
**Monitoramento do Câncer de Próstata Através
da co-marcação de Granulócitos e Leucócitos
com o Aptâmero A4 e os Anticorpos
Anti-EpCAM e Anti-CD45**

Matheus Nister Moreira Reis



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Uberlândia
2019

Matheus Nister Moreira Reis

**Monitoramento do Câncer de Próstata Através
da co-marcação de Granulócitos e Leucócitos
com o Aptâmero A4 e os Anticorpos
Anti-EpCAM e Anti-CD45**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Uberlândia
2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R375 2019	<p>Reis, Matheus Nister Moreira, 1985- Monitoramento do câncer de próstata através da co- marcação de granulócitos e leucócitos com o aptâmero A4 e os anticorpos anti-EpCAM e anti-CD45 [recurso eletrônico] / Matheus Nister Moreira Reis. - 2019.</p> <p>Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di. 2019.2152 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Ciências médicas. I. Ricardo Goulart Filho, Luiz , 1962-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Ciências da Saúde. III. Título.</p> <p>CDU: 61</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Profissional N° 009/PPCSA				
Data:	31 de maio de 2019	Hora de início:	10:00h	Hora de encerramento:	11:10h
Matrícula do Discente:	11712PSCD011				
Nome do Discente:	Matheus Nister Moreira Reis				
Título do Trabalho:	"Monitoramento do câncer de próstata através da co-marcação de granulócitos e leucócitos com o aptâmero A4 e os anticorpos anti-EpCAM e anti-CD45".				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	3: Fisiopatologia das Doenças e Agravos à Saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Marcadores moleculares de doenças infecciosas e crônicas degenerativas				

Reuniu-se no Anfiteatro do Bloco 2H, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Prof. Dr. Omar Pacheco Simão (UFU) e Prof. Dr. Humberto de Campos Franco Morais (IMEPAC) e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (UFU) orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado (a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/07/2019, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **HUMBERTO DE CAMPOS FRANCO MORAIS, Usuário Externo**, em 04/07/2019, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Omar Pacheco Simão, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/07/2019, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1370808** e o código CRC **25C5833C**.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A474m Sobrenome, Nome do aluno, 1979-

2014 Título do Trabalho / Nome e Sobrenome do aluno. - 2014.
81 f. : il.

Orientador: Nome do Orientador.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação.
Inclui bibliografia.

1. Computação - Teses. 2. Simulação (Computadores) - Teses. I. Sobrenome, Nome do orientador. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação. III. Título.

CDU: 681.3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Os abaixo assinados, por meio deste, certificam que leram e recomendam para a Faculdade de Medicina a aceitação da dissertação intitulada "**Monitoramento do Câncer de Próstata Através da co-marcação de Granulócitos e Leucócitos com o Aptâmero A4 e os Anticorpos Anti-EpCAM E Anti-CD45**" por **Matheus Nister Moreira Reis** como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de **Mestre em Ciências da Saúde**

Uberlândia, ____ de _____ de _____

Orientador: _____
Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Universidade Federal de Uberlândia

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Omar Pacheco Simão
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Humberto de Campos Franco Morais
Instituto Master de Ensino Presidente Antônio Carlos

Agradecimentos

Aos meus pais, **Nilder** e **Rosana**, pelo amor incondicional, apoio e incentivo que sempre ofereceram à nossa família. Obrigado pelo exemplo!

Ao meu irmão **Nilder** pela amizade e cumplicidade nos momentos de dificuldade.

Aos meus avós paternos e maternos que continuam me guiando a enfrentar os desafios diários.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz Ricardo**, pelo apoio, paciência e confiança.

Aos meus colegas e amigos, pelo apoio e conselhos que tornaram possível a realização deste trabalho. Em especial à Esther cuja ajuda foi fundamental para a complementação desse projeto. A Aline Gomes de Souza pelo auxílio com a coleta de dados. Aos amigos Lara Oliveira, Alessandro Paschoalini e Eduardo Chagas pelos conselhos.

Aos meus professores que me ensinaram o que sei na minha profissão: Dr. Sebastião Antonio Borba, Dr. Omar Pacheco Simão, Dr. Leandro Alves de Oliveira, Dr. Fabio Santos Pereira de Almeida, Dr. Danielo Garcia de Freitas.

Aos meus colegas residentes mais experientes, em especial Dr. Victor Hugo Borges e Dr. Eduardo Campos que muito contribuíram para minha formação urológica.

Aos colegas de residência Dr. Caio Eduardo, Dr. Luiz Augusto, Dr. Theo de Souza, Dr. Marcelo Palis Zago, Dr. Artur Bianco pela convivência e ensinamentos no trabalho.

A DEUS, por tornar possível todas as conquistas.

Resumo

O antígeno prostático específico (PSA) não é capaz de distinguir os diversos comportamentos do câncer de próstata (CaP), apresentando limitações no seguimento dos pacientes tanto com quadro localizado quanto metastático. A pesquisa de novos marcadores é importante para evitar tratamentos desnecessários e prever o curso da doença. Com a descoberta e desenvolvimento da pesquisa de células tumorais circulantes (CTCs), uma nova ferramenta de monitoramento e prognóstico poderá ser utilizada. Este estudo realiza uma análise através da citometria de fluxo da co-marcação do aptâmero A4, oligonucleotídeo de RNA ligante específico da linhagem PC3 do CaP e a molécula de adesão celular epitelial (EpCAM), para a identificação de CTC nas populações de granulócitos e leucócitos em amostras de sangue periférico de pacientes durante e após tratamento. A finalidade é aumentar a acurácia no monitoramento do CaP. Os testes porcentagens de granulócitos CD45-EpCAM⁺ e leucócitos A4+CD45-EpCAM⁺, bem como MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM⁺ apresentaram elevada acurácia no diagnóstico e monitoramento do CaP. Apenas a porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM⁺ teve correlação com a dosagem de PSA total, em uma relação inversa, considerando $p < 0,05$. Cada teste detectou CTCs em mais da metade dos pacientes, mesmo praticamente todos considerados com doença controlada. Assim, as co-marcações sugeridas mostraram-se promissoras no monitoramento do CaP.

Palavras-chave: Câncer de próstata. Aptâmero. EpCAM. Citometria de fluxo. Células tumorais circulantes. Intensidade média de fluorescência.

Abstract

The prostate-specific antigen (PSA) is not able to differentiate indolent from aggressive cases of prostate cancer (CaP), presenting limitations in the follow-up for localized and metastatic neoplasia. The search for new markers is important to avoid unnecessary treatments and predict the course of the disease. With the discovery and development of the research of circulating tumor cells (CTCs), a new monitoring and prognostic tool could be used. This study describes an analysis using the flow cytometry of the aptamer A4 marking, PCP-specific PC3 ligand RNA oligonucleotide and the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) commonly present in tumor cells, for the detection of CTC in populations of granulocytes and leukocytes in peripheral blood samples. The purpose of this work is to increase accuracy in prostate cancer monitoring based on detection of CTCs by the aptamer A4, EpCAM marking and CD45 negative marking by flow cytometry in patients with CaP during or after treatment. The percentages of CD45-EpCAM⁺ granulocytes and A4⁺CD45-EpCAM⁺ leukocytes as well as A4 MFI in A4⁺CD45-EpCAM⁺ granulocytes were highly accurate in the diagnosis of prostate cancer. Only the percentage of CD45-EpCAM⁺ granulocytes had a correlation with the total PSA dosage, in an inverse relation, considering $p < 0.05$. Each test detected CTCs in more than half of the patients, even with almost all subjects presenting controlled disease. Thus, the suggested co-marking was promising in the monitoring of CaP.

Keywords: Prostate cancer. Aptamer. EpCAM. Flow cytometry. Circulating tumor cells. Average fluorescence intensity.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Estrutura bidimensional do aptâmero A4 predita pelo servidor web UNAFold.	22
Figura 2 – Preparação e processamento das amostras para detecção de CTCs no sangue periférico de pacientes usando análise de citometria de fluxo. . .	23
Figura 3 – Imagem ilustrativa da janela de seleção realizada para a análise da população de leucócitos.	23
Figura 4 – Imagem ilustrativa da janela de seleção realizada para a análise da população de granulócitos.	24
Figura 5 – Valores das variáveis laboratoriais de granulócitos nos grupos de indivíduos controles e pacientes. A) Porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+. B) MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+. C) Curva ROC da porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+. D) Curva ROC de MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+. . . .	27
Figura 6 – Valores da variável laboratorial de leucócitos nos grupos de indivíduos controles e pacientes . A) Porcentagem de leucócitos A4+CD45-EpCAM+. B) Curva ROC da porcentagem de leucócitos aptâmero A4+CD45-EpCAM+.	28
Figura 7 – Análise de correlação da porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+ com o PSA total. (Vermelho: pacientes submetidos a tratamento com bloqueio androgênico e radioterapia, Verde: participantes tratados com terapia hormonal.)	30
Figura 8 – Análise de correlação da porcentagem de leucócitos A4+CD45-EpCAM+ com o PSA total. (Vermelho: pacientes submetidos a tratamento com bloqueio androgênico e radioterapia, Verde: participantes tratados com terapia hormonal.)	30
Figura 9 – Análises de correlação da variável laboratorial MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+ com o PSA total nos pacientes metastáticos em reposição hormonal.	32

