgery

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Percentual de anatomopatologia da peça cirúrgica (pT pN M) dos pacientes operados com diagnóstico de CCR no Serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário da Universidade de Brasília.48
- Figura 2 - Comparação das concentrações de cfDNA. A) Exemplo de perfil de eletroferograma e corrida eletroforética. Sobreposição de pré-operatório, intraoperatório e pós-operatório. B) Representação gráfica das concentrações médias de cfDNA dos pacientes nos momentos pré-operatório (PRÉ), intraoperatório (INTRA) e pós-operatório (POS). O teste T de Student foi aplicado para PRÉ vs INTRA, INTRA vs POS, PRÉ vs POS. Os valores obtidos pelo teste estatístico foram plotados no mesmo gráfico.49
- Figura 3 - Representações gráficas das porcentagens das médias dos fragmentos <400 pb e >400 pb para os períodos pré-operatório (PRÉ), intraoperatório (INTRA) e pós-operatório (POS) 50
- Figura 4 - Comparação das concentrações de cfDNA com idade e comorbidades. A) Representação gráfica do cfDNA (ng/mL plasma) versus idade nos momentos pré-operatório (PRÉ), intraoperatório (INTRA) e pós-operatório (POS). O teste de Mann-Whitney foi aplicado separadamente para PRÉ-INTRA, INTRA-POS e PRÉ-POS, e os valores foram plotados no mesmo gráfico. Foi observada diferença estatística entre os momentos PRÉ-INTRA e INTRA-POS em pacientes com idade > 60 anos. B) Representação gráfica de pacientes acima de 60 anos com comorbidades ou não. C) Representação gráfica de cfDNA (ng/mL plasma) vs comorbidades nos momentos intraoperatório (INTRA) e pós-operatório (POS). O teste de Mann-Whitney foi aplicado separadamente para PRÉ-INTRA, INTRA-POS e PRÉ-POS, e os valores foram plotados no mesmo gráfico. Foi observada diferença estatística entre o PRE-INTRA em pacientes com comorbidades.....51
- Figura 5 - Análise da concentração do cfDNA em comparação com o tempo cirúrgico, sendo estratificados em 4 grupos (< 182 min, 138 a 240 min, 241 a 345 min e 436 a 450 min). B) Representa a análise do cfDNA de cirurgia com duração

entre 183 min a 240 min. C) Representa a análise do cfDNA de cirurgia com duração entre 241 min a 345 min.52

Figura 6 - Comparação das concentrações de cfDNA com o tempo de coleta de sangue (n = 16), análise das concentrações elevadas (n = 4) e reduzidas (n = 8) de cfDNA durante a cirurgia. A) Representação gráfica da liberação geral de cfDNA em cada tempo de coleta de sangue durante a cirurgia para cada paciente à esquerda. À direita, uma visão ampliada mostrando a liberação elevada de cfDNA para cada paciente. B) Representação gráfica da liberação de cfDNA em pacientes nos quais foi observada uma redução de cfDNA durante a cirurgia. À esquerda, gráfico geral. O teste de Friedman foi aplicado ($p = 0,0469$), seguido pelo teste de Wilcoxon para comparações entre PRE vs INTRA, INTRA vs POST e PRE vs POST. À direita, representação gráfica da liberação de cfDNA por paciente.53

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Percentual da presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília35
- Gráfico 2 - Percentual da presença de diabetes mellitus (DM) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília36
- Gráfico 3 - Percentual da localização do tumor de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília36
- Gráfico 4 - Percentual do tipo de cirurgia em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília37
- Gráfico 5 - Percentual do estadiamento do cirurgião (ypT ypN ypM) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília37
- Gráfico 6 - Percentual de transfusão no intraoperatório em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília38
- Gráfico 7 - Percentual do tipo histológico em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília38
- Gráfico 8 - Percentual do grau histológico em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília39
- Gráfico 9 - Percentual de perfuração macroscópica em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília39

Gráfico 10 - Percentual de invasão linfovascular em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	40
Gráfico 11 - Percentual de invasão perineural em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	40
Gráfico 12 - Percentual do número de buds tumorais em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	41
Gráfico 13 - Percentual de margens em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	41
Gráfico 14 - Percentual do anatomopatológico da peça cirúrgica (pT pN M) de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	42
Gráfico 15 - Percentual da idade (definição pelo estatuto) de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	42
Gráfico 16 - Percentual do IMC (obesidade > 30) de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	43
Gráfico 17 - Percentual da presença de comorbidades em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	43
Gráfico 18 - Percentual do tempo cirúrgico (pela descrição) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	44
Gráfico 19 - Percentual do CEA sérico pré-operatório em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	44

Gráfico 20 - Percentual do tamanho tumoral (maior eixo) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	45
Gráfico 21 - Percentual de linfonodos regionais (acometidos/ examinados) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	45
Gráfico 22 - Percentual de linfonodos regionais (acometidos/ examinados) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília	46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Análise descritiva das variáveis clínicas categorizadas de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília34
- Tabela 2 - Análise descritiva das variáveis clínicas sem categorização de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVOS GERAIS	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	METODOLOGIA.....	21
3.1	CRITERIOS DE INCLUSÃO	22
3.2	COLETA E ANÁLISE DE DADOS	22
3.3	QUANTIFICAÇÃO DE cfDNA	31
3.3.1	Extração de DNA livre circulante (cfDNA) e DNA tumoral circulante (ctDNA)	31
3.4	RESULTADOS.....	
3.4.1	Análise de correlação entre os procedimentos cirúrgicos e a dinâmica de cfDNA.....	31
4	METODOLOGIA.....	33
5	ANÁLISE DESCRITIVA	34
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	62

1 INTRODUÇÃO

Segundo a literatura a doença neoplásica maligna nos últimos anos tem crescido em todo o mundo. Usando estimativas extraídas da base de dados do GLOBOCAN 2018 e comparando com a dos anos atuais, a incidência e mortalidade em relação a câncer referenciadas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, naquele ano a estimativa era 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortos no mesmo ano. Destes tendo em foco somente câncer colorretal (CCR) a incidência era de 6,1% e mortalidade de 9,2%¹. A mesma instituição de pesquisa informa que a estimativa entre 2020 e 2040 é de 1,9 milhões de novos casos e de 930 mil mortos somente por CCR².

No Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, foram estimados os valores de 40.990 novos casos de CCR, sendo 20.520 casos de colon e reto em homens e 20.470 casos em mulheres. Isso representa um risco estimado de 19.63 casos novos a cada 100 mil homens e 19.03 para cada 100 mil mulheres³.

Com vistas ao tratamento, idealmente após o diagnóstico é imprescindível o estadiamento, classificando a doença em quatro estágios clínicos, de forma que o estágio 1 é a doença mais inicial existente, enquanto o estágio 4 é o pior cenário possível, com doença metastática⁴.

Para isso, classifica-se o tumor colorretal usando o sistema TNM, no qual o “T” representa a invasão do tumor primário na espessura da parede colônica. O “N” demonstra a presença de linfonodo acometido pela doença e o “M” a presença ou ausência de doença a distância do local primário, mostrando-se assim uma doença metastática. É importante ressaltar na edição TNM – 8ª edição do *American Joint Committee on Cancer* - publicada em 2018, houve discretas alterações, as quais são critérios de mau prognóstico. Sendo elas: o estágio M1c em caso de carcinomatose peritoneal; micrometastases linfonodais (>0,2 mm de diâmetro). Além disso a 8ª edição ainda orienta a considerar alguns parâmetros na tomada de decisão terapêutica⁵:

- CEA sérico pré-operatório.
- Escore de regressão tumoral – analisando a resposta da doença após tratamento neoadjuvante.
- Invasão linfovascular e perineural

- Instabilidade de Microssatélites (sendo este um bom fator prognóstico e preditivo de falha de resposta à terapia com fluoropirimidina).

- Status de mutação KRAS, NRAS e BRAF – visto que mutações nesses genes podem determinar falta de resposta a agentes direcionados ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR).

Estadiamento AJCC – 8ª edição

Quadro 1 – Tumor primário

T	Tumor primário
TX	O tumor não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ, carcinoma intramucoso (envolvimento da lâmina própria sem extensão através da mucosa muscular)
T1	Tumor invade a submucosa (através da muscular da mucosa, mas não a muscular própria)
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor invade através da muscular própria para os tecidos pericólicas
T4	Tumor invade* o peritônio visceral ou invade ou adere** ao órgão ou estrutura adjacente: <ul style="list-style-type: none"> • T4a - Tumor invade¹ através do peritônio visceral (incluindo perfuração grosseira do intestino através do tumor e invasão contínua de tumor através de áreas de inflamação na superfície do peritônio visceral) • T4b - Tumor invade diretamente* ou adere² a órgãos ou estruturas adjacentes.

¹ A invasão direta em T4 inclui a invasão de outros órgãos ou outros segmentos do colo como resultado da extensão direta através da serosa, como confirmado no exame microscópico (exemplo: invasão do cólon sigmoide por um carcinoma de ceco) ou por câncer em localização retroperitoneal ou subperitoneal, invasão direta de outros órgãos ou estruturas em virtude de extensão além da muscular própria (exemplo: tumor de parede posterior do cólon descendente que invade o rim esquerdo ou a parede abdominal lateral ou o câncer retal distal com invasão da próstata, vesículas seminais, colo do útero ou vagina). ² Tumor adere a outros órgãos ou estruturas, isso é classificado em cT4b. Entretanto, se nenhum tumor estiver presente na adesão, microscopicamente, a classificação deve ser pT1-4a, dependendo da profundidade anatômica da invasão da parede. Lembrete: A classificação V e L deve ser usada para identificar a presença ou ausência de invasão vascular ou linfática, enquanto o fator prognóstico da NP deve ser usado para invasão perineural.

Quadro 2 – Linfonodos regionais

N	Linfonodos regionais
N0	Sem metástases para linfonodos regionais
N1	Um a três linfonodos regionais positivos (tumor em linfonodos medindo 0,2mm), ou qualquer número de depósitos tumorais está presente e todos os linfonodos identificáveis são negativos: <ul style="list-style-type: none"> • N1a - Um linfonodo regional é positivo • N1b - Dois ou três linfonodos regionais são positivos • N1c - Nenhum linfonodo regional é positivo, mas há depósitos tumorais na subserosa, mesentério, tecidos pericólicos ou perirretais/mesorretais não peritonealizados
N2	Quatro ou mais linfonodos positivos: <ul style="list-style-type: none"> • N2a - Quatro a seis linfonodos positivos • N2b - Sete ou mais linfonodos positivos

Fonte: Estadiamento AJCC – 8ª edição

Quadro 3 - Metástase à distância

M	Metástase à distância
MX	Metástases não podem ser avaliadas
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástase em um ou mais locais ou órgãos distantes ou metástase peritoneal: <ul style="list-style-type: none"> • M1a - Metástase em um local ou órgão sem metástase peritoneal • M1b - Metástase em dois ou mais locais ou órgãos sem metástase peritoneal • M1c - Metástases na superfície peritoneal são identificadas isoladamente ou com outras metástases locais ou em órgãos

Fonte: Estadiamento AJCC – 8ª edição

Quadro 4 – Estadiamento Clínico

Estadiamento	T	N	M
Estágio 0	Tis		
Estágio I	T1,T2		
Estágio IIA	T3		
Estágio IIB	T4a		
Estágio IIC	T4b		
Estágio IIIA	T1,T2	N1/N1C	M0
	T1	N2a	M0
Estágio IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
Estágio IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
Estágio IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a
Estágio IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b
Estágio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1c

Fonte: Estadiamento AJCC – 8ª edição

Após o estadiamento é definida o quão grave está a doença, e então proposto o tratamento para o paciente que em termos gerais se trata da cirurgia do tumor colorretal com objetivo de cura ou controle local da doença, que na maioria dos casos é obtido⁴.

O acompanhamento seguindo a orientação do guideline versão 2020 da NCCN⁴ em estágio I deve fazer colonoscopia um ano após a cirurgia, seguida de nova colonoscopia ao terceiro ano e a cada cinco anos, sem necessidade de exames radiológicos (exceção a regra, se for identificado adenoma avançado – pólipos vilosos, pólipos > 1 cm ou displasia de alto grau) que deve ser repetido a colonoscopia no próximo ano.

O estadiamento para a possibilidade de somente acompanhamento clínico do paciente em estadiamentos iniciais ou indicação de terapia adjuvante o paciente é então levado ao acompanhamento.

Para o acompanhamento dos estágios II e III seguindo o estudo COLOFOL⁵, randomizado, com 2509 pacientes. Pode ser adotado a realização de tomografia (TC) de tórax e abdome, além de CEA e exames de imagem em intervalo curto (TC e CEA em 6,12,18,24, 36 meses) versus baixa frequência (TC e CEA em 12 e 36 meses). A avaliação em cinco anos, não demonstrou alteração na mortalidade geral ou específica por tumor colorretal entre as duas estratégias de triagem

O estágio IV tem uma conduta particularizada sendo acompanhada pelo protocolo institucional de INCA⁶ com consultas e exame físico a cada 3 meses, acompanhado de CEA até o terceiro ano. Após o quarto ano as consultas são realizadas semestralmente também com CEA. Em relação aos exames de imagem são realizados: tomografias de tórax, abdome e pelve semestralmente e colonoscopia no primeiro e terceiro ano.

A pesquisa aqui proposta, foi idealizada em avaliar o comportamento dinâmico do DNA livre circulante (cfDNA) durante o ato cirúrgico. O cfDNA refere-se a todo o DNA não encapsulado na corrente sanguínea, proveniente de eventos fisiológicos e/ou patológicos. O cfDNA ocorre como fragmentos de ácidos nucleicos que entram na corrente sanguínea durante a apoptose celular ou necrose. Uma parte desse cfDNA, que se origina de um clone de tumor, é chamado de DNA circulante tumoral (ctDNA). O ctDNA carrega informações sobre alterações moleculares do tumor de origem, representando o status genético tumoral. Esses fragmentos têm em média cerca de 170 bases de comprimento, com uma meia-vida de cerca de duas horas e estão presentes tanto na fase inicial quanto na fase tardia da doença neoplásica, incluindo câncer colorretal. Por estes motivos, o ctDNA representa um estado dinâmico da doença neoplásica do paciente. O estudo da peça cirúrgica, com posterior análise imuno-histoquímica, é atualmente considerada o padrão ouro na definição do estado tumoral de um paciente. No entanto, devido a heterogeneidade inter- ou intra-tumoral e à evolução clonal, torna-se necessário melhor compreensão sobre as alterações genéticas somáticas periféricas provenientes das células neoplásicas.

Com elevada incidência na população, faz-se necessário pensar em alternativas para diagnóstico primário precoce e/ou recidiva tumoral. Com isso tem crescido a vertente de avaliação do DNA tumoral no plasma antes do desenvolvimento de recorrência ou metástases com o potencial de contribuir para melhorar o desfecho de pacientes com CCR após a ressecção do tumor⁷.

A ressecção cirúrgica é a melhor opção de tratamento para pacientes com câncer de cólon, mas a recorrência do tumor, tanto local quanto à distância, está associada a um alto risco de morte relacionada ao câncer. No momento do diagnóstico inicial, aproximadamente dois terços dos pacientes com CCR são submetidos à ressecção com intenção curativa, entretanto, de 30% a 50% desses pacientes apresentam recidiva que levam ao óbito⁷. A maioria dessas recorrências ocorre durante os primeiros 2 anos após a cirurgia e a maioria dos programas de acompanhamento termina 5 anos após o tratamento primário^{8,9}. Em pacientes com câncer de cólon em estágio II (~ 25% de todos os cânceres colorretais), o manejo após a ressecção cirúrgica permanece um dilema clínico, pois nesse grupo, cerca de 80% são curados apenas pela cirurgia¹⁰. Da mesma forma, cerca de metade dos pacientes com doença em estágio III são curados apenas pela cirurgia. O procedimento cirúrgico para remoção de tumores colorretais utiliza técnicas diferentes conforme a extensão, distribuição e local do tumor. Tendo em vista o tratamento cirúrgico e com base em sua localização, na drenagem linfática, e irrigação sanguínea, podem ser adotados os seguintes procedimentos: colectomia direita, colectomia de transversa, colectomia esquerda, retossigoidectomia, colectomia total ou ainda proctocolectomia.