Lista de tabelas

Tabela 1 – Fatores clinicopatológicos e laboratoriais dos indivíduos investigados. .	26
Tabela 2 – Parâmetros diagnósticos para o câncer de próstata, conforme variáveis analisadas por citometria de fluxo.	28
Tabela 3 – Análise de correlação de Spearman entre as variáveis laboratoriais dos granulócitos e leucócitos analisados por citometria de fluxo e as variáveis clinicopatológicas dos pacientes com câncer de próstata avaliados.	29
Tabela 4 – Resultados das análises das combinações de marcadores e PSA total dos pacientes com neoplasia de próstata.	31
Tabela 5 – Análise de correlação de Spearman entre as variáveis laboratoriais dos granulócitos e leucócitos analisados por citometria de fluxo e a variável dosagem de PSA dos pacientes com câncer de próstata localizado avaliados.	32
Tabela 6 – Análise de correlação de Spearman entre as variáveis laboratoriais dos granulócitos e leucócitos analisados por citometria de fluxo e a variável dosagem de PSA dos pacientes com câncer de próstata metastático avaliados.	32

Lista de siglas

APC Aloficocianina

BSA Albumina de soro bovino

CaP Câncer de próstata

CD45 Antígeno comum de leucócitos

CTC Célula tumoral circulante

CTT Célula tronco tumoral

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFR Receptor do fator de crescimento epidérmico

EMT Transição epitelial mesenquimal

EpCAM Molécula de adesão celular epitelial

FDA Food and drug administration

FITC Isotiocianato de fluoresceína

HPB Hiperplasia prostática benigna

mCRPC Câncer de próstata metastático resistente à castração

MFI Intensidade média de fluorescência

PBS Solução salina tamponada com fosfato

PCR Reação em cadeia da polimerase

PE Ficoeritrina

PSA Antígeno específico prostático

PSADT Tempo de dobra do PSA

PSMA Antígeno prostático específico de membrana

RT Radioterapia

ROC *Receiver Operating Characteristic*

SELEX Evolução sistemática de ligantes por enriquecimento

VPN Valor preditivo negativo

VPP Valor preditivo positivo

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objetivos da Pesquisa	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Desenho do estudo	20
3.2	Critérios de inclusão	20
3.3	Critérios de exclusão	20
3.4	Coleta dos dados	21
3.4.1	Amostra de sangue	21
3.4.2	Aptâmero A4 conjugado com FITC	21
3.4.3	Marcação de CTCs por citometria de fluxo	21
3.5	Análises estatísticas	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Características dos pacientes	25
4.2	Potenciais marcadores para o câncer de próstata	26
4.3	Correlação das variáveis clinicopatológicas e laboratoriais de pacientes	29
5	DISCUSSÃO	34
5.1	Monitoramento na doença localizada	37
5.2	Monitoramento na doença metastática	37
5.3	Limitações do método	38
6	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

APÊNDICES

46

APÊNDICE A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA 47

Capítulo 1

Introdução

Câncer de próstata (CaP) é uma doença heterogênea que pode manifestar de forma indolente ou agressiva, associado a metástases ósseas ou para outros órgãos, situação que resulta em elevada morbimortalidade (LEÓN-MATEOS et al., 2016). No Brasil, é a segunda neoplasia mais comum entre os homens, atrás apenas do câncer cutâneo não melanoma (INCA - Brasil, 2016). Em valores absolutos é o sexto tipo mais comum no mundo e o mais prevalente no sexo masculino, representando cerca de 10% do total de tumores. Em cada ano no biênio 2018-2019 estima-se 68.220 novos casos no território nacional sendo que, em 2015, 14.484 mortes foram a ele relacionadas (INCA - Brasil, 2016). Nesse mesmo ano, nos Estados Unidos, surgiram mais de 180 mil casos com aproximadamente 27 mil óbitos (Centers for Disease Control and Prevention and others, 2018).

O diagnóstico do CaP era realizado na maioria dos casos em estágios mais avançados, uma vez que em sua fase inicial não causa sinais ou sintomas. No entanto, com o advento do antígeno prostático específico (PSA), na década de 90, houve uma mudança no perfil de diagnóstico da doença, a qual passou a ser detectada e catalogada, então, em fases mais precoces (SHAO et al., 2009).

O PSA foi aprovado em 1994 pelo Food and drug administration (FDA) como marcador diagnóstico e é atualmente o mais utilizado no mundo. Embora seja usado na triagem do CaP, é expresso por células do epitélio glandular normal e neoplásico, assim, não se trata de uma molécula câncer específico. A concentração sanguínea do antígeno pode apresentar elevação em doenças não oncológicas como Hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatite e infartos prostáticos (QASEEM et al., 2013). Isso resultou em um aumento nas biópsias desnecessárias e, conseqüentemente, na detecção de grande número de neoplasias indolentes que poderiam nunca se tornar clinicamente significativas, as quais correspondem a 40 a 60% dos casos diagnosticados (QASEEM et al., 2013).

Os níveis do PSA podem ser similares tanto nos casos sem significância clínica quanto nos agressivos e, geralmente, não indicam adequadamente a resposta do paciente a um determinado tratamento proposto (LEÓN-MATEOS et al., 2016). O maior desafio na

prática é a inabilidade dos atuais testes diagnósticos, incluindo PSA, em distinguir os diversos comportamentos da doença (DIJKSTRA et al., 2012). A pesquisa de novos biomarcadores de progressão e presença do tumor são importantes para evitar tratamentos desnecessários, prever o curso da doença e desenvolver terapia mais eficaz (SAINI, 2016).

Recentemente foi desenvolvida a biópsia líquida no Câncer de próstata metastático resistente à castração (mCRPC). Trata-se da detecção de Célula tumoral circulante (CTC)s no sangue periférico através da Molécula de adesão celular epitelial (EpCAM), cujo único sistema aprovado pelo FDA na prática clínica é o *CellSearch*. Tanto no tumor primário quanto no foco metastático, algumas células neoplásicas sofrem um processo de transformação molecular e invadem a corrente sanguínea. A partir daí podem ser capturadas e fornecer informações importantes acerca do diagnóstico, prognóstico e tratamento (KOZMINSKY et al., 2019). Um dos alvos estudados é o EpCAM, uma glicoproteína transmembrana tipo I, expressa em células epiteliais normais, mas principalmente nos carcinomas de diferentes sítios primários, dentre eles o de próstata (SPIZZO et al., 2011). Na maioria dos tumores sua presença se correlaciona com pior sobrevida global, mau prognóstico e maior risco de recorrência (IMRICH; HACHMEISTER; GIRES, 2012).

Aptâmero é um oligonucleotídeo capaz de se ligar a um determinado alvo, análogo ao anticorpo monoclonal, porém com algumas possíveis vantagens em relação a ele. Vários aptâmeros de ácido ribonucleico (RNA), ligantes de células da linhagem neoplásica PC-3 do Câncer de próstata (CaP), foram isolados a partir de uma biblioteca de material genético, através do método de Evolução sistemática de ligantes por enriquecimento (SELEX). As células foram cultivadas em meio tridimensional por levitação magnética o que permitiu melhor representação da arquitetura celular in vivo. A associação desses dois métodos resultou na metodologia 3D Cell SELEX, a partir da qual, diferentes sequências de nucleotídeos foram selecionadas (SOUZA et al., 2015).

Dentre todas as moléculas estudadas, o aptâmero A4 foi o que apresentou as melhores características e alta detecção de CTC em amostras de pacientes com CaP, tanto em virgens de tratamento quanto naqueles sob diferentes regimes terapêuticos (OLIVEIRA et al., 2017).

1.1 Objetivos da Pesquisa

J Objetivo geral:

- Aumentar a acurácia diagnóstica e de monitoramento do câncer de próstata através da detecção de células tumorais circulantes.

J Objetivos específicos:

- Avaliar a detecção de células tumorais circulantes por citometria de fluxo através da co-marcação com o anticorpo anti-EpCAM e o aptâmero A4, incluindo a marcação negativa com Antígeno comum de leucócitos (CD45).
- Comparar o desempenho da co-marcação, incluindo a marcação negativa com CD45, com a dosagem de PSA.
- Comparar o desempenho da co-marcação - incluindo a marcação negativa com CD45 - com a marcação apenas do anticorpo anti-EpCAM e a marcação negativa com CD45, similar ao sistema *CellSearch*.

Fundamentação Teórica

Diferentes teorias tentam explicar a origem das metástases (SEYFRIED; HUYSSENTRUYT, 2013). Uma subpopulação de células do tumor primário sofre um processo conhecido como Transição epitelial mesenquimal (EMT) no qual, após um acúmulo gradual de mutações genéticas, perde marcadores epiteliais e ganha atributos mesenquimais. Desenvolve-se, então, fenótipo de indiferenciação celular, adquire maior motilidade ao perder moléculas de adesão e amplia a capacidade de invasão vascular e tecidual. As células que caem na corrente sanguínea são chamadas de tumorais circulantes e, após infiltrarem o órgão-alvo, sofrem o processo reverso e readquirem a capacidade proliferativa (PANTELEAKOU et al., 2009).

Uma outra hipótese sugere que as CTCs se originem de precursores da linhagem mielóide ou de células híbridas resultantes da fusão entre macrófagos e Célula tronco tumoral (CTT)s. Uma quantidade considerável de macrófagos está presente no estroma tumoral e leva à angiogênese e inflamação local, favorecendo a emissão de metástases, além de auxiliar na progressão e desenvolvimento da neoplasia. Sabe-se que também apresentam características semelhantes aos implantes secundários como poder de invasão tecidual, liberação de fatores angiogênicos e capacidade de sobreviver em ambientes hipoxêmicos (SEYFRIED; HUYSSENTRUYT, 2013). Assim, algumas características morfológicas de células da linhagem mielóide como tamanho e granulosidade se assemelhariam às CTC, auxiliando na detecção de das mesmas.

As CTCs migram do sítio primário ou secundário, semeiam lesões à distância e são as responsáveis pela disseminação neoplásica. São caracterizadas pela presença de marcadores epiteliais em suas superfícies, no entanto, podem apresentar, ainda, antígenos mesenquimais ou de células tronco, exemplificando uma plasticidade epitelial (BITTING et al., 2015). Quando presentes na corrente sanguínea sugerem a presença de micrometástases as quais, se descobertas antes do tratamento, indicam a possibilidade de recorrência (CEGAN et al., 2017). Apesar de milhares de células caírem na circulação diariamente, menos de 0.01% são capazes de gerar lesões secundárias, caracterizando um processo ineficiente (VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

A detecção de CTC no sangue periférico, também conhecida como biópsia líquida, possibilita a extração de informações relevantes em tempo real e sequencial acerca do diagnóstico, progressão tumoral, prognóstico, risco de recidiva e resposta a diferentes tratamentos propostos (IMRICH; HACHMEISTER; GIRES, 2012). Níveis elevados indicam desenvolvimento da doença e pior sobrevida global. Mudanças nos valores das CTCs precedem oscilação dos valores do Antígeno específico prostático (PSA) e sugere uma importância ainda maior no monitoramento do CaP. (LEÓN-MATEOS et al., 2016).

Após tratamento do CaP com intenção curativa, um dos únicos biomarcadores validados para avaliar recorrência tumoral é o PSA (BROECK et al., 2018). No seguimento de pacientes submetidos a prostatectomia radical, a recidiva bioquímica é caracterizada por valores acima de 0.2ng/mL, confirmados em exame subsequente. Limitações dessa definição ocorrem em função da possibilidade de persistência de pequenos ácinos benignos (MCCORMICK et al., 2019). Estima-se que apenas 30% desses casos irá desenvolver recorrência clínica da doença (BROECK et al., 2018).

Já a recidiva bioquímica após Radioterapia (RT) é definida como elevação do PSA em 2ng/mL acima do nadir (ARTIBANI et al., 2018), o qual corresponde ao menor valor medido após tratamento, que pode ser atingido em até 24 meses (FRANCA; VIEIRA; PENNA, 2008). Os pacientes de risco intermediário e alto tratados com RT e bloqueio hormonal cujo PSA nadir é maior que 0.06 a 0.5 ng/mL tem maior risco para recorrência (GEARA et al., 2017). A simples dosagem do marcador não define se há ou não doença metastática local e/ou à distância e, portanto, não determina o início da terapia de resgate (MCCORMICK et al., 2019). No mCRPC, muitas células adquirem fenótipo indiferenciado e passam a não produzir mais o PSA, o qual perde capacidade em estimar sobrevida (ARMAKOLAS et al., 2010).

Apesar de não haver um marcador universal das CTCs, EpCAM é uma das mais frequentemente citadas. Trata-se de uma molécula de glicoproteína transmembrana expressa majoritariamente em tumores de origem epitelial, dentre eles o da próstata. Em menor proporção, também está presente em tecidos epiteliais não neoplásicos, embrionários e células tronco (HUANG et al., 2018). Além de ser responsável pela adesão celular, tem papel fundamental na migração, proliferação, diferenciação e sinalização nuclear (CAMPOS et al., 2016). Está ainda envolvido no desenvolvimento de quimio e radorresistência tumoral de tal forma que influencia diretamente o prognóstico (NI et al., 2018).

O sistema *CellSearch* foi o primeiro a ser aprovado para detecção e quantificação das CTC nos casos de mCRPC. São coletados 7,5mL de sangue do paciente. A proporção de células tumorais em relação aos glóbulos brancos e vermelhos na corrente sanguínea gira em torno de 1 para 1 milhão (LOWES et al., 2016). A partir de anticorpos anti-EpCAM ligados a nanoesferas ferromagnéticas, as células epiteliais (incluindo as neoplásicas) são capturadas e adquirem propriedades magnéticas. A presença de CD45, específico de células nucleadas de origem mielóide, exclui a população do estudo, enquanto a marcação

com anti-citoqueratinas confirma (LI et al., 2015; ZHANG; ARMSTRONG, 2016). Posteriormente é acrescentado o corante nuclear DAPI o qual, a partir da imunofluorescência, permite a visualização das células vivas com o núcleo intacto à microscopia (ARMAKOLAS et al., 2010). Quando detectadas mais que cinco CTC nas amostras, considera-se um prognóstico desfavorável, principalmente em relação a sobrevida global (PANTEL; HILLE; SCHER, 2019).

Acredita-se que no início do processo de metastatização, as CTC apresentem um fenótipo EMT híbrido, com boa taxa de detecção pelo *CellSearch* em função dos marcadores epiteliais. Elas são importantes para o desenvolvimento das lesões secundárias. À medida em que a doença progride e os focos metastáticos proliferam, aumenta a EMT com maior quantidade de células liberadas na corrente sanguínea. Passam a predominar as mesenquimais que são indetectáveis pelo método, (LOWES et al., 2016) motivo pelo qual aproximadamente 30 a 40% dos pacientes com mCRPC apresentam baixos níveis de captura (BITTING et al., 2015).

Na busca de novos biomarcadores utilizou-se a metodologia 3D Cell-SELEX. O objetivo foi selecionar aptâmeros, neste estudo, formados por oligonucleotídeos de RNA ligantes contra células do CaP. Um pool de ácido desoxirribonucleico (DNA) do sangue de pacientes com a doença foi obtido, clivado, amplificado por Reação em cadeia da polimerase (PCR) e, posteriormente, convertido em RNA, produzindo uma biblioteca do material genético. Essas moléculas foram inicialmente incubadas com linhagem prostática não neoplásica RWPE-1 e as sequências que se ligaram foram desprezadas. Oito ciclos subsequentes de amplificação foram realizados, utilizando a linhagem tumoral PC-3 para seleção positiva dos aptâmeros (SOUZA et al., 2015).

Todas as células foram incubadas em meio contendo nanopartículas de óxido férrico e ouro e, posteriormente, submetidas à ação de campo magnético. O arranjo tridimensional resultante formado *in vitro* é mais fidedigno em relação às características morfológicas e funcionais do tumor *in vivo* (SOUZA et al., 2015).

O aptâmero tem a capacidade de se tornar ferramenta versátil tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento de algumas neoplasias. Os oligonucleotídeos apresentam vantagens em relação aos anticorpos monoclonais como melhor penetração tecidual, ausência de imunogenicidade, menor tamanho, maior especificidade, facilidade de síntese e manipulação laboratoriais, habilidade em reconhecer a conformação das moléculas alvo expressas na superfície celular (CHANG; DONOVAN; TAN, 2013). Recentemente também foram testados no tratamento, por exemplo, como moléculas específicas para o Antígeno prostático específico de membrana (PSMA), marcador de células tumorais encontrado tanto nas sensíveis quanto nas insensíveis aos andrógenos (HORI et al., 2018).

Dentre os aptâmeros selecionados através do 3D Cell SELEX, o A4 foi testado em amostras de sangue de pacientes com CaP virgens de tratamento e sob diferentes regimes terapêuticos e identificou CTC em todos os casos. Uma vez que não foram utilizados

marcadores epiteliais no estudo, essa detecção pode estar associada ainda a células mesenquimais. Apesar de ter utilizado uma pequena amostra, o uso do oligonucleotídeo demonstrou ser promissor no diagnóstico e monitoramento do CaP (OLIVEIRA et al., 2017).