Após o tratamento cirúrgico, a principal preocupação é a recidiva tumoral, com isso surge a importância da biópsia líquida. Que é uma técnica nova e promissora, uma vez que é minimamente invasiva que: (i) permite a detecção do cfDNA e ctDNA, (ii) pode ser realizada repetidamente e (iii) tem grande potencial para o rastreamento e detecção de um câncer. Tendo em vista que é uma técnica baseada na análise do sangue periférico, representa o status da doença tumoral em tempo real. O uso dessa técnica, tem como uma das principais vantagens avaliar o perfil tecidual abrangente (reflexo da heterogeneidade inter e intra-amostral)¹¹. A utilidade da biópsia líquida também tem se tornado evidente na avaliação de doença residual mínima (DRM) com base no ctDNA,

mesmo na ausência de qualquer outra evidência clínica ou radiológica da doença. Em um estudo recente, foi avaliada a capacidade do ctDNA em detectar DRM em 1046 amostras de plasma de uma coorte prospectiva de 230 paciente com CCR estágio II ressecado¹². Em paciente sem quimioterapia adjuvante, o ctDNA foi detectado no pós-operatório em 14 dos 178 pacientes (7,9%) e a recorrência radiológica foi detectada durante o acompanhamento em 11 desses 14 pacientes (78,6%) (8). Entretanto, o ctDNA pós-operatório foi negativo nos 164 restantes dos 178 pacientes (92,1%) e a recorrência da doença foi identificada em apenas 16 pacientes (9,8%). Em pacientes tratados com quimioterapia, a presença de ctDNA após a conclusão da quimioterapia também foi associada a sobrevida livre de recorrência (RFS). No contexto de tumor de reto localmente avançado (T3/T4 e/ou metástase nodal positiva) com plano terapêutico de quimiorradioterapia neoadjuvante, não houve diferença na RFS entre pacientes com ctDNA detectável na linha de base (pré-tratamento) e aqueles sem ctDNA detectável após quimiorradioterapia. Apesar disso, os pacientes que tiveram status positivo para ctDNA após quimiorradioterapia ou cirurgia tiveram um risco aumentado de recorrência (8). Embora observações como estas evidenciam o potencial de utilização do ctDNA como marcador de recidivas, não há até o momento, nenhum estudo sobre a dinâmica do cfDNA durante a prática cirúrgica e tampouco sabemos se a dinâmica do cfDNA durante o procedimento cirúrgico pode interferir na detecção de DRM por quantificação do ctDNA pós-cirúrgico.

Neste estudo, pretendemos avaliar a dinâmica da liberação de DNA livre circulante (cfDNA) durante procedimento cirúrgico em pacientes com câncer colorretal. O cfDNA será quantificado em amostras de sangue periférico coletadas nos seguintes momentos: (i) pré-operatório, com o paciente já em centro cirúrgico e na indução anestésica; (ii) durante o ato cirúrgico - após a retirada da peça cirúrgica; (iii) após o final da cirurgia, com o paciente ainda na sala cirúrgica. Tais momentos foram escolhidos com o racional de que durante a manipulação tecidual (incluído tecido tumoral) pode fazer elevação de cfDNA e em uma última análise poderia alterar o desfecho do tratamento oncológico. Uma outra pergunta que nos motivou a escolher estes momentos para pesquisa do material genético foi a possibilidade avaliar se tumores precoces ou tumores avançados teriam diferenças nas concentrações de cfDNA. Por tudo descrito acima, estamos

avertando a possibilidade de um novo biomarcador, sendo que o momento ideal de início de acompanhamento é o ato cirúrgico.

Outro ponto pesquisado foi o tamanho do fragmento de cfDNA durante estes 3 momentos pesquisados. Admitindo que fragmentos < 400 pb não é originado de eventos fisiológicos como apoptose e sim de lise direta de leucócitos ou outro evento que está liberando material genético na circulação, como por exemplo morte celular de origem tumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a dinâmica da liberação de DNA livre (cfDNA) durante procedimento cirúrgico em pacientes com câncer colorretal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a carga de cfDNA imediatamente antes da cirurgia, durante o procedimento e imediatamente após a cirurgia.

- Investigar correlação entre o procedimento cirúrgico adotado e a carga de cfDNA liberada.

- Investigar tempo de “clearance” da sobrecarga de cfDNA após os diversos cenários cirúrgicos.

- Investigar correlação entre o tempo de cirurgia e a carga de cfDNA.

- Correlacionar estadiamento clínico (durante o ato cirúrgico), patológico com cfDNA.

- Correlacionar as concentrações e fragmentos de cfDNA com as variáveis clínicas

3 METODOLOGIA

O presente estudo aqui descrito faz parte de um estudo maior que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e foi iniciado somente após a aprovação daquele comitê. Todos os pacientes ou indivíduos foram previamente informados sobre o referido estudo e convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) caso concordem em participar do estudo. As amostras biológicas foram obtidas apenas de participantes que forneceram consentimento informado para participação no estudo conforme modelo de TCLE (Anexo 1). É um estudo observacional prospectivo no qual foi feita a análise molecular de 23 pacientes portadores câncer colorretal de estádios I, II ou III, virgens de tratamento ao diagnóstico. Também foram incluídos paciente sabidamente estágio IV, com intuito de análise comparativa dos demais estágios, visto que sabidamente estes pacientes apresentam cfDNA em concentrações maiores¹⁵. As amostras de plasma foram coletadas em 3 momentos: (i) antes do procedimento cirúrgico; (ii) durante o procedimento cirúrgico; (iii) após o procedimento.

As informações clínicas e patológicas, foram obtidas nos laudos da patologia e no prontuário de cada paciente. Detalhes do procedimento cirúrgico foram coletados para fins de análise. Tais como:

- Idade
- IMC,
- Comorbidades,
- Localização do tumor quanto a lateralidade
- Tipo de procedimento adotado, incluindo pacientes com proposta alterado no intercurso da cirurgia (exemplo: iniciou por videolaparoscopia e por dificuldade cirúrgica, foi optado por laparotomia)
- Estadiamento feito pelo olhar do cirurgião durante o ato cirúrgico,
- Tempo,
- Sinais vitais (frequência cardíaca, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica
- Intercorrência,
- Transfusão de hemoderivados,

- Marcador de CEA
- Uso de material sintético (grampeadores lineares ou circulares),
- Margem do tumor, Classificação clínica durante o procedimento (exemplo: cT3cN+),

3.1 CRITERIOS DE INCLUSÃO

A amostra do presente estudo teve como origem os pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília. Durante o período de janeiro de 2023 até janeiro de 2024. Além disso, ainda tinha necessidade de ter as 3 amostras coletadas durante a cirurgia e no mínimo de 4 ml de plasma após o preparo das amostras sanguíneas. Na ausência de um destes critérios o paciente era excluído do trabalho.

3.2 COLETA E ANÁLISE DE DADOS

Foi coletado o material biológico, ou seja, o sangue conforme descrito no item a seguir e informações em prontuário eletrônico do hospital universitário. A evolução da técnica cirúrgica passando da técnica convencional (cirurgia aberta) a cirurgia minimamente invasiva (laparoscópica ou robótica) tem como objetivo garantir a ressecção completa com margens satisfatórias (5 cm) e amostragem linfonodal mínima de 12 linfonodos. Em tumores com invasão de órgão adjacentes (T4b) requerem ressecção em bloco de estruturas acometidas por contiguidade. A exceção a essa regra são os tumores intramucosos (Tis) ou com invasão mínima da submucosa (<1000 micras), bem diferenciados e sem invasão linfovascular, neste caso a possibilidade de metástase linfonodal é muito baixa, sendo a ressecção endoscópica com margens livres o tratamento definitivo, sendo levado a cirurgia somente se houver alguma complicação (exemplo – perfuração colônica durante o ato da ressecção pela colonoscopia).

O ato cirúrgico em linhas gerais, independente da técnica escolhida (técnica convencional ou minimamente invasiva) envolve os seguintes passos:

1) Abrir a cavidade – a incisão adequada é escolhida sendo na maioria das vezes mediana supra-infra umbilical, podendo ser ampliada durante a cirurgia se necessário. Então as seguintes camadas – pele, subcutâneo, aponeurose abertas com bisturi frio ou eletrocautério.

2) Inventário - é feito a inspeção da cavidade com especial atenção a presença de ascite, implantes peritoneais – caracterizado carcinomatose peritoneal, metástase em outros órgãos, tumores sincrônicos, expressão na camada serosa, linfonomegalia e extensão do tumor primário.

3) Identificação e controle vascular – idealmente a ligadura vascular na origem dos vasos que drenam a região colônica de interesse (linfadenectomia D2 – escola japonesa)¹³.

4) Secção colônica – decidida a margem adequada (5 cm distal e proximal ao tumor) é feito a secção do cólon.

5) Anastomose primária ou colostomia – a decisão pela anastomose primária deve envolver uma boa vascularização, sem tensão. Ainda deve ser lembrado que em seguimentos de alças intestinais de mesmo diâmetro deve ser feito anastomose término-terminal, enquanto que se o diâmetro estiver diferente deve ser preferido anastomose latero-lateral. Podendo esta ser de confecção manual ou mecânica sendo as duas igualmente seguras e a mecânica ainda tem a vantagem de reduzir o tempo cirúrgico. Em caso de dúvida na anastomose é recomendado a colostomia pelo risco de fistula.

6) Revisão e fechamento – nesta etapa é revisado o fechamento hermético da anastomose, hemostasia em toda a cavidade e presença de alguma outra anormalidade. Por fim o fechamento da aponeurose em seguida subcutâneo e pele. Em cirurgias videolaparoscópicas os orifícios de trocateres > 10 mm o recomendado e o fechamento.

Tendo em vista essa visão geral e descrevendo a cirurgia laparoscópica, tendo em vista que na grande maioria dos procedimentos realizados nos pacientes desta pesquisa, podemos citar:

A) Colectomia esquerda⁶

1) Incisão transumbilical e inserção de trocater de 10-11mm pela técnica aberta ou agulha de Veress;

2) Insuflação de CO2 na cavidade, geralmente de 12-15mm de pressão;

3) Inserção da ótica de 30 graus com posterior realização de inventário da cavidade;

4) Avaliação da presença de carcinomatose peritoneal ou ascite, haverá a realização de biópsia ou coleta de líquido para citologia de células neoplásicas (a critério do julgamento da equipe cirúrgica);

5) Serão utilizados três ou quatro portais de trabalho adicionais (portais) conforme a necessidade, para inserção de materiais laparoscópicos (ótica de 30 graus; pinças de apreensão atraumáticas (duas); pinças de dissecação laparoscópica tipo Maryland; pinça de energia (tipo bipolar ou ultrassônica); tesoura laparoscópica; cânula de aspiração/irrigação laparoscópica; endogrampeadores lineares e endoclipadores), sendo que um deles necessariamente um trocater de 12mm e os demais de 5mm;

6) Identificação visual ou tátil para comprovação da localização tumoral;

7) Secção do ligamento redondo e falciforme do fígado e posicionamento do grande epíplon no andar superior do abdome ajudado pela manobra de Trendelenburg;

8) Posicionamento das alças de intestino delgado para o quadrante inferior direito com exposição do ângulo de Treitz;

9) Secção do ligamento do ângulo de Treitz e identificação da veia mesentérica-inferior;

10) Secção do ligamento redondo e falciforme do fígado e posicionamento do grande epíplon no andar superior do abdome ajudado pela manobra de Trendelenburg;

11) Posicionamento das alças de intestino delgado para o quadrante inferior direito com exposição do ângulo de Treitz;

12) Secção do ligamento do ângulo de Treitz e identificação da veia mesentérica inferior;

13) Isolamento da veia mesentérica inferior, ligadura com endoclipes e secção desta na altura do ângulo de Treitz;

14) Dissecação do plano retroperitoneal com dissecação romba em direção ao flanco esquerdo, anterior à fáscia de Gerota, aos vasos gonadais e o ureter até a identificação da parede abdominal e o musculo psoas;

15) Identificação da artéria mesentérica inferior e ligadura junto a sua origem na artéria aorta com clipes. Secção da artéria mesentérica inferior a aproximadamente 1cm

da origem da aorta, preservando o plexo autonômico; ou dos ramos sigmóides em caso de preservação da artéria da cólica esquerda ou da artéria retal superior;

16) Prosseguir a dissecação do plano retroperitoneal em direção à pelve, mantendo o cuidado com o ureter e os vasos gonadais, até a identificação da fáscia própria do reto;

17) Realizar a secção dos ligamentos de fixação do cólon esquerdo e sigmoide ao peritônio parietal por via anterior, encontrando o plano de dissecação posterior retroperitoneal;

18) De acordo com a localização do tumor, prosseguir com a dissecação circunferencial à fáscia própria do reto em sentido caudal, de forma a dar uma margem mínima de 5cm distal ao tumor, com a fáscia mesorretal íntegra;

19) Uma vez estabelecido o limite distal da ressecção, o mesorreto será seccionado circunferencialmente até a identificação da parede retal. Esta será seccionada com um ou mais disparos de grampeador linear cortante laparoscópico;

20) O segmento de retossigmoide seccionado é exteriorizado por incisão em FIE ou suprapúbica, e o cólon descendente é seccionado, garantindo margem mínima de 5cm proximal ao tumor e segmento remanescente bem vascularizado (obs.: cólon abaixado que alcança a região púbica geralmente tem extensão suficiente para anastomose colorretal sem tensão);

21) Uma vez seccionado o cólon esquerdo, será introduzida a ogiva do grampeador circular fixada com sutura em bolsa de tabaco;

22) Reintrodução da alça de cólon proximal com a ogiva para o interior da cavidade e realizado fechamento da aponeurose da incisão de extração;

23) Neste momento será verificado se a mobilização do cólon esquerdo permite anastomose sem tensão com o reto superior. Caso a alça não desça com facilidade até o local definido para a anastomose na pelve, será necessário prosseguir a dissecação retroperitoneal em direção ao ângulo esplênico do cólon com a devida liberação deste ângulo assim como a secção da porção esquerda do ligamento gastrocólico;

24) Introdução do grampeador circular por via retal, acoplamento da ogiva ao grampeador, e realização da anastomose colorretal término-terminal pela técnica do duplo grampeamento;

25) Verificação da integridade da anastomose, através da insuflação de ar por via retrógrada. Drenagem da pelve com dreno apenas em caso de anastomose no reto extraperitoneal ou de pacientes previamente irradiados;

26) A incisão dos portais de 10-12mm devem ser fechados com fio inabsorvível ou absorção lenta;

B) Colectomia direita⁶

1) Incisão transumbilical e inserção de trocater de 10-11mm pela técnica aberta ou agulha de Veress;

2) Insuflação de CO₂, geralmente de 12-15mm de pressão;

3) Inserção da ótica de 30 graus e realização de inventário da cavidade;

4) Em caso de presença de carcinomatose peritoneal ou ascite, pode ser realizado biópsia ou coleta de líquido para citologia de células neoplásicas (a critério do julgamento da equipe cirúrgica);

5) Serão utilizados três ou quatro portais de trabalho adicionais (portais) conforme a necessidade, para inserção de materiais laparoscópicos (ótica de 30 graus; pinças de apreensão atraumáticas (duas); pinças de dissecação laparoscópica tipo Maryland; pinça de energia (tipo bipolar ou ultrassônica); tesoura laparoscópica; cânula de aspiração/irrigação laparoscópica; endogrampeadores lineares e endoclipadores), sendo que um deles necessariamente um trocater de 12mm e os demais de 5mm;