O estudo das CTC foi realizado através de citometria de fluxo, um método capaz de analisar diferentes parâmetros de uma única célula a partir de um fluxo de fluido que passa através de uma fonte de luz. As principais características são granulosidade, tamanho e fluorescência produzida por um fluoróforo acoplado a um ligante específico de um alvo (ADAN et al., 2017). Neste estudo, a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) está ligada ao aptâmero A4 que, por sua vez, é específico para uma proteína ainda não identificada, mas expressa pelas células PC-3.

Materiais e Métodos

3.1 Desenho do estudo

Este trabalho se constitui em um estudo prospectivo, transversal e analítico, realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia entre os meses de maio a junho de 2018. A população envolvida no estudo é composta por 18 pacientes com CaP em seguimento durante e após tratamento, subdivididos em quadro localizado (12 indivíduos) e metastático (6 indivíduos). Um paciente apresentava doença localizada virgem de tratamento. O grupo controle foi composto por 14 indivíduos, sendo 4 mulheres e 10 homens com menos de 35 anos, portanto, considerados sem CaP.

3.2 Critérios de inclusão

Foram selecionados pacientes em acompanhamento no serviço de urooncologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia com prontuário legível em relação ao histórico do tratamento do CaP. Os indivíduos deveriam conter informações registradas em prontuário acerca do PSA pré-tratamento, escore de Gleason da biópsia, histórico terapêutico. O valor de PSA mais recente poderia ser, no máximo, referente a um mês antes da data da entrevista, para que se considerasse a inclusão do indivíduo na amostra. Participantes do grupo controle poderiam ser mulheres de qualquer idade e homens com menos de 35 anos de idade.

3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do processo de amostragem pacientes sem registro em prontuário do PSA pré tratamento, escore de Gleason da biópsia ou do histórico terapêutico. Pacientes cujo PSA mais recente tivesse data superior a um mês do dia da entrevista também não fizeram parte do estudo.

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia, como consta no documento nos Apêndices.

3.4 Coleta dos dados

3.4.1 Amostra de sangue

Amostras de sangue periférico de 33 participantes foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia em tubos com Ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), num total de 8mL. No momento da coleta, foram obtidos do grupo com a malignidade os dados idade e estadiamento patológico - PSA pré tratamento, escore de Gleason no espécime da biópsia transretal, escore de Gleason no espécime da prostatectomia radical, tomografia computadorizada ou ressonância magnética de pelve, cintilografia óssea, PSA até um mês antes da entrevista, histórico terapêutico. Todos os dados foram registrados em tabela do Excel.

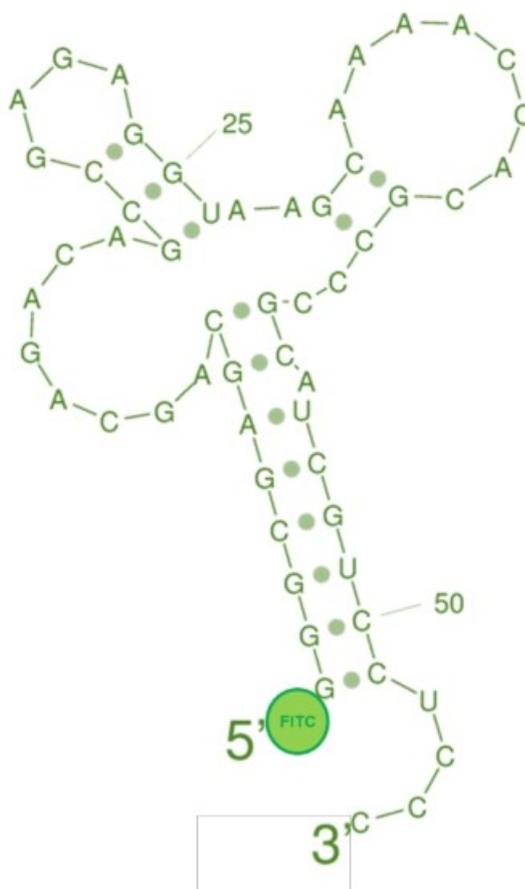
3.4.2 Aptâmero A4 conjugado com FITC

O aptâmero de RNA A4 foi previamente selecionado através da técnica 3D Cell-SELEX e testado para CaP, conforme descrito por Souza et al. (2015). Em nosso estudo foi conjugado ao FITC no extremo 5' da sequência de nucleotídeos: **5'FITC-AGCCGAGAGGUAAGCAAAACCACGCCCG3'** (Invitrogen, EUA) (Figura 1). Para o uso nos ensaios, a molécula liofilizada foi ressuspensa em água de injeção até uma solução estoque de concentração 100 μ M.

3.4.3 Marcação de CTCs por citometria de fluxo

As amostras de sangue foram submetidas a separação do plasma, através de centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos. A camada de leucócitos foi analisada. A cada tubo de citometria foram adicionados 100 μ L da camada de leucócitos para sua incubação a 4°C por 30 minutos. Um tubo foi incubado sem marcadores, servindo como controle da marcação do aptâmero A4 conjugado com FITC (A4-FITC). Os três tubos restantes foram então incubados com os seguintes volumes dos marcadores: 0,2 μ L da solução estoque do aptâmero A4-FITC (Invitrogen, EUA); 0,25 μ L do anticorpo CD45-PE (368510, BioLegend, EUA) e 0,25 μ L de EpCAM-APC (324208, BioLegend, EUA); e 0,25 μ L do isotipo controle IgG1 de camundongo conjugado com Ficoeritrina (PE) (400114, BioLegend, EUA) e 0,25 μ L do isotipo controle IgG2b de camundongo conjugado com Alofocianina (APC) (400322, BioLegend, EUA). Tampão de lise de hemácias 1x (Invitrogen, EUA) foi adicionado para incubação por 10 minutos. Após essa etapa, os tubos

Figura 1 – Estrutura bidimensional do aptâmero A4 predita pelo servidor web UNAFold.



foram centrifugados a 200xg por 5 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuscitado em 1 mL de tampão Solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1x, 1% Albumina de soro bovino (BSA) e 0,1% azida básica, lavado por centrifugação e novamente ressuscitado em 200 μ L do mesmo tampão para análise da marcação no citômetro de fluxo (Figura 2) (Accuri C6, Becton Dickinson, EUA). O método foi capaz de fornecer a porcentagem de leucócitos e granulócitos com diferentes combinações de marcadores, bem como a intensidade média de fluorescência do Aptâmero A4 e da EpCAM em ambas as populações.

Os leucócitos (Figura 3) e, posteriormente, granulócitos (Figura 4) com as marcações A4+; CD45-EpCAM+; e A4+ em CD45-EpCAM+ (CD45-EpCAM+A4+), assim como a Intensidade média de fluorescência (MFI) dos marcadores A4 e EpCAM das amostras foram obtidas através do citômetro de fluxo Accuri C6, selecionados a partir do tubo sem marcação^{1,2}.

¹ SSC-A: área da dispersão lateral, do inglês *Side Scattering-Area*.

² FSC-A: área da dispersão frontal, do inglês *Frontal Scattering-Area*.

Figura 2 – Preparação e processamento das amostras para detecção de CTCs no sangue periférico de pacientes usando análise de citometria de fluxo.

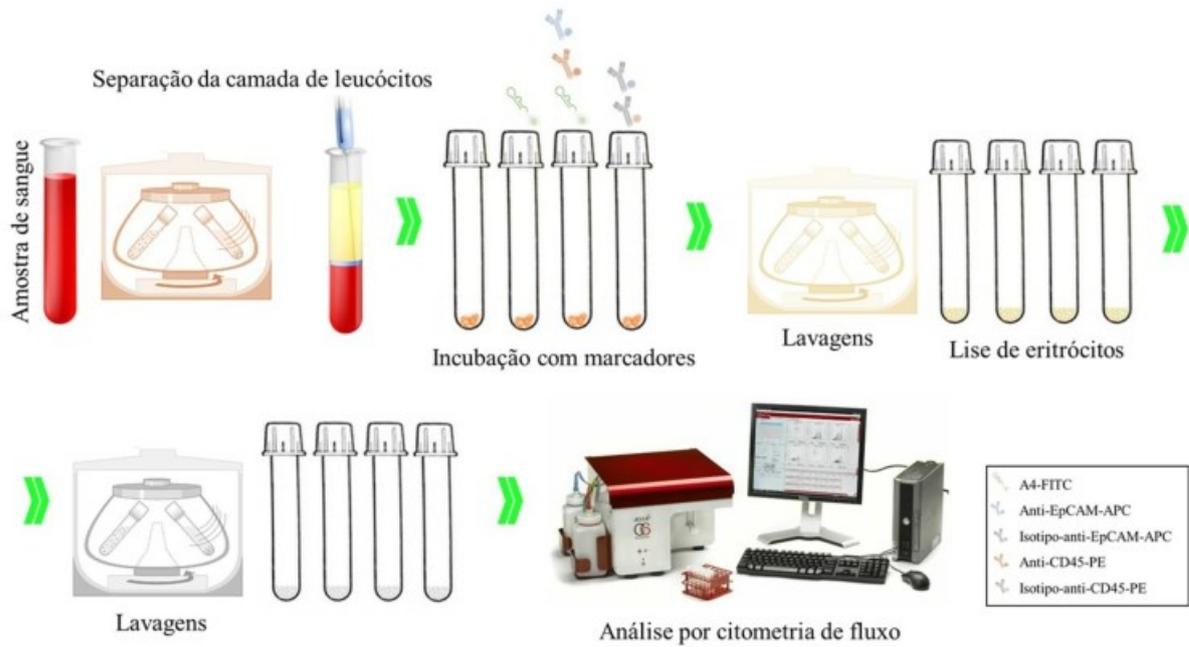


Figura 3 – Imagem ilustrativa da janela de seleção realizada para a análise da população de leucócitos.

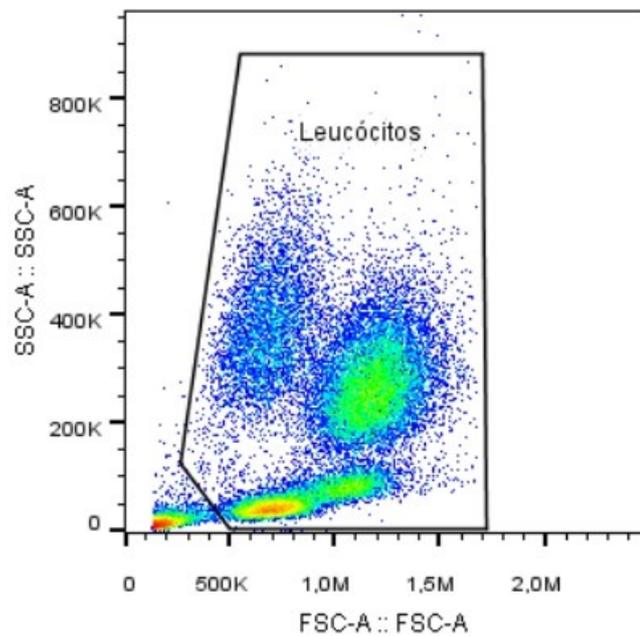
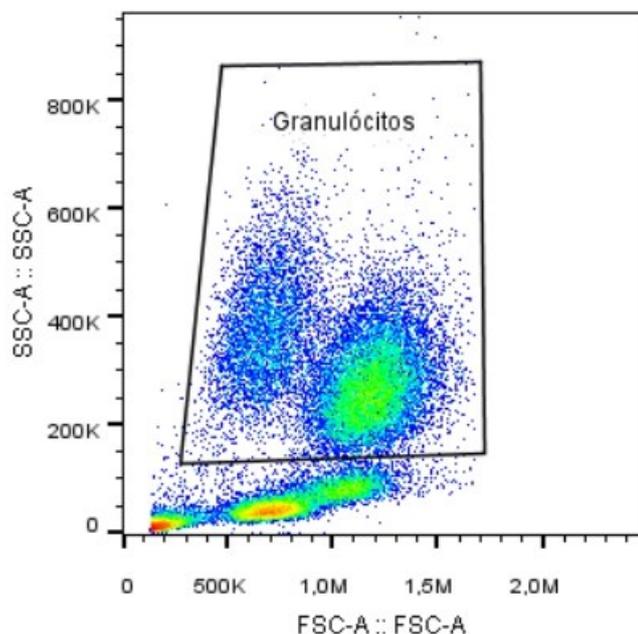


Figura 4 – Imagem ilustrativa da janela de seleção realizada para a análise da população de granulócitos.



3.5 Análises estatísticas

A comparação entre os grupos de indivíduos foi feita pelo teste Mann-Whitney para variáveis não paramétricas. A análise de correlação de Spearman foi aplicada para as variáveis laboratoriais e clínicas. Os parâmetros diagnósticos das variáveis foram calculados com base na análise da curva ROC³. Todas as análises foram desenvolvidas no programa Graph Pad Prism, versão 7.0, considerando o valor de p menor que 0,05 como significativo.

Avaliou-se, neste trabalho, o valor clínico da co-marcação do aptâmero A4 e o anticorpo anti-EpCAM, incluindo a marcação negativa de CD45, nas populações de granulócitos e leucócitos em pacientes sem terapia prévia ou em tratamento para CaP localizado e com doença metastática em terapia hormonal.

³ Característica de operação do receptor, do inglês *Receiver Operating Characteristic*

Resultados

4.1 Características dos pacientes

A Tabela 1 apresenta as características clínicas e laboratoriais das populações de pacientes e controles. Os portadores da enfermidade possuíam neoplasia localizada em diferentes fases; virgem de tratamento, durante e após terapia com intenção curativa. Havia ainda aqueles com doença metastática sensível à castração em bloqueio hormonal. Os participantes com CaP tinham idade superior a 55 anos, enquanto os do grupo controle eram homens abaixo dos 35 e mulheres de diferentes idades. O intervalo do PSA oscilou de 0,01 a 3,46ng/mL. Dois indivíduos foram retirados das correlações e mediana envolvendo o PSA, um com metástases em início de hormonioterapia e dosagem sérica de PSA de 2333ng/mL e o outro virgem de tratamento com valor 11ng/mL.

Levando-se em consideração as variáveis laboratoriais, apenas porcentagem de CD45-EpCAM+ e a intensidade média de fluorescência (MFI) do aptâmero A4 em A4+CD45-EpCAM+, ambos na população de granulócitos, foram significativamente diferentes entre os grupos em uma análise comparativa^{1,2}. (Tabela 1)

Outras duas variáveis, porcentagem de CD45-EpCAM+ e porcentagem de A4+CD45-EpCAM+, ambas na população de leucócitos, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, considerando p menor que 0,05. Entretanto, chegaram próximas a essa condição, respectivamente 0,06 e 0,07. Em virtude do pequeno tamanho da amostra, o valor de p pode não ser muito preciso e, portanto, essas análises podem apresentar algum significado considerando uma maior amostragem.

¹ Valores de p estatisticamente significativos pelo teste de Mann-Whitney são mostrados em negrito.

² n: número de indivíduos.

Tabela 1 – Fatores clinicopatológicos e laboratoriais dos indivíduos investigados.

Variável	Controles (n=14)	Pacientes (n=19)	Valor de p
Idade (anos) - média (intervalo)	-	74 (56-85)	-
PSA (ng/mL) - mediana (intervalo)	-	0,328 (0,04-1.195)	-
Granulócitos A4+ (%) - mediana (intervalo)	3,45 (0,61-42)	5,99 (1,23-27,9)	0,32
Granulócitos CD45-EpCAM+ (%) - mediana (intervalo)	0,07 (0,02-0,8)	0,018 (0-0,19)	0,01
Granulócitos A4+CD45-EpCAM+ (%) - mediana (intervalo)	58,1 (18,8-100)	66,7 (0-100)	0,38
MFI de A4 em granulócitos (u. a.) - mediana (intervalo)	3399 (2631-14191)	3340 (2096-7656)	0,46
MFI de EpCAM em granulócitos CD45-EpCAM+ - mediana (intervalo)	3065 (1870-6148)	2615 (1216-8897)	0,38
MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+ (u. a.) - mediana (intervalo)	58346 (3838-2400000)	145559 (4336-2400000)	0,03
Leucócitos A4+ (%) - mediana (intervalo)	12,35 (3,71-35,1)	10,7 (1,34-37,2)	0,52
Leucócitos CD45-EpCAM+ (%) - mediana (intervalo)	0,06 (0-0,69)	0,013 (0-0,17)	0,06
Leucócitos A4+CD45-EpCAM+ (%) - mediana (intervalo)	30,5 (0-64)	71,15 (0-100)	0,07
MFI de A4 em leucócitos (u. a.) - mediana (intervalo)	3238 (2227-7973)	3171 (1924-21566)	0,40
MFI de EpCAM em leucócitos - mediana (intervalo)	4303 (0-9154)	2547 (0-10298)	0,19

Valores de p estatisticamente significativos pelo teste de Mann-Whitney são mostrados em negrito. n: número de indivíduos. MFI: intensidade de fluorescência média, do inglês *Mean Fluorescence Intensity*. u. a.: unidades arbitrárias. PSA: antígeno prostático específico, do inglês *Prostate Specific Antigen*.