6) Identificação visual ou tátil para comprovação da localização tumoral;

7) Secção do ligamento redondo e falciforme do fígado e posicionamento do grande epíplon no andar superior do abdome ajudado pela manobra de Trendelenburg;

8) Posicionamento das alças de intestino delgado para o quadrante esquerdo com exposição do tronco da artéria mesentérica superior;

9) Identificação da artéria ileocólica e abertura do peritônio no folheto anterior do mesentério próximo à origem da artéria ileocólica na artéria mesentérica superior. Isolamento da artéria e veia ileocólica e ligadura destas com cliques;

10) Dissecação do plano retroperitoneal anterior ao duodeno até a parede abdominal lateral direita com atenção ao ureter e aos vasos gonadais cursando no retroperitônio que devem permanecer posteriores ao plano de dissecação;

11) Identificação da artéria e veia cólicas direitas ou ramo direito da veia cólica média e ligadura destas perto da origem com endoclipador ou utilizando pinça de energia apropriada. Atenção ao ramo venoso cólico da alça de Henle, que deve ser controlado para evitar sangramento durante a dissecação;

12) Secção do grande epíplon ao nível desejado de ressecção distal do cólon e secção do ligamento gastrocólico à direita dos vasos cólicos médios;

13) Liberação do cólon direito de seus pontos de fixação parietais na goteira parietocólica direita;

14) Verificação da total liberação do cólon direito de seus pontos de fixação retroperitoneais e vasculares;

15) Secção do cólon e anastomose: caso seja realizada anastomose intracorpórea (preferida principalmente em pacientes com alto IMC), esta é realizada após secção por grampeamento do íleo terminal e cólon transversal, e, em seguida, anastomose ileocólica látero-lateral grampeada com fechamento por sutura laparoscópica da brecha intestinal. Fechamento da brecha mesentérica é recomendado. A peça é retirada por incisão suprapúbica ou em fossa ilíaca para reduzir incidência de hérnia;

16) Caso opte-se pela anastomose extracorpórea, o trocater umbilical é retirado, proteção da ferida com filme plástico ou afastador descartável, seccionado o íleo e o cólon transversal e realizada anastomose ileocólica manual ou grampeada;

17) A incisão de retirada da peça deve ser fechada com fio inabsorvível ou absorção lenta, assim como as incisões dos portais de 10-12mm.

C) Colectomia total

1) Incisão transumbilical e inserção de trocater de 10-11mm pela técnica aberta ou agulha de Veress;

2) Insuflação de CO₂, geralmente de 12-15mm de pressão;

3) Inserção da ótica de 30 graus e realização de inventário da cavidade;

4) Em caso de presença de carcinomatose peritoneal ou ascite, pode ser realizado biópsia ou coleta de líquido para citologia de células neoplásicas (a critério do julgamento da equipe cirúrgica);

5) Serão utilizados três ou quatro portais de trabalho adicionais (portais) conforme a necessidade, para inserção de materiais laparoscópicos (ótica de 30 graus; pinças de

apreensão atraumáticas (duas); pinças de dissecação laparoscópica tipo Maryland; pinça de energia (tipo bipolar ou ultrassônica); tesoura laparoscópica; cânula de aspiração/irrigação laparoscópica; endogrampeadores lineares e endoclipadores), sendo que um deles necessariamente um trocater de 12mm e os demais de 5mm;

6) Identificação visual ou tátil para comprovação da localização tumoral;

7) Secção do ligamento redondo e falciforme do fígado e posicionamento do grande epíplon no andar superior do abdome ajudado pela manobra de Trendelenburg;

8) Posicionamento das alças de intestino delgado para o quadrante esquerdo com exposição do tronco da artéria mesentérica superior;

9) Identificação da artéria ileocólica e abertura do peritônio no folheto anterior do mesentério próximo à origem da artéria ileocólica na artéria mesentérica superior. Isolamento da artéria e veia ileocólica e ligadura destas com cliques;

10) Dissecação do plano retroperitoneal anterior ao duodeno até a parede abdominal lateral direita com atenção ao ureter e aos vasos gonadais cursando no retroperitônio que devem permanecer posteriores ao plano de dissecação;

11) Identificação da artéria e veia cólicas direitas ou ramo direito da veia cólica média e ligadura destas perto da origem com endoclipador ou utilizando pinça de energia apropriada. Atenção ao ramo venoso cólico da alça de Henle, que deve ser controlado para evitar sangramento durante a dissecação;

12) Secção do grande epíplon ao nível desejado de ressecção distal do cólon e secção do ligamento gastrocólico à direita dos vasos cólicos médios;

13) Liberação do cólon direito de seus pontos de fixação parietais na goteira parietocólica direita;

14) Verificação da total liberação do cólon direito de seus pontos de fixação retroperitoneais e vasculares;

15) Secção do ligamento do ângulo de Treitz e identificação da veia mesentérica inferior;

16) Isolamento da veia mesentérica inferior, ligadura com endoclipes e secção desta na altura do ângulo de Treitz;

17) Dissecção do plano retroperitoneal com dissecção romba em direção ao flanco esquerdo, anterior à fáscia de Gerota, aos vasos gonadais e o ureter até a identificação da parede abdominal e o musculo psoas;

18) Identificação da artéria mesentérica inferior e ligadura junto a sua origem na artéria aorta com clipes. Secção da artéria mesentérica inferior a aproximadamente 1cm da origem da aorta, preservando o plexo autonômico; ou dos ramos sigmoides em caso de preservação da artéria da cólica esquerda ou da artéria retal superior;

19) Prosseguir a dissecção do plano retroperitoneal em direção à pelve, mantendo o cuidado com o ureter e os vasos gonadais, até a identificação da fáscia própria do reto;

20) Realizar a secção dos ligamentos de fixação do cólon esquerdo e sigmoide ao peritônio parietal por via anterior, encontrando o plano de dissecção posterior retroperitoneal;

21) De acordo com a localização do tumor, prosseguir com a dissecção circunferencial à fáscia própria do reto em sentido caudal, de forma a dar uma margem mínima de 5cm distal ao tumor, com a fáscia mesorretal íntegra.

D) Retossigmoidectomia

1) Paciente em decúbito dorsal

2) Assepsia e anti-sepsia

3) Campos estéreis

4) Pneumoperitônio pela Técnica de Veress ou técnica de Hanson, com passagem de trocater, posteriormente a câmara e trocanteres auxiliares

5) Avaliação de carcinomatose peritoneal, presença de ascite e implantes hepáticos

6) Dissecção da artéria e veia mesentérica inferiores com ligadura da mesma

7) Dissecção do colón esquerdo com linfadenectomia retroperitoneal.

8) Dissecção do reto pela técnica de excisão total do mesorreto

9) Liberação do cólon esquerdo pela manobra de Mattox

10) Ressecção do reto com neuropreservação bilateral com grampeador

11) Incisão auxiliar de Maillard

12) Anastomose mecânica colorretal com grampeador circular

13) Retirada da peça pela incisão auxiliar de Maillard

14) Hemostasia e lavagem

15) Drenagem de cavidade com dreno – essa etapa pode ser dispensada

16) Síntese por planos.

E) Amputação abdominoperineal

1) Paciente em decúbito dorsal

2) Assepsia e anti-sepsia de tronco

3) Campos estéreis

4) Pneumoperitônio pela Técnica de Veress ou técnica de Hanson, com passagem de trocater, posteriormente a câmara e trocanteres auxiliares

5) Avaliação de carcinomatose peritoneal, presença de ascite e implantes hepáticos

6) Dissecção da artéria e veia mesentérica inferiores com ligadura da mesma

7) Dissecção do colón esquerdo com linfadenectomia retroperitoneal

8) Dissecção do reto pela técnica de excisão total do mesorreto até o nível de musculatura elevadora com neuropreservação bilateral,

9) Liberação do cólon esquerdo pela manobra de Mattox, seccionado com grampeador

10) Incisão fusiforme interessando ânus ressecção de musculatura elevadora perineal

11) Retirada da peça via perineal

12) Trazido colon para parede abdominal esquerda

13) Hemostasia e lavagem

14) Drenagem de cavidade com dreno – essa etapa pode ser dispensada

15) Maturação de colostomia abdominal.

O julgamento de ressecção completa no momento é baseado na impressão clínica da equipe cirúrgica (R0 - ressecção completa), margens cirúrgicas (R2 – margens cirúrgicas macroscopicamente comprometidas ou R1 margens microscopicamente invadidas).

Após o tratamento cirúrgico é definido o estadiamento patológico (pT, pN, pM), com base na análise do patologista. Em caso de algum tratamento neoadjuvante é designado o prefixo “yp” (ou seja – ypT, ypN).

3.3 COLETA DE SANGUE TOTAL PARA POSTERIOR QUANTIFICAÇÃO DE CFDNA

No estudo aqui realizado foram coletadas amostras de sangue em três momentos da cirurgia. Sendo a primeira amostra de durante a indução anestésica, colhida em uma seringa de 20 ml, do acesso destinado a monitorização invasiva arterial (PAI), sendo armazenados em 4 ou 5 tubos de 4 ml de EDTA e deixado em gelo até o transporte ao laboratório de análise clínicas em pavilhão diferente do centro cirúrgico que a cirurgia é realizada.

3.3.1 Extração de DNA livre circulante (cfDNA)

As amostras de plasma foram processadas conforme descrito em Pittella-Silva *et al.*¹⁴. Brevemente, o plasma foi separado do sangue coletado em tubos de EDTA-Na² em até 2 horas após a coleta. Os tubos com sangue total foram centrifugados a 2.000g por 10 min a 4°C e o sobrenadante (plasma) foi recuperado e centrifugado novamente a 16.000g por 10 min para remoção de precipitados e armazenado a -80°C até a extração do cfDNA. O cfDNA foi extraído utilizando-se o kit de isolamento de ácido nucléico total MagMAX cfTNA (ThermoFisher), de acordo com o manual do fabricante. A análise de concentração, qualidade e fragmentação do cfDNA obtido foi realizada em sistema de eletroforese automatizada através do equipamento TapeStation (Agilent). Foram adotados os padrões de qualidade para utilização do cfDNA conforme previamente descrito¹⁴. O cfDNA foi quantificado nas amostras pré, intra e pós cirúrgicas.

3.3.2 Análise de correlação entre os procedimentos cirúrgicos e a dinâmica de cfDNA

Os níveis de cfDNA obtidos nos pontos determinados de coleta (pré-, intra- e pós-cirúrgicas) foram comparados com os diversos procedimentos cirúrgicos adotados: colectomia direita, colectomia de transversa, colectomia esquerda, retossigoidectomia, colectomia total ou ainda proctocolectomia. Demais dados de variações no procedimento

cirúrgico tais com (i) tempo de cirurgia; (ii) transfusão sanguínea e (iii) contagem de leucócitos, serão aferidos e correlacionados com a dinâmica dos níveis de cfDNA determinados em cada ponto de coleta. Para a avaliação da dinâmica do ctDNA em relação ao marcador tumoral CEA, será determinada a correlação entre os níveis absolutos de ctDNA e as concentrações sanguíneas do CEA aferidas conforme protocolo de acompanhamento do paciente.

3.3.3 População/ tamanho amostral / critérios de elegibilidade (inclusão/exclusão)

Os 23 pacientes com diagnóstico de câncer colorretal virgens de tratamento, foram selecionados no serviço de Proctologia do Hospital Universitário de Brasília da Universidade (HUB-Ebserh) - Sistema Único de Saúde (SUS).

Para serem elegíveis, os pacientes deverão apresentar diagnóstico de câncer colorretal (CCR) estádios I, II, III e IV (tais paciente foram incluídos neste presente trabalho com intuito de avaliação do cfDNA conforme os critérios diagnósticos definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (10, 11)

Resumidamente, os critérios de inclusão no estudo serão os seguintes:

- Diagnóstico de câncer colorretal nos estádios I, II ou III;
- Não ter recebido tratamento cirúrgico ou quimioterápico prévio (virgens de tratamento);
- Ter amostra de plasma antes da primeira intervenção terapêutica;
- Ser submetido à cirurgia

Resumidamente, os critérios de exclusão no estudo serão os seguintes:

- A) História previa de qualquer outra neoplasia maligna;
- B) Já ter recebido tratamento cirúrgico ou quimioterápico previamente;
- C) Não ter cfDNA suficiente (<10ng) no plasma antes da primeira intervenção terapêutica;
- D) Não ser submetido a procedimento cirúrgico

4 ANÁLISE DE DADOS

Foram realizadas análises descritivas, de associação e de curva de tendência. As análises dos dados foram realizadas no programa IBM SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 23, 2015. O nível de significância utilizado em todo estudo foi de 5%.

As variáveis qualitativas foram apresentadas por meio de frequência (n) e porcentagem (%). As medidas descritivas utilizadas para as variáveis quantitativas foram: média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e amplitude interquartil.

As concentrações e perfil de fragmentação de cfDNA foram correlacionadas com as variáveis clínicas por meio de análise estatística utilizando o software GraphPad Prism. Os testes estatísticos utilizados estão descritos na legenda da figura de cada resultado.

5 ANÁLISE DESCRITIVA

A Tabela 1 descreve os dados clínicos categorizados. Já as variáveis sem categorização estão apresentadas na Tabela 2.

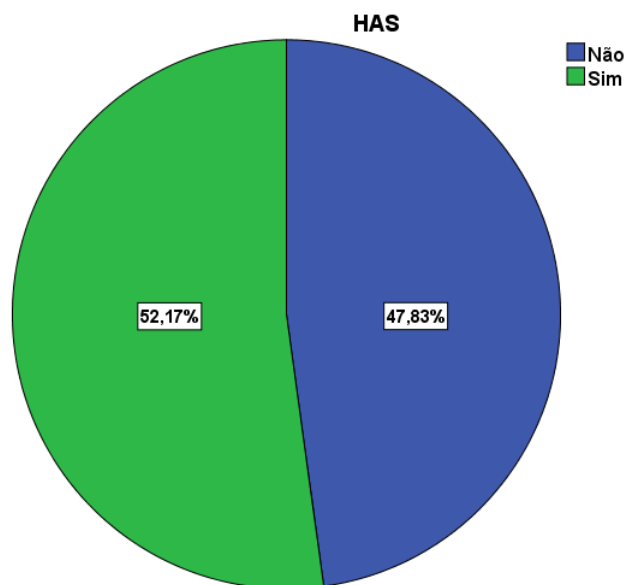
Tabela 1 - Análise descritiva das variáveis clínicas categorizadas de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília

		n	%
HAS	Não	11	47,83
	Sim	12	52,17
DM	Não	16	69,57
	Sim	7	30,43
Localização do tumor	Retossigmoide	12	52,17
	Cólon esquerdo	5	21,74
	Cólon direito	6	26,09
Tipo de cirurgia (VDL x aberta)	VDL	18	78,26
	Aberta	1	4,35
	VDL/Aberta	4	17,39
Estadiamento do cirurgião (TNM)	(T3/T4)/ N-/ M1	3	13,04
	(T3/T4)/ N-/ M-	8	34,78
	Não T4/ N-/ M-	12	52,17
Transfusão no intraoperatório	Não	23	100,00
Tipo	Adenocarcinoma invasor tipo intestinal	17	73,91
	Adenocarcinoma invasor, com componente mucinoso	5	21,74
	Adenocarcinoma (surgido de adenoma tubuloviloso de alto grau)	1	4,35
Grau histológico	NDN	1	4,35
	G1, bem diferenciado	7	30,43
	G2, moderadamente diferenciado	14	60,87
	G3, pouco diferenciado	1	4,35
Perfuração macroscópica	Presente	1	4,35
	Ausente	22	95,65
Invasão linfovascular	Não evidenciada	15	65,22
	Presente	8	34,78
Invasão perineural	Não evidenciada	18	78,26
	Presente	5	21,74
Número de buds tumorais	Não evidenciado	1	4,35
	NDN	2	8,70
	Escore baixo	6	26,09
	Escore intermediário	10	43,48
	Escore alto	4	17,39
Margens	Livres	22	95,65
	Radial comprometida	1	4,35
Anatomopatológico da peça cirurgia (pT pN M)	EC 0	1	4,35
	EC I	2	8,70
	EC II	5	21,74
	EC III	14	60,87