4.2 Potenciais marcadores para o câncer de próstata

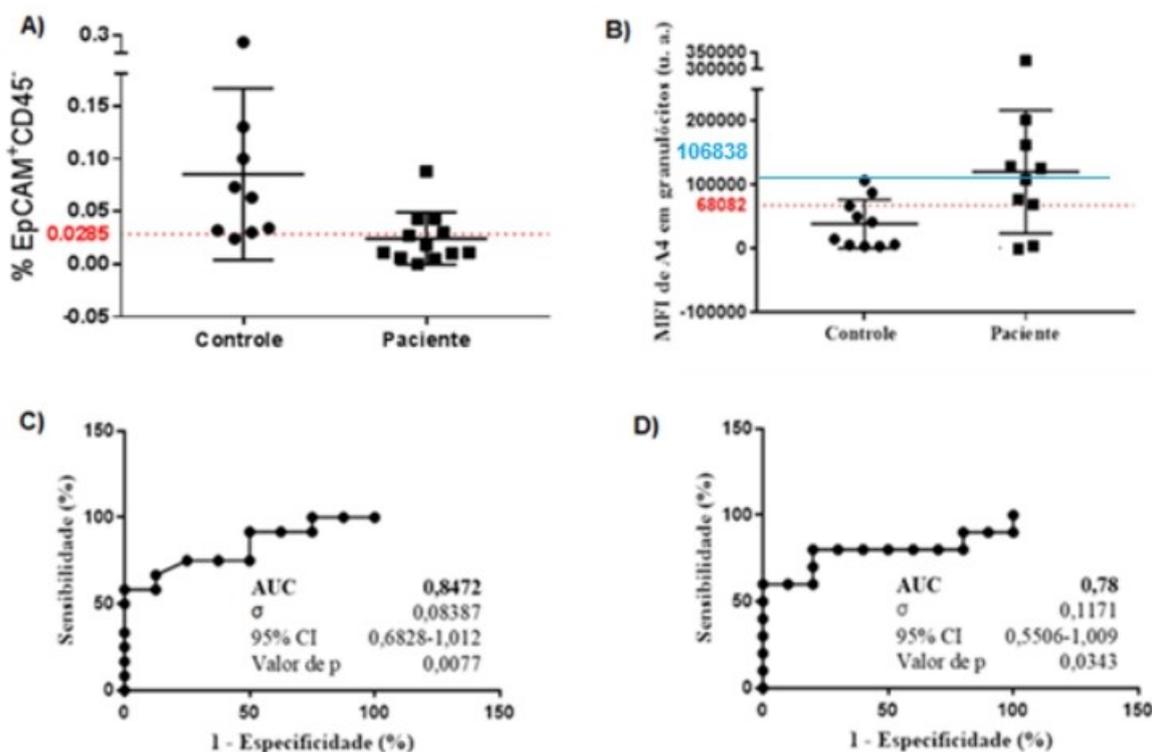
Em função da diferença entre os grupos na porcentagem de CD45-EpCAM+ e na MFI³ de A4 em A4+CD45-EpCAM+, ambos na população de granulócitos, o *cutoff* destas variáveis foi estabelecido por meio da curva ROC⁴ (Figura 5), onde as barras representam a média e o desvio padrão em cada grupo. A linha vermelha nos gráficos A e B representa o valor de *cutoff* da curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) nos gráficos C e D, respectivamente. A linha azul no gráfico B representa um valor acima do qual não há controles.

Para a porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+, um valor abaixo do *cutoff* foi considerado positivo para o diagnóstico de CaP, altamente específico, com menor proporção de falsos positivos. Já para a MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+, um resultado acima da referência foi associado à presença de tumor. Este teste apresentou elevadas sensibilidade e especificidade (Tabela 2).

³ MFI: intensidade de fluorescência média, do inglês *Mean Fluorescence Intensity*.

⁴ ROC: característica de operação do receptor, do inglês *Receiver Operating Characteristic*.

Figura 5 – Valores das variáveis laboratoriais de granulócitos nos grupos de indivíduos controles e pacientes. A) Porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+. B) MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+. C) Curva ROC da porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+. D) Curva ROC de MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+.



No monitoramento do CaP, considerando-se o MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM⁺, todos os pacientes com valor acima do *cutoff* em azul apresentam CTCs detectáveis à citometria de fluxo e, assim, possíveis metástases. Resultados abaixo da referência devem ser interpretados como livres de doença. Situação semelhante ocorre nos indivíduos do grupo controle, composto por indivíduos do sexo feminino e homens com menos de 35 anos de idade considerados, portanto, sem a malignidade. O método foi capaz de diferenciar células neoplásicas das não tumorais a partir da fluorescência emitida pelo aptâmetro A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM⁺. Células epiteliais normais com a marcação negativa para CD45 e positiva para EpCAM apresentam menores valores de MFI em comparação às cancerígenas após o acréscimo do oligonucleotídeo.

A análise da porcentagem de leucócitos CD45-EpCAM⁺ conjugada com o aptâmetro A4, demonstrou uma chance 18 vezes maior de apresentar metástases para valores acima de 56,9%. O teste se mostrou como um método de boa acurácia em função da alta especificidade e VPP (Tabela 2). Embora não tenha apresentado diferença estatística quando comparada entre os grupos - ao nível de 5% - a variável considerada mostrou um p significativo para uso no diagnóstico de CaP através da citometria de fluxo (Figura 6).

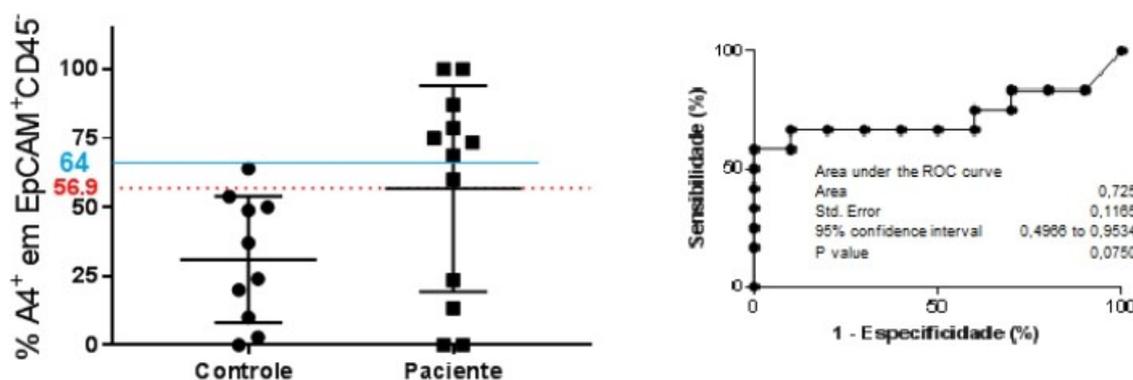
5 u.a.: unidades arbitrárias.

Tabela 2 – Parâmetros diagnósticos para o câncer de próstata, conforme variáveis analisadas por citometria de fluxo.

Variável	Cutoff	S	E	VPP	VPN	A	RV	Chance de risco	P
Granulócitos CD45-EpCAM+ (%)	<0,0285	67%	89%	89%	67%	76,2	6	16	0,02
MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+ (u. a.)	>68082	80%	80%	80%	80%	80,0	4	16	0,01
Leucócitos A4+CD45-EpCAM+ (%)	>56,9	67%	90%	89%	69%	77,3	6,7	18	0,01

S: Sensibilidade. E: Especificidade. VPP: Valor Preditivo Positivo. VPN: Valor Preditivo Negativo. A: Acurácia RV: Razão de verossimilhança. MFI: intensidade de fluorescência média, do inglês *Mean Fluorescence Intensity*. u. a.: unidades arbitrárias.

Figura 6 – Valores da variável laboratorial de leucócitos nos grupos de indivíduos controles e pacientes. A) Porcentagem de leucócitos A4+CD45-EpCAM+. B) Curva ROC da porcentagem de leucócitos aptâmero A4+CD45-EpCAM+.



As barras na Figura representam a média e o desvio padrão em cada grupo. A linha vermelha no gráfico A representa o valor de *cutoff* da curva ROC no gráfico B. A linha azul no gráfico A representa um valor acima do qual não há controles.

No monitoramento do CaP, levando-se em conta a porcentagem de leucócitos A4+CD45-EpCAM+, resultados acima de 64% medidos pela citometria de fluxo são específicos para identificação de CTCs, as quais poderão ser relacionadas a possíveis metástases⁶. Valores abaixo do *cutoff* são considerados livres de doença uma vez que situação semelhante é encontrada nos indivíduos do grupo controle. O método foi capaz, portanto, de identificar um quadro disseminado a partir de 64% de leucócitos com essa combinação de marcadores na amostra de sangue periférico.

O MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+ foi o indicador que apresentou maior acurácia na amostragem, enquanto a porcentagem de leucócitos A4+CD45-EpCAM+ foi o indicador que apresentou maior chance de risco. Todos os três testes citados apresentaram validade estatística considerando $p < 0.05$. (Tabela 2)

⁶ AUC: área sob a curva, do inglês Area Under the Curve.

4.3 Correlação das variáveis clinicopatológicas e laboratoriais de pacientes

Considerando-se todo o grupo amostral, a MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+ e a porcentagem de leucócitos A4+CD45-EpCAM+ não tiveram correlações estatisticamente significativas com as variáveis clinicopatológicas idade ou PSA total⁷. Já a porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+ e o PSA total⁸ apresentaram correlação de Spearman moderadamente alta, com o coeficiente maior que 0,7. (Tabela 3) Observou-se uma relação inversa entre ambos os parâmetros (Figura 7).

Tabela 3 – Análise de correlação de Spearman entre as variáveis laboratoriais dos granulócitos e leucócitos analisados por citometria de fluxo e as variáveis clinicopatológicas dos pacientes com câncer de próstata avaliados.

Variável clinicopatológica		Leucócitos A4+ em CD45-EpCAM+ (%)	Granulócitos CD45-EpCAM+ (%)	MFI de A4 Granulócitos (u.a)
Idade	P	0,341	-0,365	-0,028
	P	0,254	0,221	0,929
	N	13	13	13
PSA total	P	0,418	-0,766	0,425
	P	0,199	0,005	0,220
	N	11	11	10

Valores de p estatisticamente significativos são mostrados em negrito. ρ : rho, coeficiente de Spearman. p: valor de p. n: número de indivíduos. MFI: intensidade de fluorescência média, do inglês *Mean Fluorescence Intensity*. PSA: antígeno prostático específico, do inglês *Prostate Specific Antigen*.

Para um PSA nadir de 0,06ng/mL a partir do qual considera-se maior risco de recorrência tumoral após tratamento com radioterapia ou de 0,2ng/mL para bloqueio androgênico, seis pacientes estavam sob condição de risco. Desses, cinco foram confirmados pela porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+. Consideramos que apenas um estava livre de neoplasia. Abaixo do *cutoff* 0,028 encontramos outros dois participantes com CTCs que falharam na detecção pelo PSA.

De acordo com a atual definição de recidiva bioquímica em pacientes com doença localizada tratados com radioterapia e bloqueio androgênico, nenhum caso se enquadrava nessa situação. Entretanto, abaixo do *cutoff* da porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+, detectamos CTC em pouco mais da metade deles.

Para os casos metastáticos em hormonioterapia todos aqueles em risco de progressão para doença refratária à castração baseados no PSA, foram confirmados pela porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+.

Levando-se em consideração os mesmos valores de PSA nadir, seis pacientes estavam em risco de progressão. Desses, quatro foram confirmados a partir de 64% de leucócitos

⁷ CI: intervalo de confiança, do inglês *Coefficient Interval*.

⁸ PSA: antígeno prostático específico, do inglês *Prostate Specific Antigen*

Figura 7 – Análise de correlação da porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+ com o PSA total. (Vermelho: pacientes submetidos a tratamento com bloqueio androgênico e radioterapia, Verde: participantes tratados com terapia hormonal.)

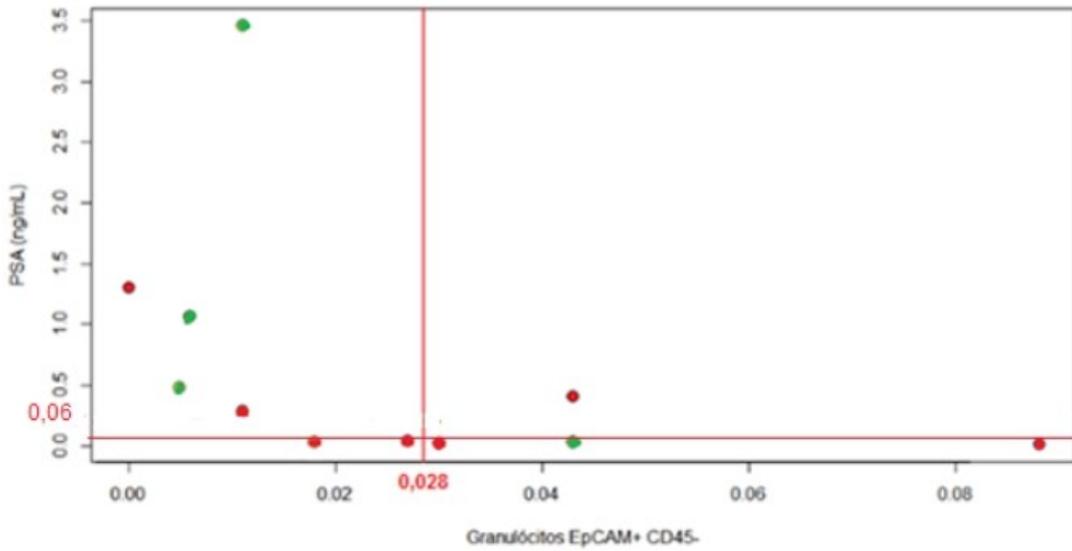
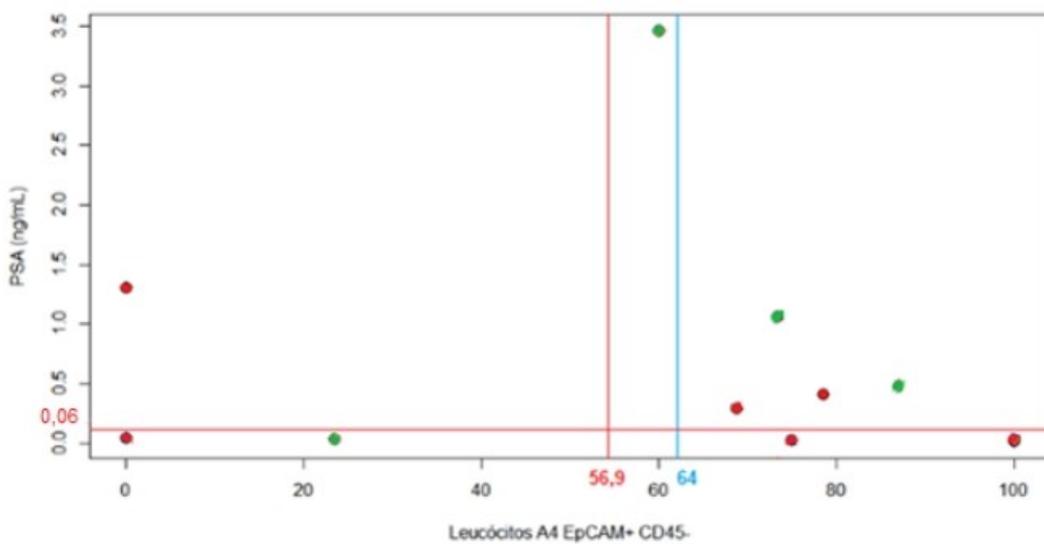


Figura 8 – Análise de correlação da porcentagem de leucócitos A4+CD45-EpCAM+ com o PSA total. (Vermelho: pacientes submetidos a tratamento com bloqueio androgênico e radioterapia, Verde: participantes tratados com terapia hormonal.)



A4+CD45-EpCAM+ enquanto outros dois foram interpretados como livres de doença. Encontramos ainda dois casos com CTCs que falharam na detecção pelo PSA.

Em relação à recidiva bioquímica nos pacientes com doença localizada tratados com radioterapia e bloqueio androgênico, nenhum caso se enquadrava nessa situação. Entretanto, a partir do *cutoff* da porcentagem de leucócitos A4+CD45-EpCAM+, detectamos CTC em mais da metade deles.

Para os casos metastáticos em hormonioterapia de todos aqueles em risco de progressão para doença refratária à castração baseados no PSA, apenas um não foi confirmado pela porcentagem de leucócitos A4+CD45-EpCAM+.

A tabela 4 traz o registro dos valores de PSA, porcentagem de leucócitos A4+CD45-EpCAM+, MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+ e porcentagem de granulócitos A4+ em CD45-EpCAM+ de cada participante do grupo de pacientes. Os doze primeiros são aqueles com doença localizada durante e após tratamento e os seis subsequentes (do 13 ao 18) metastáticos em terapia androgênica. O último indivíduo apresentava neoplasia localizada virgem de tratamento. (Tabela 4)

Tabela 4 – Resultados das análises das combinações de marcadores e PSA total dos pacientes com neoplasia de próstata.