	EC IV	1	4,35
Idade (definição pelo estatuto)	< 60 anos	9	39,13
	> 60 anos	14	60,87
IMC (obesidade > 30)	< 30,00	13	59,09
	> 30,00	9	40,91
	Não informado	1	
Comorbidades	Não	9	39,13
	Sim	14	60,87
Tempo cirúrgico (feito uma média entre todos os pacientes pela descrição)	< 246 min	13	56,52
	> 246 min	10	43,48
CEA sérico pré-operatório	< 5	9	42,86
	> 5	12	57,14
	Não informado	2	
Tamanho tumoral (maior eixo)	< 5,2 cm	13	56,52
	> 5,2 cm	10	43,48
Linfonodos regionais (acometidos/ examinados)	Não	9	39,13
	Sim	14	60,87
Linfonodos regionais (acometidos/ examinados)	< 20	9	39,13
	> 20	14	60,87
Concordância do laudo do cirurgião com o anatomopatológico	Não	1	4,35
	Sim	22	95,65
Total		23	100,00

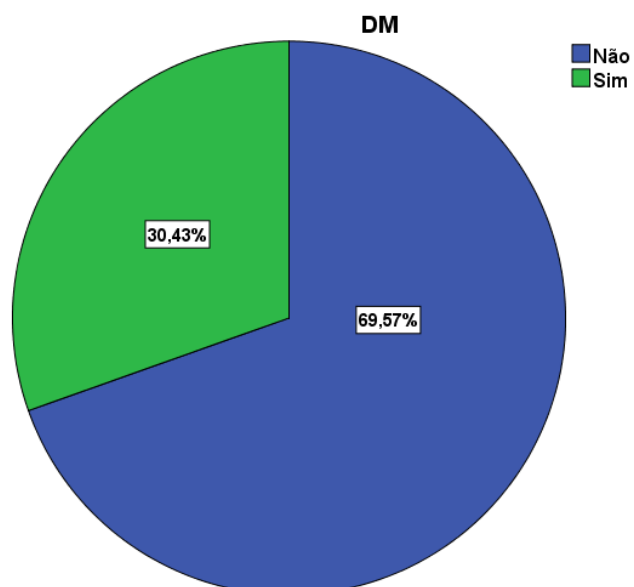
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 1 - Percentual da presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



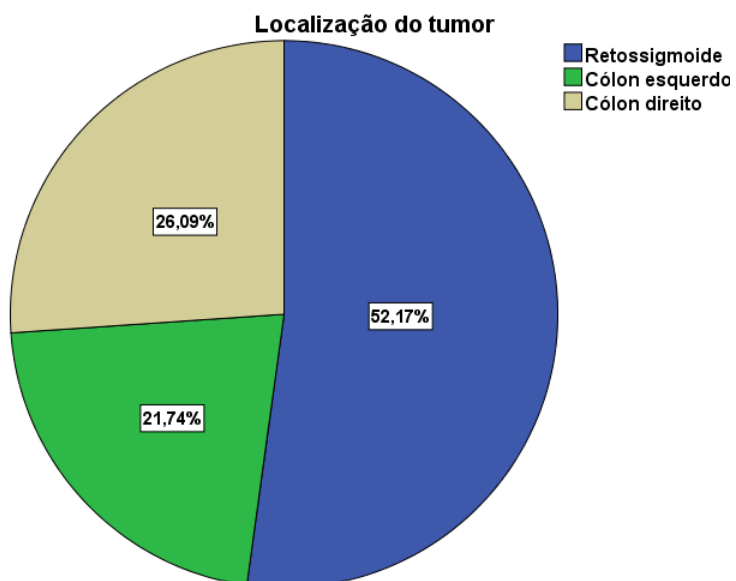
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 2 - Percentual da presença de diabetes mellitus (DM) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



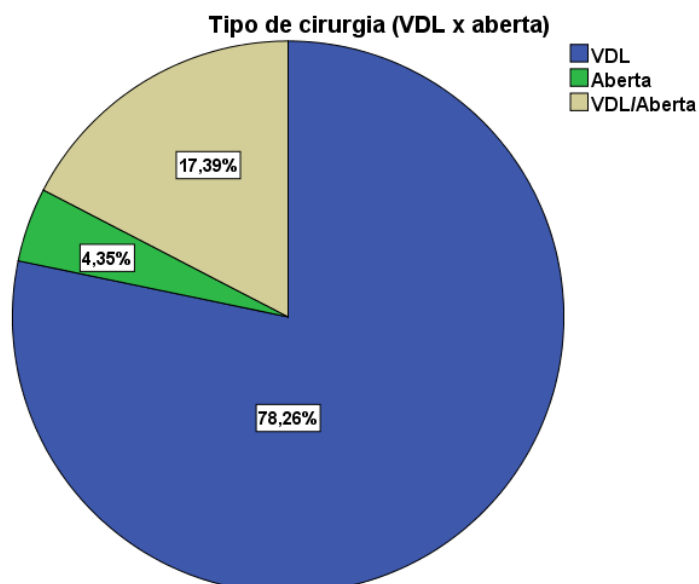
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 3 - Percentual da localização do tumor de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



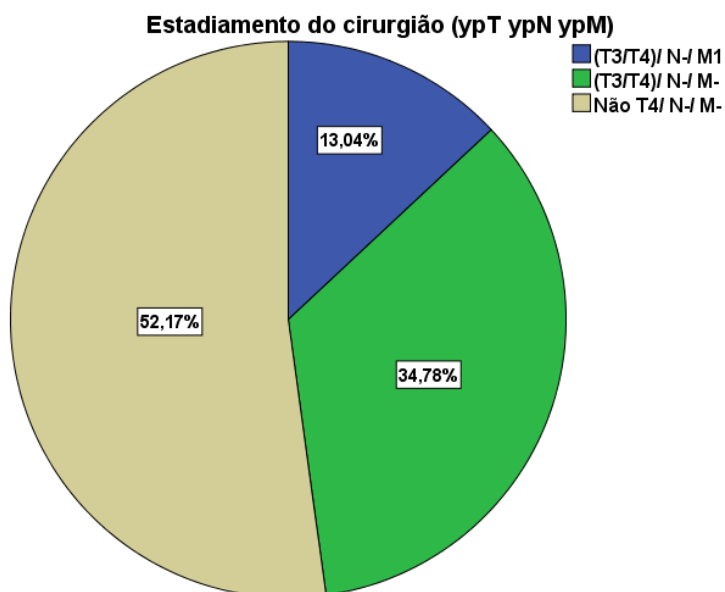
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 4 - Percentual do tipo de cirurgia em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



Fonte: elaboração própria.

Gráfico 5 - Percentual do estadiamento do cirurgião (TNM) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



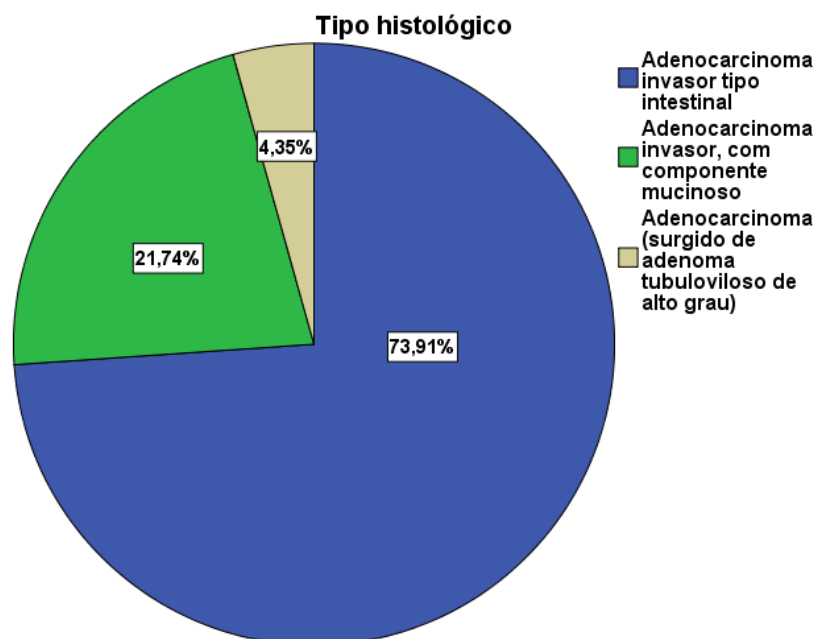
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 6 - Percentual de transfusão no intraoperatório em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



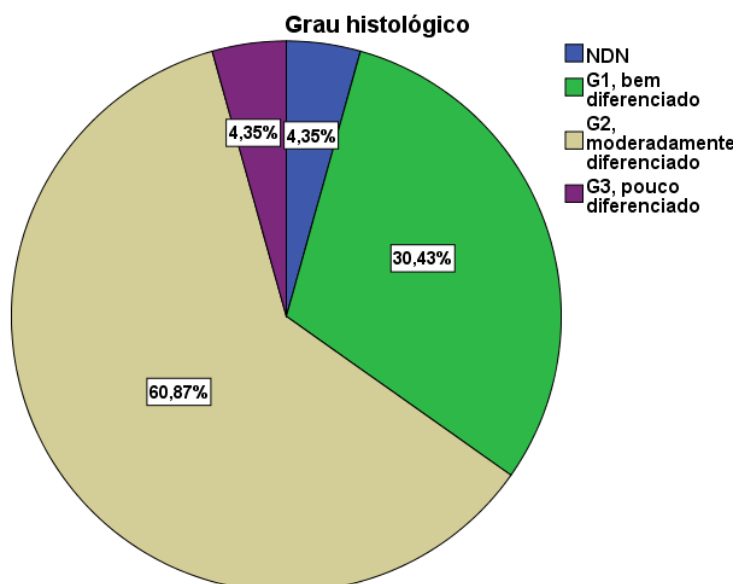
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 7 - Percentual do tipo histológico em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



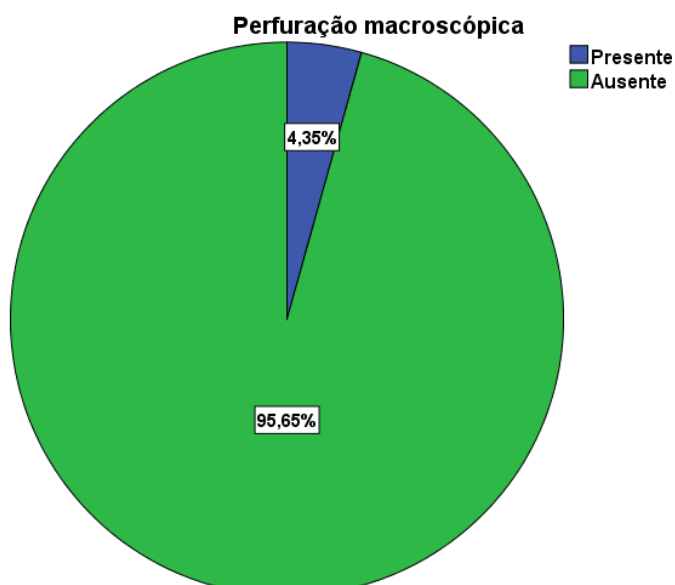
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 8 - Percentual do grau histológico em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



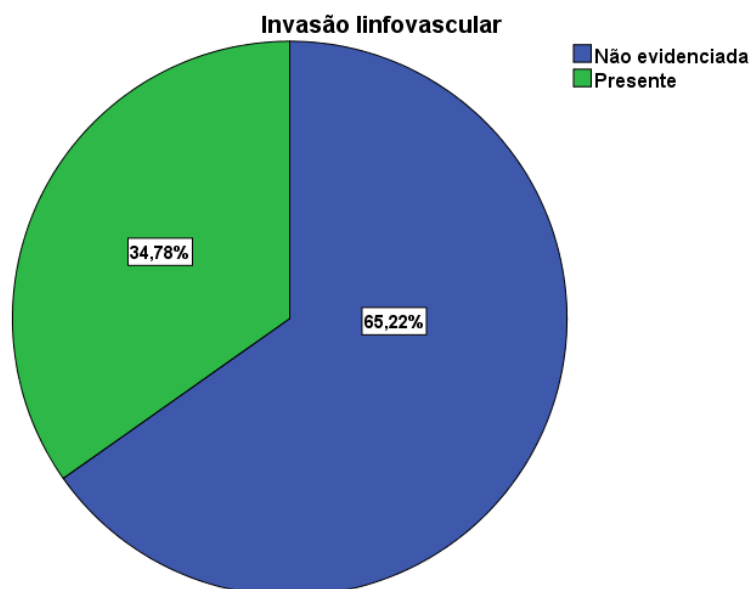
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 9 - Percentual de perfuração macroscópica em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



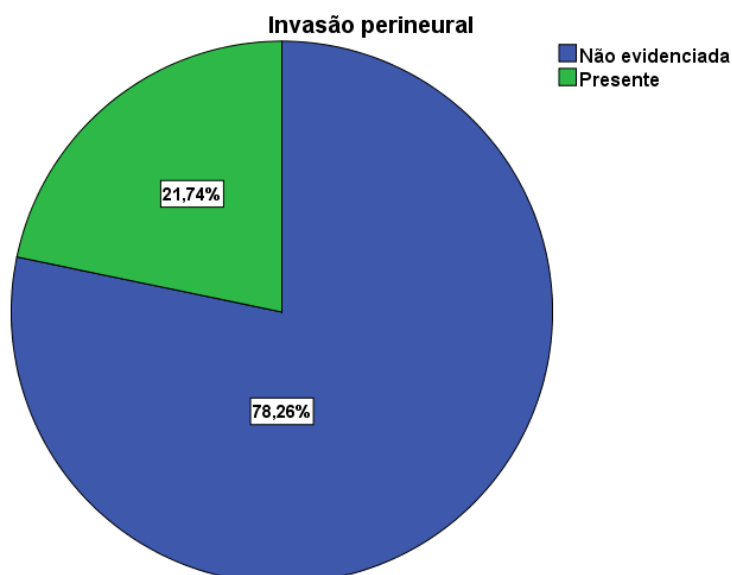
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 10 - Percentual de invasão linfovascular em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



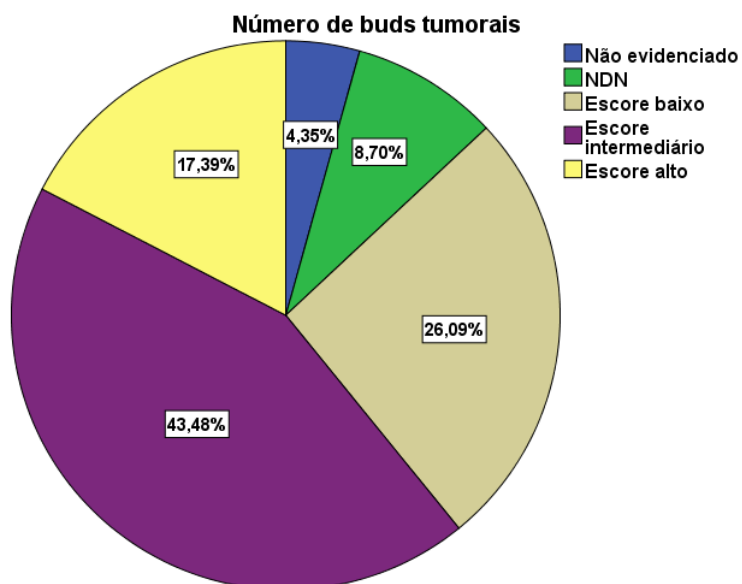
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 11 - Percentual de invasão perineural em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



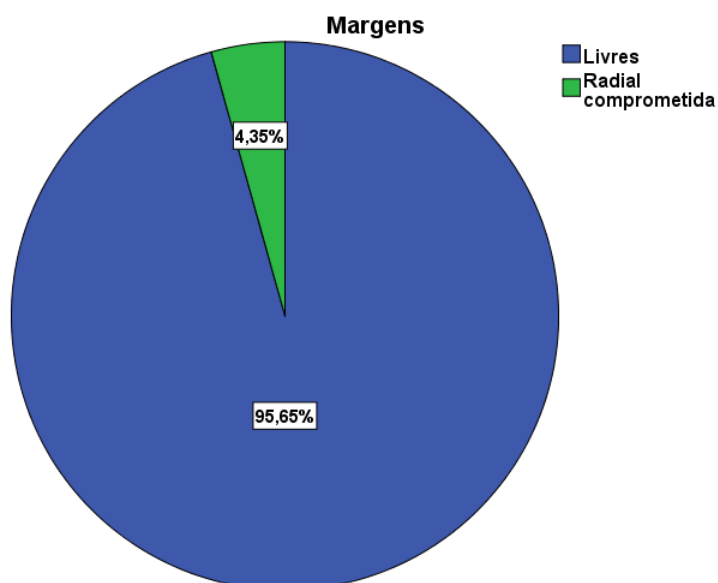
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 12 - Percentual do número de buds tumorais em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



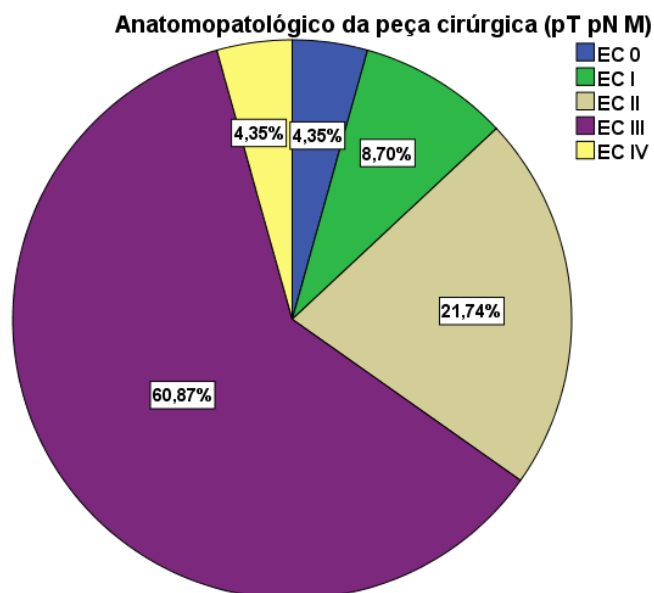
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 13 - Percentual de margens em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



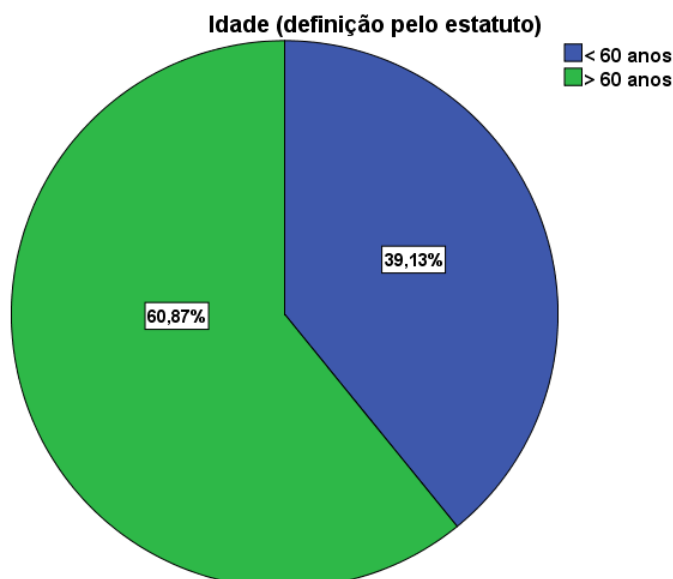
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 14 - Percentual do anatomopatológico da peça cirúrgica (pT pN M) de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



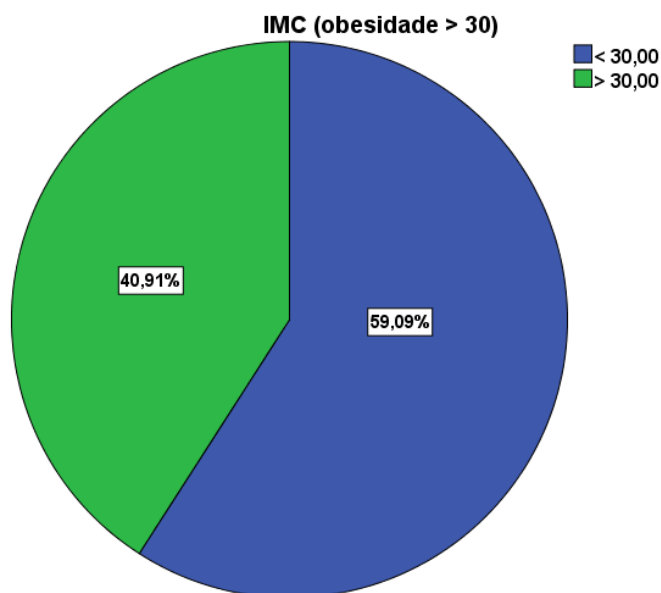
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 15 - Percentual da idade (definição pelo estatuto) de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



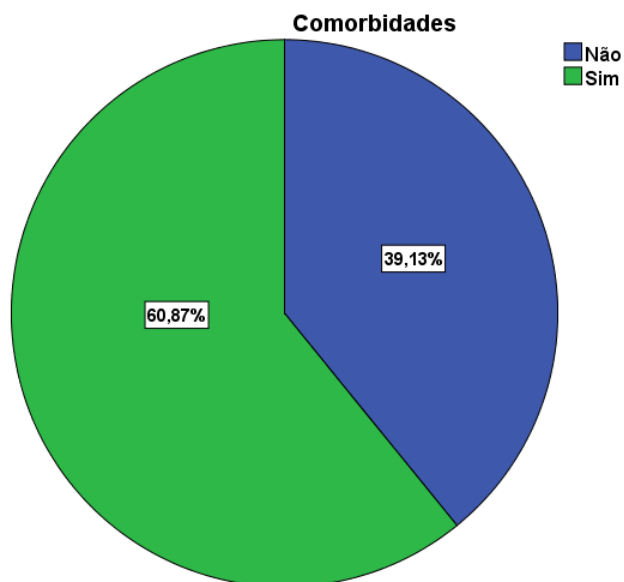
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 16 - Percentual do IMC (obesidade > 30) de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



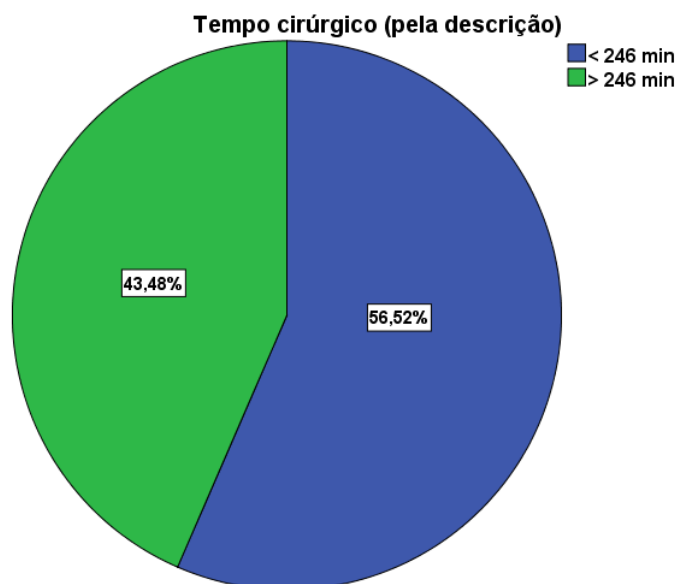
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 17 - Percentual da presença de comorbidades em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



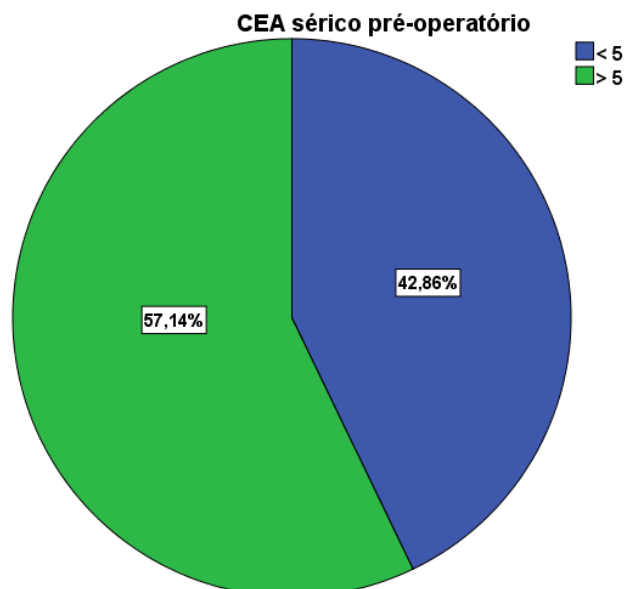
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 18 - Percentual do tempo cirúrgico (pela descrição) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



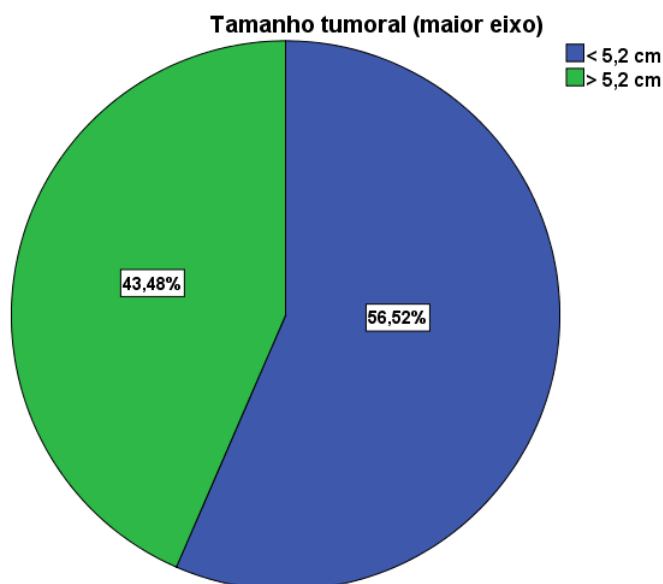
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 19 - Percentual do CEA sérico pré-operatório em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



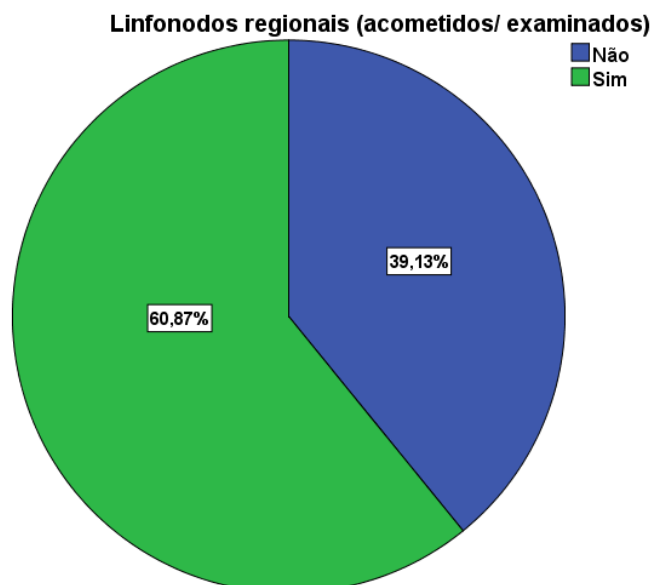
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 20 - Percentual do tamanho tumoral (maior eixo) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



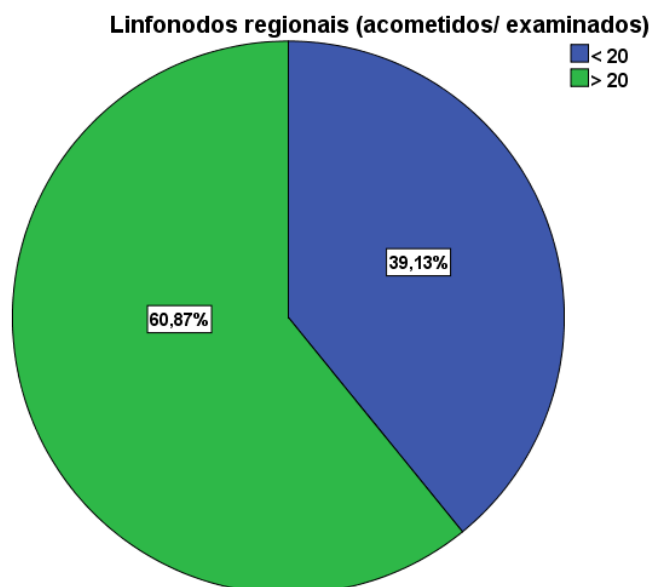
Fonte: elaboração própria.

Gráfico 21 - Percentual de linfonodos regionais (acometidos/ examinados) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília

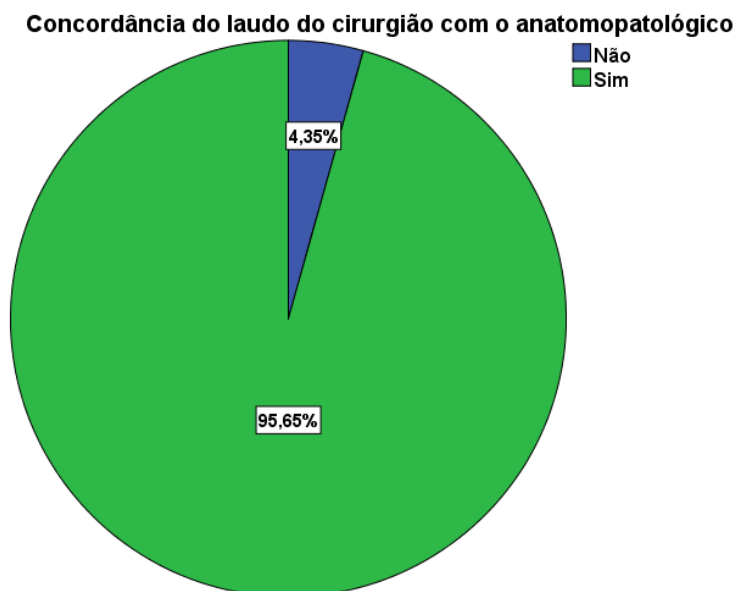


Fonte: elaboração própria.

Gráfico 22 - Percentual de linfonodos regionais (acometidos/ examinados) em pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília



Fonte: elaboração própria.



Fonte: elaboração própria.

Tabela 2 - Análise descritiva das variáveis clínicas sem categorização de pacientes operados com diagnóstico de tumor colorretal do departamento de coloproctologia do hospital universitário da Universidade de Brasília

		n	%
Observação	Cirurgia teve conversão	1	50,00
	Está na tabela com cólon ascendente	1	50,00
	Não se aplica	21	
Comorbidades	Ansiedade	1	7,14
	DM	1	7,14
	HAS	6	42,86
	HAS, DM	4	28,57
	HAS, DM, Arritmia, Doença vascular periférica	1	7,14
	HAS, DM, DLP	1	7,14
	Não se aplica	9	
Anatomopatológico da peça cirurgia (pT pN M)	pTisN0	1	4,35
	pT1N0	1	4,35
	ypT1N0	1	4,35
	pT2N0	1	4,35
	pT3N0	2	8,70
	pT4aN0	1	4,35
	pT2N1a	1	4,35
	pT2N1b	1	4,35
	pT2N2	1	4,35
	pT3N1	1	4,35
	pT3N1b	4	17,39
	pT3N2a	2	8,70
	ypT3N1b	1	4,35
	pT3N1c	1	4,35
	pT3N1aM1	1	4,35
	pT4aN1a	1	4,35
	pT4bN1a	1	4,35
	pT4N1b	1	4,35
	Extensão tumoral	Muscular própria	7
Muscular própria e tecido pericólico		2	8,70
Além da muscular própria, e atinge o tecido adiposo pericólico/retal (serosa)		1	4,35
Invade a muscular própria		1	4,35
Serosa		2	8,70
Serosa livre		1	4,35
Submucosa		2	8,70
Tecido adiposo pericólico		2	8,70
Infiltra o tecido adiposo pericólico		1	4,35
Tecido adiposo subserosa		1	4,35
Tecido fibroadiposo perirretal		1	4,35
Invasão íleo terminal		1	4,35
Peritônio viceral		1	4,35
Linfonodos regionais (acometidos/ (00/09)		1	4,35

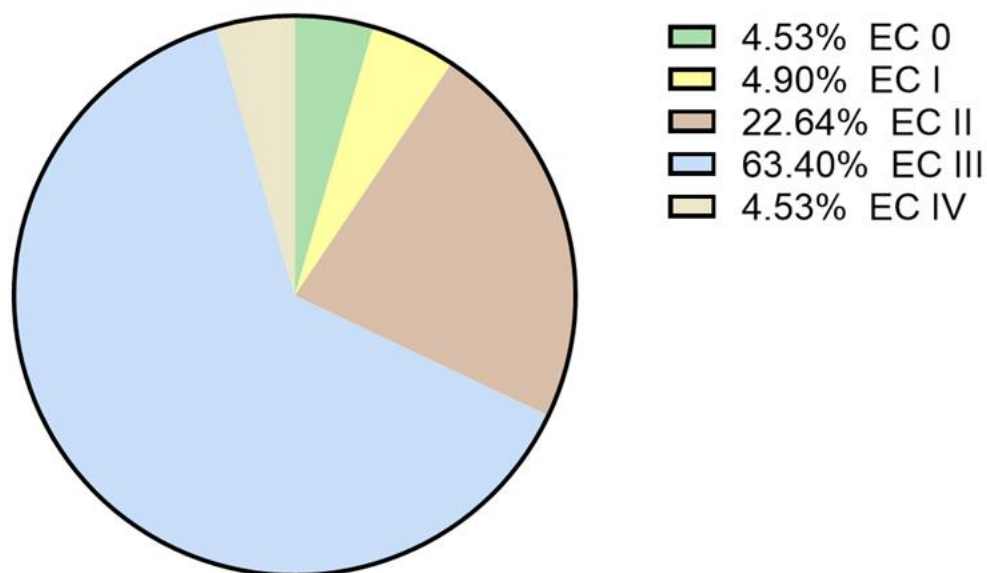
Continuação...

examinados)	(00/13)	1	4,35
	(00/16)	1	4,35
	(00/18)	1	4,35
	(00/23)	1	4,35
	(00/26)	1	4,35
	(00/34)	1	4,35
	(00/38)	1	4,35
	(00/56)	1	4,35
	(01/11)	1	4,35
	(01/21)	1	4,35
	(01/27)	1	4,35
	(01/32)	1	4,35
	(02/13)	2	8,70
	(02/25)	1	4,35
	(02/39)	1	4,35
	(02/41)	1	4,35
	(03/18)	1	4,35
	(03/24)	1	4,35
	(03/40)	1	4,35
	(04/55)	1	4,35
	(06/13)	1	4,35

Fonte: elaboração própria.

A distribuição percentual da histopatologia da peça cirúrgica dos pacientes operados no Serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário da Universidade de Brasília está ilustrada na figura 1.

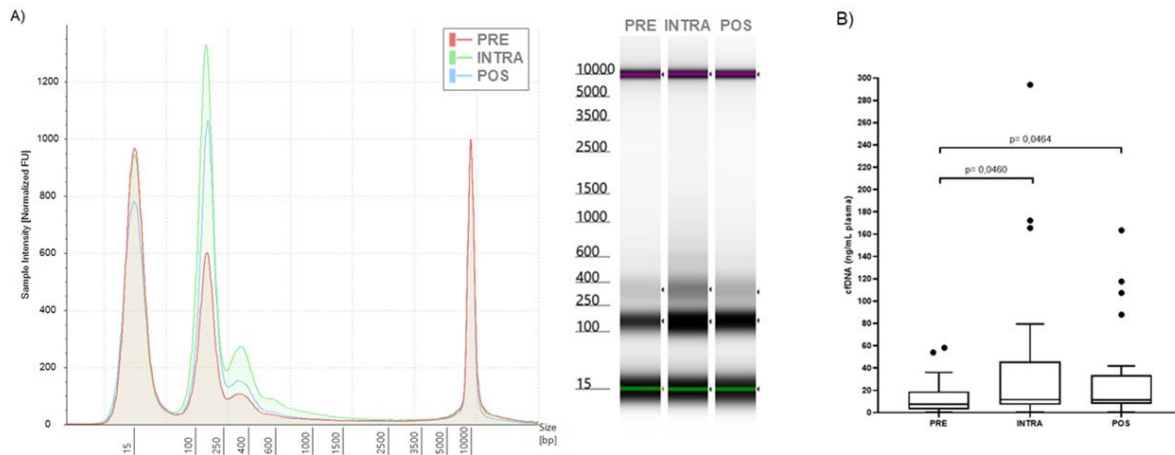
Figura 1. Percentual de anatomopatologia da peça cirúrgica (pT pN M) dos pacientes operados com diagnóstico de CCR no Serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário da Universidade de Brasília.



Liberação de cfDNA aumenta significativamente durante e após a cirurgia

Primeiramente, foram analisadas as concentrações de cfDNA extraído do plasma, uma vez que esses valores podem estar clinicamente relacionados à condição dos pacientes com CCR.

Figura 2. Comparação das concentrações de cfDNA. A) Exemplo de perfil de eletroferograma e corrida eletroforética. Sobreposição de pré-operatório, intraoperatório e pós-operatório. B) Representação gráfica das concentrações médias de cfDNA dos pacientes nos momentos pré-operatório (PRÉ), intraoperatório (INTRA) e pós-operatório (POS). O teste T de Student foi aplicado para PRÉ vs INTRA, INTRA vs POS, PRÉ vs POS. Os valores obtidos pelo teste estatístico foram plotados no mesmo gráfico.



Representação do perfil do eletroferograma e da corrida eletroforética do PRE, INTRA e POS, sobrepostos (Figura 2A). As concentrações médias de cfDNA foram medidas nos momentos pré-operatório (PRÉ), intraoperatório (INTRA) e pós-operatório (POS). A liberação intraoperatória de cfDNA foi 3,2 vezes maior ($p < 0,05$) em relação ao momento pré-operatório (figura 2B). A liberação de cfDNA no pós-operatório foi 2,3 vezes maior ($p < 0,05$) em relação ao momento pré-operatório (figura 2A). Nenhuma diferença significativa foi observada entre a liberação de cfDNA INTRA e POS (figura 2B).

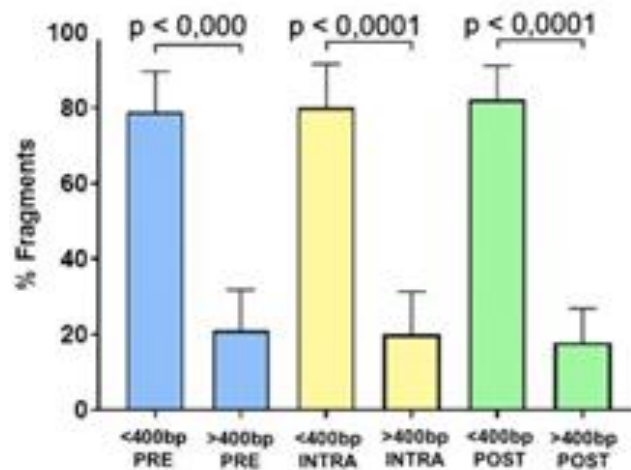
Fragmentos menores (<400pb) foram predominantes em todos os momentos

Em seguida, analisamos o tamanho dos fragmentos de cfDNA em diferentes momentos cirúrgicos. O tamanho do cfDNA é considerado menor que 400 pb, variando para cfDNA

derivado de células normais e tumorais, com pico predominante em 167 pb e 143 pb, respectivamente [13, 14, 15].

Analisando os fragmentos classificados em <400 pb e >400 bs, observamos que os fragmentos menores, atribuídos ao cfDNA, foram predominantes em todos os momentos; no entanto, o material genômico fragmentado também foi sempre recuperado (figura 3).

Figura 3: Análise do tamanho dos fragmentos de DNA.



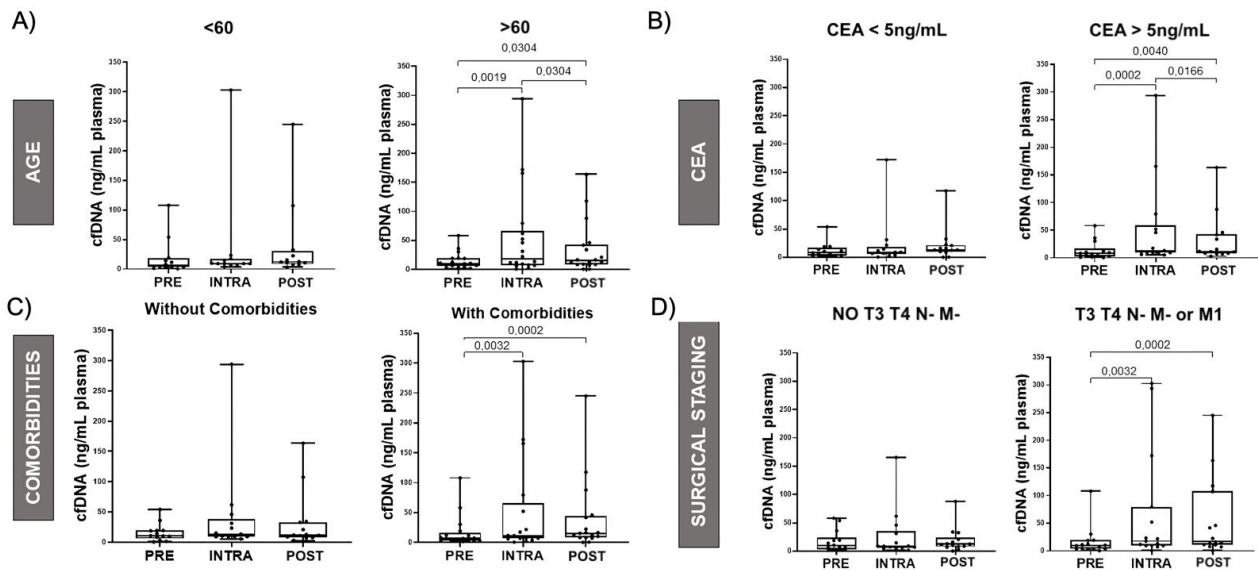
A concentração de cfDNA se correlaciona com a idade e comorbidades

Exploramos a relação entre variáveis clínicas e concentrações de cfDNA. Descobrimos que em pacientes com mais de 60 anos, a liberação de cfDNA durante a cirurgia aumentou 2,9 vezes no intraoperatório e permaneceu 1,3 vezes maior no pós-operatório em comparação ao pré-operatório (figura 4-A). Essa diferença não foi observada em pacientes com menos de 60 anos. Uma tendência semelhante foi observada em pacientes que tinham comorbidades. A liberação de cfDNA durante a cirurgia foi 3,0 vezes maior do que antes e 2,3 vezes maior no pós-operatório em comparação ao pré-operatório, conforme mostrado na figura 4-C ($p < 0,05$).

A concentração de cfDNA se correlaciona com o Antígeno Carcinoembrionário (CEA) e Estadiamento Cirúrgico

Em seguida, investigamos se os níveis de CEA dos pacientes ou o status do estadiamento do tumor se correlacionavam com a liberação de cfDNA durante a cirurgia. Observamos que em pacientes com CEA > 5 ng/mL, a liberação de cfDNA durante a cirurgia foi 3,1 vezes maior do que antes da cirurgia e 1,3 vezes maior do que após a cirurgia ($p < 0,01$), conforme mostrado na figura 4-B. Além disso, pacientes com tumores mais avançados (classificados como T3, T4, N-, M- ou M1) exibiram um aumento de 3,1 vezes na liberação de cfDNA durante a cirurgia em comparação com antes e depois da cirurgia, e um aumento de 2,4 vezes no período pós-operatório em comparação com o período pré-operatório ($p < 0,001$), conforme mostrado na Figura 4-D.

Figura 4 A) alteração na concentração do cf-DNA ao analisar a idade, durante o ato cirúrgico (intraoperatório e pós-operatório). B) ao analisar a marcador tumoral - CEA . C) ao analisar a presença de comorbidades. D) ao analisar o estadiamento clínico do cirurgião.

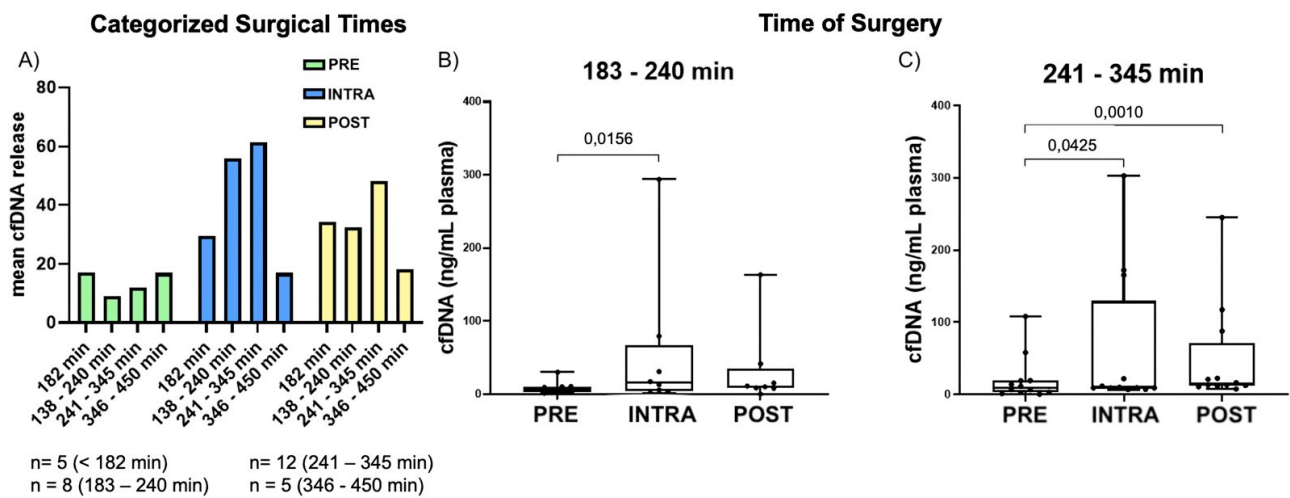


A concentração de cfDNA varia de acordo com o tempo da cirurgia e os parâmetros de gravidade da doença

Finalmente, analisamos a influência do tempo cirúrgico na liberação de cfDNA. Estratificamos os pacientes em quatro grupos de acordo com o tempo da cirurgia e comparamos a liberação de cfDNA em cada grupo, antes, durante e após a cirurgia

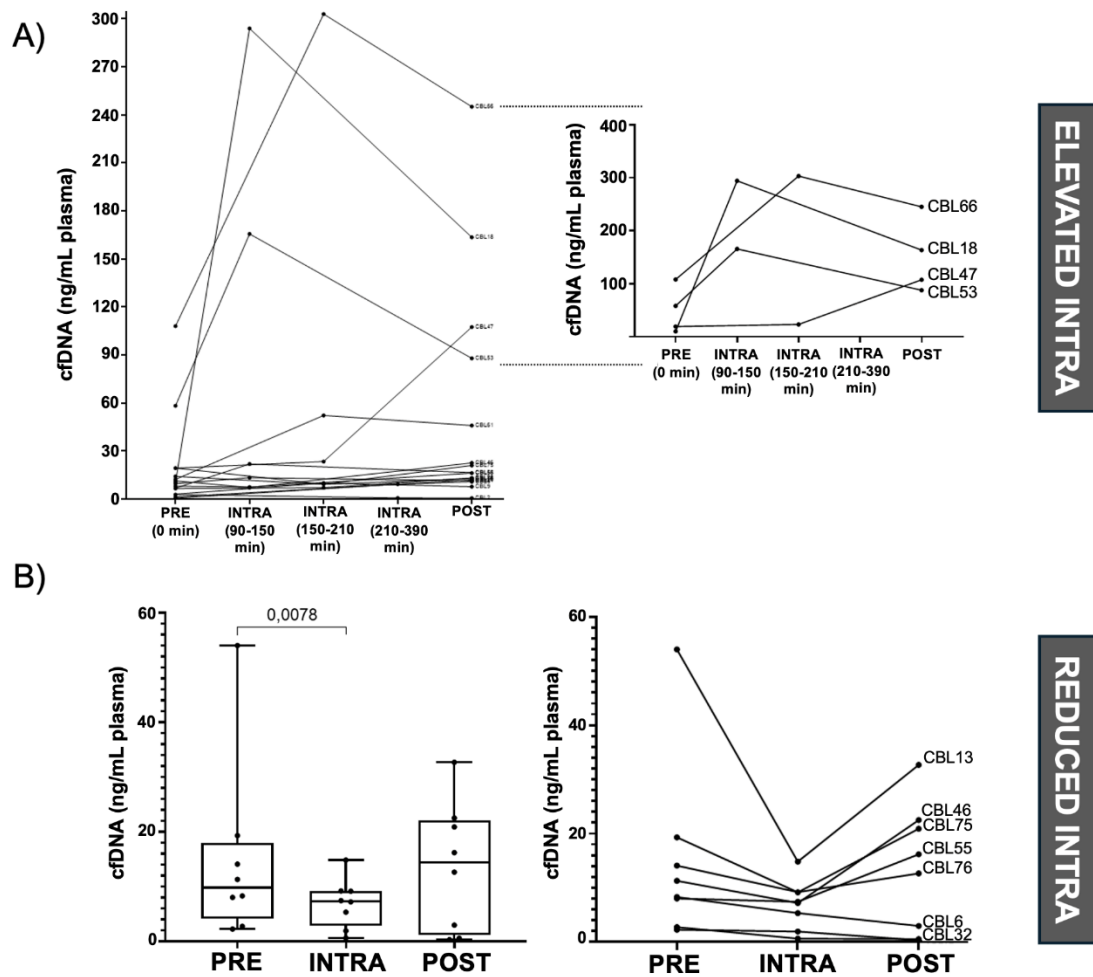
(figura 5-A). Observamos um aumento significativo na liberação de cfDNA durante cirurgias com duração de 183-240 minutos e 241-345 minutos, atingindo níveis 6,1 vezes e 5,1 vezes maiores, respectivamente (Figura 5-B, C).

Figura 5: A) Análise da concentração do cfDNA em comparação com o tempo cirúrgico, sendo estratificados em 4 grupos (< 182 min, 183 a 240 min, 241 a 345 min e 436 a 450 min). B) Representa a análise do cfDNA de cirurgia com duração entre 183 min a 240 min. C) Representa a análise do cfDNA de cirurgia com duração entre 241 min a 345 min.



Também comparamos as concentrações de cfDNA em amostras de sangue de 16 pacientes coletadas em diferentes pontos de tempo durante a cirurgia. Notavelmente, os três pacientes com tumores localmente avançados (destacados na Figura 6-A: CBL66, CBL18 e CBL47) exibiram os maiores níveis de liberação de cfDNA intraoperatoriamente. Em contraste, um grupo de pacientes com concentrações reduzidas de cfDNA durante a cirurgia consistiu predominantemente daqueles com casos menos graves, caracterizados por tumores em estágio inicial, níveis de CEA < 5 ng/ml e nenhuma evidência de invasão tecidual (Figura 6-B).

Figura 6 - Comparação das concentrações de cfDNA com o tempo de coleta de sangue ($n = 16$), análise das concentrações elevadas ($n = 4$) e reduzidas ($n = 8$) de cfDNA durante a cirurgia. A) Representação gráfica da liberação geral de cfDNA em cada tempo de coleta de sangue durante a cirurgia para cada paciente à esquerda. À direita, uma visão ampliada mostrando a liberação elevada de cfDNA para cada paciente. B) Representação gráfica da liberação de cfDNA em pacientes nos quais foi observada uma redução de cfDNA durante a cirurgia. À esquerda, gráfico geral. O teste de Friedman foi aplicado ($p = 0,0469$), seguido pelo teste de Wilcoxon para comparações entre PRE vs INTRA, INTRA vs POST e PRE vs POST. À direita, representação gráfica da liberação de cfDNA por paciente.



6 DISCUSSÃO

O cfDNA e também o ctDNA, a fração do cfDNA correspondente às células cancerígenas, podem ser analisados por biópsia líquida, uma técnica promissora quando se trata de diferentes tipos de câncer¹³. A detecção de cfDNA tornou-se fundamental para prever o desenvolvimento e progressão de tumores, com potencial para ser utilizado para diagnóstico, criação de estratégias de tratamento individualizadas, monitoramento de terapia e prognóstico¹⁴. Considerando a importância do uso do cfDNA e sua crescente utilidade na prática médica, é importante atentar para os fatores que caracterizam o perfil de liberação e a qualidade do material em diferentes momentos e em diferentes situações. Estudos demonstraram que diferentes fatores ambientais e fisiológicos podem influenciar o perfil de quantidade e distribuição de tamanho do cfDNA¹⁵.

Neste estudo, as concentrações de cfDNA foram analisadas nos três momentos. Observamos diferença estatística entre os momentos pré-operatório e intraoperatório, e pré-operatório e pós-operatório, o que pode ser atribuído à manipulação tecidual característica do processo cirúrgico. Observou-se um pico maior no intraoperatório, quando a manipulação tecidual é mais intensa, o que sugere que a liberação de cfDNA é maior neste momento.

A análise de fragmentos de DNA revelou uma diferença estatística nos tamanhos dos fragmentos em cada estágio cirúrgico. Enquanto os fragmentos característicos do cfDNA (<400 pb) eram predominantes, fragmentos maiores (>400 pb), potencialmente representando o DNA genômico, estavam presentes em todos os estágios.

Estudos sugeriram que a integridade e a fragmentação do cfDNA são características altamente variáveis e podem estar relacionadas à estrutura e ao estado funcional do genoma, alterado em pacientes com câncer^{15,16}. Foi relatado que os fragmentos menores são característicos de eventos de apoptose e necrose, enquanto os mais longos podem ter origem em diferentes mecanismos fisiológicos (hematológicos e bioquímicos), contribuindo para o aumento de cfDNA de origem não cancerosa, o que corrobora a hipótese sugerida neste estudo relacionando a presença de fragmentos >400pb à manipulação cirúrgica^{17,18}. Além disso, foi observado que amostras com ctDNA

indetectável podem apresentar perfis de cfDNA altamente fragmentados e que isso pode acontecer em amostras de pacientes que foram submetidos recentemente a cirurgia, sugerindo que as distribuições de tamanho de cfDNA podem ser enganosas em determinadas situações, o que reflete a importância de estudar as características do cfDNA durante diferentes momentos desde o diagnóstico¹⁹.

Além disso, foi observado pela primeira vez que a liberação de cfDNA durante a cirurgia pode variar em determinados grupos de pacientes, como em pacientes com mais de 60 anos, pacientes com comorbidades, pacientes com CEA > 5ng/mL e pacientes cujo tumor tenha sido categorizado pelo cirurgião como “T3 T4 N- M-” (localmente avançado).

Foi relatado que os níveis de cfDNA estão associados a diferentes condições de saúde, incluindo comorbidades e avanço da idade²⁰. Foi observado que a concentração de cfDNA está aumentada em idosos, assim como a ocorrência de alterações no padrão de metilação, sugerindo que esses parâmetros podem ser considerados preditivos de envelhecimento²¹. Curiosamente, verificamos que a liberação de cfDNA no momento intraoperatório foi maior em pacientes com mais de 60 anos, bem como em pacientes com comorbidades; é importante ressaltar que a maioria dos pacientes idosos apresentava comorbidades conforme prontuário.

Além disso, o CEA é um marcador tumoral recomendado em pacientes com CCR. Foi relatado que o CEA geralmente normaliza após a cirurgia, mesmo em pacientes com CEA elevado no momento pré-operatório. Entretanto, níveis elevados (>5ng/ml) no pós-operatório estão associados a um prognóstico desfavorável, correlacionando-se com metástases e recorrências²². Neste estudo, notou-se que em pacientes com CEA pré-operatório > 5ng/mL houve maior liberação de cfDNA no momento intraoperatório, quando comparados aos pacientes com CEA pré-operatório < 5ng/mL (figura 6-A).

Além disso, em pacientes com tumores localmente avançados (T3 T4 N- M-), a liberação de cfDNA no momento intraoperatório também foi maior em comparação aos pacientes em estágios mais precoces (Não T3 T4 N- M-), sendo que a maioria desses pacientes (T3 T4 N- M-) apresentavam CEA elevado. Esses resultados possivelmente podem ser atribuídos à manipulação cirúrgica mais intensa devido à extensão do tumor, que pode causar mais danos ao tecido e, conseqüentemente, maior liberação de cfDNA.

Neste estudo é um dos pioneiros a relatar a dinâmica da liberação de cfDNA durante cirurgia em pacientes com CCR.

Em resumo, este é o primeiro estudo a relatar a dinâmica da liberação de cfDNA durante a cirurgia em pacientes com CCR. Nossos resultados demonstram um aumento significativo na liberação de cfDNA durante e após a cirurgia, com fragmentos de cfDNA característicos (<400 bp) sendo predominantes em todos os estágios cirúrgicos, juntamente com fragmentos genômicos (>400 bp). A liberação intraoperatória de cfDNA foi especialmente notável em pacientes com mais de 60 anos, aqueles com comorbidades, níveis de CEA > 5 ng/mL, tumores localmente avançados, metástases (T3, T4, N-, M- ou M1) ou características que indicam invasão tecidual. Por outro lado, pacientes com doença em estágio inicial e um prognóstico favorável frequentemente apresentaram liberação reduzida de cfDNA durante a cirurgia, enquanto aqueles com doença avançada apresentaram níveis mais altos de cfDNA e resultados piores. Embora este estudo tenha fornecido informações significativas sobre a dinâmica da liberação de cfDNA durante procedimentos cirúrgicos, há algumas limitações a serem consideradas. Elas incluem o tamanho relativamente pequeno da amostra, potenciais vieses na recuperação da amostra e considerações sobre o tamanho do fragmento.

7 CONCLUSÃO

Em nosso estudo evidenciamos de forma inédita que a concentração e fragmentação do cfDNA, quando correlacionadas com as variáveis clínicas. Ficou evidente um aumento significativo no cfDNA liberado durante e após a cirurgia (3,2 e 2,3 vezes maior, respectivamente, $p < 0,05$). Descobrimos também, que a concentração de cfDNA aumenta no intraoperatório em pacientes com mais de 60 anos de idade, pacientes com comorbidades, pacientes com níveis de CEA > 5 ng/mL e pacientes com tumores localmente avançados (T3, T4, N-, M-). Assim, os resultados sugerem que, além da idade fisiológica e comorbidades, a manipulação cirúrgica intensa decorrente da extensão do tumor pode resultar em maior dano tecidual e maior liberação de cfDNA.

REFERÊNCIAS

- 1 BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 2 MORGAN, E. *et al.* Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *GUT*, v. 72, n. 2, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327736>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 3 MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS); INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 4 Mahmoud NN. Colorectal Cancer: Preoperative Evaluation and Staging. *Surg Oncol Clin N Am.* 2022 Apr;31(2):127-141. doi: 10.1016/j.soc.2021.12.001. Epub 2022 Mar 9. PMID: 35351269.
- 5 NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (NCCN). NCCN Clinical practice guidelines in oncology. Pennsylvania: NCCN, 2020. Disponível em: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf. Acesso em: 30 maio 2024.
- 6 Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018 Aug;18(8):775-784. doi: 10.1080/14737140.2018.1489246. PMID: 29923435; PMCID: PMC7652033.
- 7 WILLE-JORGENSEN, P. *et al.* Effect of more vs less frequent follow-up testing on overall and colorectal cancer-specific mortality in patients with stage II or III colorectal cancer: The COLOFOL randomized clinical trial. *JAMA*, v. 319, n. 20, p. 2095-2103, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.5623>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 8 Zhiwei Wu, Lijiang Yu, Juan Hou, Lihua Cui, Yufeng Huang, Qing Chen, Yan Sun, Wangkun Lu, Chenggong Zhang, Di Sun. Plasma cfDNA for the Diagnosis and Prognosis of Colorectal Cancer. *Journal of Oncology.* 2022; vol. 2022. DOI: 10.1155/2022/9538384
- 9 VALADÃO, M. *et al.* Tratado de cirurgia oncológica gastrointestinal. Rio de Janeiro: DOC, 2021.
- 10 RYUK, J. P. *et al.* Predictive factors and the prognosis of recurrence of colorectal cancer within 2 years after curative resection. *Annals of surgical treatment and*

- research, v. 86, n. 3, p. 143-151, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4174/astr.2014.86.3.143>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 11 RENEHAN, A. G. *et al.* Impact on survival of intensive follow up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ (Clinical research ed)*, v. 324, n. 7341, p. 813, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.324.7341.813>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 12 DESCH, C. E. *et al.* Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *Journal of clinical oncology*, v. 23, n. 33, p. 8512-8519, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1200/jco.2005.04.0063>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 13 AMIN, M. B. *et al.* *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York: Springer, 2017. Cisneros-Villanueva M, Hidalgo-Pérez L, Rios-Romero M, et al. Cell-free DNA analysis in current cancer clinical trials: a review. *Br J Cancer*. 2022;126(3):391–400. doi: 10.1038/s41416-021-01696-0
- 14 Cisneros-Villanueva M, Hidalgo-Pérez L, Rios-Romero M, et al. Cell-free DNA analysis in current cancer clinical trials: a review. *Br J Cancer*. 2022;126(3):391–400. doi: 10.1038/s41416-021-01696-0
- 15 Crigna AT, Samec M, Koklesova L, et al. Cell-free nucleic acid patterns in disease prediction and monitoring-hype or hope?. *EPMA J*. 2020;11(4):603–627. doi: 10.1007/s13167-020-00226-x
- 16 Pu W, Xiao L, Zhou C, et al. Cancer stage-dependent alterations in cell-free DNA in patients with colorectal cancer. *J BUON*. 2021;26(1):109–115.
- 17 Koval AP, Khromova AS, Blagodatskikh KA, et al. Application of PCR-based approaches for evaluation of cell-free DNA fragmentation in colorectal cancer. *Front Mol Biosci*. 2023;10:1101179. doi: 10.3389/fmolb.2023.1101179
- 18 Pittella-Silva F, Chin YM, Chan HT, et al. Plasma or Serum: Which Is Preferable for Mutation Detection in Liquid Biopsy?. *Clin Chem*. 2020;66(7):946–957. doi: 10.1093/clinchem/hvaa103
- 19 Bao H, Wang Z, Ma X, et al. Letter to the Editor: An ultra-sensitive assay using cell-free DNA fragmentomics for multi-cancer early detection. *Mol Cancer*. 2022;21(1):129. doi: 10.1186/s12943-022-01594-w
- 20 Alcaide M, Cheung M, Hillman J, et al. Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR. *Sci Rep*. 2020;10(1):12564. doi: 10.1038/s41598-020-69432-x
- 21 Kananen L, Hurme M, Bürkle A, Moreno-Villanueva M, Bernhardt J, Debacq-Chainiaux F, Grubeck-Loebenstein B, Malavolta M, Basso A, Piacenza F, Collino S, Gonos ES, Sikora E, Gradinaru D, Jansen EHJM, Dollé MET, Salmon M, Stuetz W, Weber D,

- Grune T, ... Jylhävä J. Circulating cell-free DNA in health and disease - the relationship to health behaviours, ageing phenotypes and metabolomics. *GeroScience*. 2023;45(1):85–103. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00590-8>.
- 22 Li SJ, Gao X, Wang ZH, Li J, Zeng LT, Dang YM, ... Cai JP. Cell-free DNA methylation patterns in aging and their association with inflamm-aging. *Epigenomics*. 2024:1–17. <https://doi.org/10.1080/17501911.2024.2340958>.
- 23 Konishi T, Shimada Y, Hsu M, et al. Association of Preoperative and Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen and Colon Cancer Outcome. *JAMA Oncol*. 2018;4(3):309–315. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.4420
- 24LEBOFSKY, R. *et al*. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Molecular oncology*, v. 9, n. 4, p. 783-790, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.12.003>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 25TIE, J. *et al*. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study. *GUT*, v. 68, n. 4, p. 663-671, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315852>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 26HASHIGUCHI, Y. *et al*. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2019 for the treatment of colorectal cancer. *Int. International Journal of Clinical Oncology*, v. 25, n. 1, p. 1-42, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01485-z>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 27PITTELLA-SILVA, F. *et al*. Plasma or serum: which is preferable for mutation detection in liquid biopsy? *Clinical chemistry*, v. 66, n. 7, p. 946-957, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa103>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 28PU, W. *et al*. Cancer stage-dependent alterations in cell-free DNA in patients with colorectal cancer. *J BUON*, v. 26, n. 1, p. 109-115, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33721440/>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 29BARROSO, W. K. S., *et al*. Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial – 2020. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 116, n. 3, p. 516-658, 2021. DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20201238>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 30WEIR, C. B.; JAN, A. BMI classification percentile and cut off points. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- 31YAHAGI, M. *et al*. The worse prognosis of right-sided compared with left-sided colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J. Gastrointest. Surg.*, v. 20, n. 3, p. 648-655, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11605-015-3026-6>. Acesso em: 30 maio 2024.

- 32LIM, D. R. *et al.* Comparison of oncological outcomes of right-sided colon cancer versus left-sided colon cancer after curative resection: Which side is better outcome? *Medicine*, Baltimore, v. 96, n. 42, e8241, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1097/md.00000000000008241>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 33UGAI, T. *et al.* Prognostic role of detailed colorectal location and tumor molecular features: analyses of 13,101 colorectal cancer patients including 2994 early-onset cases. *J Gastroenterol.*, v. 58, n. 3, p. 229-245, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00535-023-01955-2>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 34GHOLAMALIZADEH, H. *et al.* Prognostic value of primary tumor location in colorectal cancer: an updated meta-analysis. *Clin. Exp. Med.*, v. 23, n. 8, p. 4369-4383, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10238-023-01120-2>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 35HANSEN, I. O.; JESS, P. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer – a systematic review. *Dan Med J.*, v. 59, n. 6, A4444, 2012. Disponível em: <https://ugeskriftet.dk/dmj/possible-better-long-term-survival-left-versus-right-sided-colon-cancer-systematic-review>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 36MLAMBO, B. *et al.* The impact of operative approach on postoperative outcomes and healthcare utilization after colectomy. *Surgery, United States*, v. 171, n. 2, p. 320–327, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2021.07.011>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 37VASUDEVAN, V. *et al.* Robotic colorectal surgery: shorter operative times, low conversion rates, and excellent oncologic yield – a single-surgeon retrospective cohort study at a high-volume community center. *SAGES*, [20 aug. 2014]. Disponível em: <https://www.sages.org/meetings/annual-meeting/abstracts-archive/robotic-colorectal-surgery-shorter-operative-times-low-conversion-rates-and-excellent-oncologic-yield-a-single-surgeon-retrospective-cohort-study-at-a-high-volume-community-center/>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 38DIXON, F. *et al.* Major colorectal resection is feasible using a new robotic surgical platform: the first report of a case series. *Tech Coloproctol.*, v. 25, n. 3, p. 285–289, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10151-020-02366-8>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 39SOLIS-PAZMINO, P. *et al.* Robotic right versus left colectomy for colorectal neoplasia: a systemic review and meta-analysis. *J Robot Surg.*, v. 17, n. 5, p. 1907-1915, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11701-023-01649-0>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 40WILSON, M. J. *et al.* Patient blood management in colorectal cancer patients: a survey among Dutch gastroenterologists, surgeons, and anesthesiologists. *Transfusion*, v. 58, n. 10, p. 2345–2351, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/trf.14807>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 41ACHESON, A. G.; BROOKES, M. J.; SPAHN, D. R. Effects of allogeneic red blood cell transfusions on clinical outcomes in patients undergoing colorectal cancer surgery: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Surgery*, v. 256, n. 2, p. 235–244, 2012. DOI: <http://doi.org/10.1097/SLA.0b013e31825b35d5>. Acesso em: 30 maio 2024.

- 42EUNUS, M. F. *et al.* Clinicopathological characteristics of mucinous and non-mucinous adenocarcinoma of the colon and rectum. *Mymensingh Med J.*, v. 32, n. 2, p. 480-486, 2023.
- 43BOSMAN, F. T. *et al.* WHO classification of tumors of the digestive system. 4. ed. Geneva: World Health Organization Classification of Tumors, 2010.
- 44ZHAO, X. *et al.* The potential use of dynamics changes of ctDNA and cfDNA in the perioperative period to predict the recurrence risk in early NSCLC. *Frontiers in Oncology*, v. 11, p. 671963, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.671963>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 45TAN, E. *et al.* Diagnostic precision of carcinoembryonic antigen in the detection of recurrence of colorectal cancer. *Surgical Oncology*, v. 18, n. 1, p. 15-24, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2008.05.008>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 46SU, B-B.; SHI, H.; WAN, J. Role of serum carcinoembryonic antigen in the detection of colorectal cancer before and after surgical resection. *World J Gastroenterol.*, v. 18, n. 17, p. 2121-2126, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v18.i17.2121>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 47TAKAGAWA, R. *et al.* Preoperative serum carcinoembryonic antigen level as a predictive factor of recurrence after curative resection of colorectal cancer. *Ana Surg Oncol.*, v. 15, n. 12, p. 3433-3439, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1245/s10434-008-0168-8>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 48DAI, X. *et al.* Development and validation of a nomogram to predict overall survival in stage I–III colorectal cancer patients after radical resection with normal preoperative serum carcinoembryonic antigen. **Cancers**, v. 15, n. 23, p. 5643, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers15235643>. Acesso em: 30 maio 2024.
- 49UDAGAWA, S. *et al.* Clinical utility of the carcinoembryonic antigen level in patients with stage III colon cancer after surgery and adjuvant chemotherapy. *Surgery Today*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00595-023-02779-6>. Acesso em: 30 maio 2024.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) sr(a). está sendo convidado(a), através deste documento fornecido em duas vias, a participar de um projeto de pesquisa denominado “**Avaliação da biópsia líquida na prática clínica para o manejo de pacientes com câncer colorretal**”.

Os pesquisadores da Universidade de Brasília estão desenvolvendo este projeto colaborativo, sob a coordenação do Prof. Dr. Fábio Pittella Silva, para estudos de viabilidade de detecção de DNA de origem tumoral na circulação sanguínea como novos biomarcadores para o câncer colorretal. Um dos benefícios desse projeto de pesquisa é fornecer bases para o desenvolvimento de estratégias mais precisas para o monitoramento e controle da doença.

Caso o(a) sr(a). aceite participar, o pesquisador poderá esclarecer quaisquer dúvidas que tiver a respeito do projeto e deste termo de consentimento.

O procedimento para o estudo será o seguinte:

- O(A) senhor(a) será convidado a responder um questionário referente ao histórico da doença, compondo dados que farão parte do prontuário médico. Ao serem coletadas amostras de sangue para o exame de rotina ao diagnóstico, serão colhidos outros 2 tubos (10ml) de sangue para as análises relativas a este projeto.

- O(A) senhor(a) está ciente de que há uma suspeita de acometimento com uma doença chamada câncer, que requer tratamento e acompanhamento médico. Uma das maneiras pelas quais se pode confirmar ou excluir tal suspeita é através de amostra(s) de biópsia(s), ou seja, retirada de pequeno(s) fragmento(s) do tecido do órgão afetado. Esse(s) fragmento(s) será(ão) examinado(s) por um(a) médico(a)-patologista treinado(a), que poderá utilizar técnicas modernas apropriadas (como a imunohistoquímica) para o diagnóstico e posteriormente, emitirá um laudo. No caso de tratamento cirúrgico, amostras de sangue e do tecido poderão ser examinados também pelo(a) patologista. O material coletado para diagnóstico ou removido cirurgicamente, será utilizado para as análises clínicas necessárias, sendo uma pequena quantidade do mesmo utilizada para o projeto de pesquisa. Não haverá qualquer custo para a realização dos exames relacionados ao tratamento, ou para o tratamento em si, mesmo que cirúrgico.

- Durante as visitas ao hospital para o seguimento médico de rotina nos meses subsequentes, serão colhidos outros 2 tubos (10ml) de sangue nos seguintes momentos: (1) após o final do tratamento inicial ou após a cirurgia conforme determinado pelo médico oncologista; (2) durante as visitas semestrais para realização de exames sangue e de imagens.

Nenhum nome ou endereço será associado com as amostras coletadas, tornando sua participação confidencial. O tratamento bem como as análises clínicas não acarretarão em ônus financeiro para o(a) sr(a) e/ou sua família.

- Os dados e registros relacionados a este projeto serão mantidos na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e no Hospital Universitário de Brasília e somente os pesquisadores

diretamente relacionados ao projeto terão acesso aos mesmos. Os resultados também serão publicados em revistas científicas e de interesse médico, sempre mantendo-se o seu anonimato.

A participação neste projeto é voluntária, portanto, o(a) sr(a). tem toda a liberdade de decidir se deseja participar ou não deste projeto. Poderá recusar-se a participar ou descontinuar a sua participação a qualquer momento, ou ainda recusar-se a fornecer qualquer informação (mesmo participando do estudo), tudo sem penalidades ou perda de benefícios a que tenha direito.

Li e entendi este TERMO. Autorizo a utilização dos dados do meu prontuário médico pelos pesquisadores do projeto. Durante a entrevista, eu me senti esclarecido quanto aos objetivos do trabalho de pesquisa. Estou ciente de que a participação no projeto é voluntária e não acarreta ônus para mim e/ou minha família. Sei ainda que em qualquer momento, posso pedir maiores esclarecimentos ao pesquisador responsável, bem como cancelar a participação sem que isso traga prejuízo a mim.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura do(a) paciente ou Responsável Legal

data: _____

Assinatura do profissional responsável pela coleta

data: _____

Assinatura do coordenador do projeto de pesquisa
Prof. Dr. Fábio Pittella Silva – UNB

data: _____

Telefones para contatos:

Comitê de Ética em Pesquisa, Faculdade de Ciências da Saúde, UnB (CEP/FS) – Tel: (61) 31071947
Prof. Dr. Fábio Pittella Silva – Tel: (61) 31071998

ANEXO B – Artigo Submetido periódico Oncotarget

Oncotarget

[MANUSCRIPT HOME](#)
[AUTHOR INSTRUCTIONS](#)
[CITATION FORMATTING](#)
[LOGOUT](#)
[JOURNAL HOME](#)

Manuscript #	049490
Current Revision #	0
Submission Date	2024-06-02 00:38
Current Stage	Initial QC
Title	Evaluation of cfDNA Release Dynamics During Surgery in Colorectal Cancer Patients
Manuscript Type	Research Paper
Corresponding Author	Fabio Pittella Silva (University of Brasilia)
Contributing Authors	Mailson Alves Lopes , Maria Elvira Ribeiro Cordeiro , Flávio de Alencar Teles Barreto , Lara de Souza Moreno , Mariana de Loyola , André Araújo de Medeiros Silva , Mayra Veloso Ayrimoraes Soares , Joao Batista de Sousa
Abstract	<p>Approximately two-thirds of patients with colorectal cancer (CRC) undergo resection with curative intent; however, 30% to 50% of these patients experience recurrence. The concentration of cell-free DNA (cfDNA) before and after surgery may be related to the prognosis of patients with CRC, but there is limited information regarding cfDNA levels at the time of surgery. Here, we analyzed surgical cfDNA release using plasma samples from 23 colorectal cancer patients at three key points during surgery: preoperative (immediately before surgery), intraoperative (during surgery), and postoperative (at the end of surgery). Automated electrophoresis was used to analyze cfDNA concentrations and fragment sizes, which were then correlated with clinical variables. Our findings indicate a significant increase in cfDNA release during and after surgery (3.2 and 2.3 folds higher respectively, $p < 0.05$). Characteristic fragments of cfDNA (<400 bp) predominated at all surgical stages; however, the release of genomic material (>400 bp) was also observed. Additionally, we found that cfDNA concentration increases intraoperatively in patients over 60 years old (4.1 times higher intraoperatively than preoperatively and 1.75 times higher than postoperatively, $p < 0.05$), in patients with comorbidities (3.1 folds higher, $p < 0.05$), in patients with CEA levels >5 ng/mL (3.8 folds higher, $p < 0.05$), and in patients with locally advanced tumors (5.2 folds higher, $p < 0.05$). Taken together, our results suggest that in addition to physiological age and comorbidities, intense surgical manipulation from the tumor's extent, may result in greater tissue damage and higher cfDNA release.</p>
Keywords	colorectal cancer, cfDNA, surgery
Subject Areas	cancer
Conflict of Interest	No , there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.
Manuscript Invitation	No
Manuscript Items	<ol style="list-style-type: none"> 1. Author Cover Letter PDF (242KB) Source File (DOCX) 15KB 2. Merged File containing manuscript text and 6 Figure files. PDF (1121KB) <ol style="list-style-type: none"> a. Article File PDF (491KB) Source File (DOCX) 44KB b. Figure1 PDF (52KB) Source File (PNG) 55KB c. Figure2 PDF (135KB) Source File (PNG) 143KB d. Figure3 PDF (132KB) Source File (PNG) 140KB e. Figure4 PDF (92KB) Source File (PNG) 100KB f. Figure6 PDF (104KB) Source File (PNG) 108KB g. Figure5 PDF (135KB) Source File (PNG) 137KB

More Manuscript Info and Tools

[Send Manuscript Correspondence](#)
[Check Status](#)
[MANUSCRIPT HOME](#)
[AUTHOR INSTRUCTIONS](#)
[CITATION FORMATTING](#)
[REVIEWER INSTRUCTIONS](#)
[LOGOUT](#)


Licensed under Patent #US 7,620,555B1