Paciente	Leucócitos A4+ CD45-EpCAM+ (%)	MFI de A4 Granulócitos (u.a)	Granulócitos CD45-EpCAM+ (%)	PSA (ng/mL)
1	-	-	-	1,09
2	-	-	-	0,33
3	-	-	-	0,13
4	-	-	-	0,04
5	75	77201	0,030	0,02
6	78.6	125685	0,043	0,40
7	68.8	69464	0,011	0,29
8	100	162333	0,018	<0,03
9	-	-	-	0,17
10	0	-	0	1,30
11	100	202141	0,088	<0,01
12	0	326428	0,027	0,04
13	73.5	801000	0,006	1,07
14	-	-	-	2
15	23.5	108149	0,043	<0,03
16	60	2400000	0,011	3,46
17	13.4	807000	0,190	2333
18	87.1	128785	0,005	0,48
19	0	4336	0,010	11

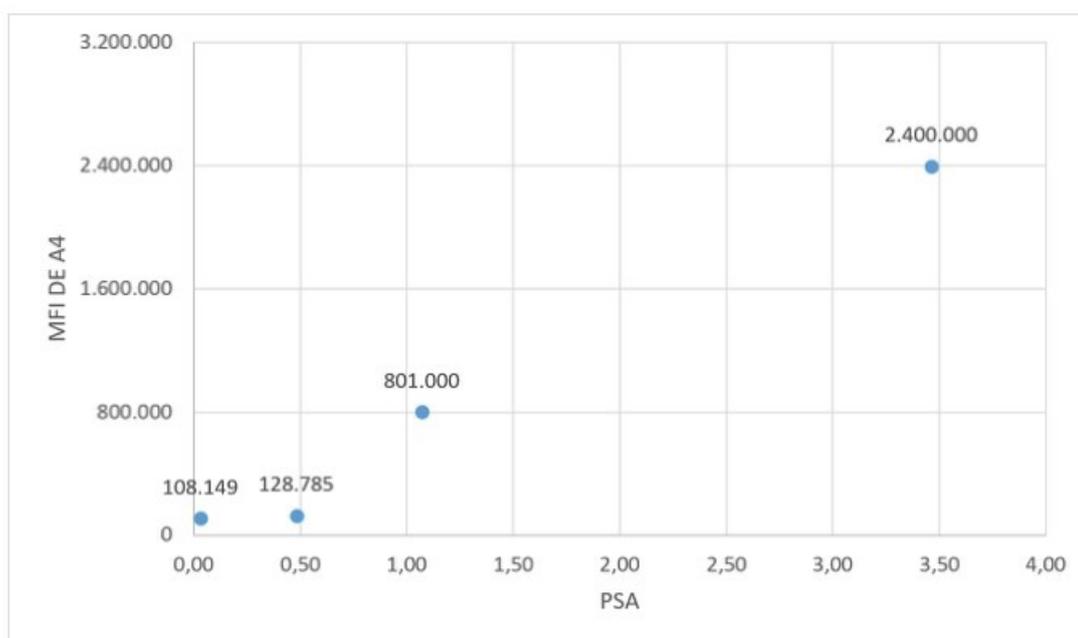
A amostragem de pacientes apresentou características heterogêneas da CaP. Dividimos os participantes em dois subgrupos sendo um com neoplasia localizada, no qual nenhum dos três testes apresentou correlação com o PSA total e outro com tumor metastático. (Tabela 5).

Apenas a MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+ apresentou resultado próximo a um valor estatisticamente significativo com alta correlação de Spearman (0,9), ao

Tabela 5 – Análise de correlação de Spearman entre as variáveis laboratoriais dos granulócitos e leucócitos analisados por citometria de fluxo e a variável dosagem de PSA dos pacientes com câncer de próstata localizado avaliados.

Variável		Leucócitos A4+ em CD45-EpCAM+ (%)	Granulócitos CD45-EpCAM+ (%)	MFI de A4 Granulócitos (u.a)
PSA total	ρ	-0,600	-0,607	-0,314
PSA total	P	0,154	0,166	0,563
	N	7	7	7

Figura 9 – Análises de correlação da variável laboratorial MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+ com o PSA total nos pacientes metastáticos em reposição hormonal.



analisarmos os pacientes com doença metastática em terapia hormonal. Um caso apresentou erro na identificação de CTCs e não pôde ser considerado. A MFI do paciente com PSA 2333ng/mL não foi registrada no gráfico abaixo, porém está acima da referência determinada (Figura 9). Todos apresentaram maior risco de progressão da doença. Vale ressaltar que erros de precisão no cálculo de p podem ocorrer em função do pequeno tamanho amostral. (Tabela 6)

Tabela 6 – Análise de correlação de Spearman entre as variáveis laboratoriais dos granulócitos e leucócitos analisados por citometria de fluxo e a variável dosagem de PSA dos pacientes com câncer de próstata metastático avaliados.

Variável		Leucócitos A4+ em CD45-EpCAM+ (%)	Granulócitos CD45-EpCAM+ (%)	MFI de A4 Granulócitos (u.a)
PSA total	P	-0,400	-0,400	-0,900
PSA total	P	0,516	0,516	0,083
	N	5	5	5

Para um PSA nadir de 0,2 ng/mL, quatro pacientes estavam na condição de risco para progressão da doença, ou seja, acima do valor de referência. Todos foram confirmados pelo

MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+. Identificamos ainda um paciente com CTCs em que houve falha bioquímica na detecção pelo PSA, cuja dosagem do marcador era menor que 0,2ng/mL.

Discussão

Essa pesquisa prospectiva teve o objetivo de detectar células tumorais circulantes (CTCs) através da citometria de fluxo a partir de três marcadores pré-selecionados, EpCAM, CD45 e a proteína alvo do aptâmero A4, na corrente sanguínea de pacientes com CaP. As populações de células estudadas foram os leucócitos e granulócitos. Por ser um estudo pioneiro na pesquisa das combinações dos marcadores supracitados, focamos na identificação das CTCs em portadores da neoplasia de próstata em diferentes estágios da doença - localizada virgem de tratamento ou submetida a terapia com intenção curativa e tumor metastático em bloqueio hormonal. Posteriormente foi realizada correlação entre os achados e as variáveis clinicopatológicas idade, cor de pele, estadiamento local e dosagem do antígeno prostático específico (PSA) total.

A proporção de CTCs em relação às hemácias e aos leucócitos no sangue é de aproximadamente uma em cem milhões e de uma a cada dez mil, respectivamente (KIRBY et al., 2012). Portanto, processos de enriquecimento são necessários para a detecção e quantificação celular, purificando-as em relação aos demais elementos plasmáticos (MIYAMOTO; SEQUIST; LEE, 2014). Atualmente a única metodologia aprovada pelo FDA é o *CellSearch*, na qual toda a amostra celular do sangue é analisada e CTCs nucleadas são identificadas através da expressão da EpCAM, das citoqueratinas 8, 18 e 19 e a marcação negativa do CD45 (MIYAMOTO; SEQUIST; LEE, 2014).

Limitações do *CellSearch* envolvem a perda de células ao longo das etapas de purificação, a ineficiente separação magnética, inviabilidade celular após fixação, interpretação subjetiva do operador. Ainda há o fato de existirem CTCs que não expressam a EpCAM e, assim, não são detectadas. Tal alteração é característica do fenótipo de indiferenciação celular resultante do fenômeno EMT (LI et al., 2015). Outras células não possuem citoqueratinas, apesar da presença do EpCAM, as quais não são capturadas pelo *CellSearch* (WANG et al., 2016).

O método proposto nesta investigação utiliza apenas a camada de leucócitos da amostra de sangue periférico. Os dados correspondentes às combinações dos três marcadores foram obtidos a partir das populações de leucócitos e, posteriormente, de granulócitos as

quais foram submetidas à análise pela citometria de fluxo. A MFI corresponde à análise da imagem emitida pela fluorescência do biomarcador naquela população específica. Alguns estudos sugerem que embora seja desejável avaliar as mudanças na intensidade dos marcadores, é uma opção menos viável em função da menor resolução dos softwares (SATELLI et al., 2017). Já as porcentagens de leucócitos e granulócitos correspondem ao método de quantificação celular que é similar ao *CellSearch*, baseado na enumeração das células (WANG et al., 2016).

Apesar de aprovado, o *CellSearch* tem uso limitado na prática clínica e ainda não foi recomendado nas diretrizes. Não foi demonstrada uma influência dos achados na determinação do tratamento a ser instituído ou na resposta a um determinado agente terapêutico (MAAS et al., 2019; WANG et al., 2016). Células normais também são lançadas na circulação em decorrência da toxicidade do tratamento e o método não é capaz de diferenciá-las em relação às neoplásicas (WANG et al., 2016). O fenótipo capturado através da combinação EpCAM, CD45 e citoqueratinas é de célula epitelial e não mesenquimal ou tumoral (WANG et al., 2016). A taxa de detecção, por todos os motivos supracitados, oscila entre 54 e 62% (WILBAUX et al., 2015). Foi demonstrada sensibilidade de 53% e especificidade de 83% do *CellSearch* na identificação de CTCs em pacientes metastáticos (SATELLI et al., 2017).

O AdnaTest é um outro método que também utiliza o anti-EpCAM, mas complementa a análise com PSA, PSMA e Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), resultando em detecção de 67% dos pacientes metastáticos antes do tratamento (ALBINO et al., 2013). Contudo, não foi utilizado para o monitoramento de recorrências da neoplasia.

O aptâmero A4 é um oligonucleotídeo com alta afinidade pela linhagem celular PC3 do CaP cuja molécula alvo ainda não foi determinada (SOUZA et al., 2015). Analisado como biomarcador EpCAM independente, acredita-se que não esteja relacionado a detecção do fenótipo epitelial. Apresentou acurácia de 98% na identificação de CTCs através da citometria de fluxo, com sensibilidade de 97% e especificidade 100% em pacientes virgens de tratamento e sob diferentes regimes terapêuticos (OLIVEIRA et al., 2017). Diferente cohort analisou a captura de CTCs através do marcador mesenquimal vimentina e apresentou sensibilidade de 93% e especificidade de 94% na detecção de CTCs em pacientes com neoplasia de próstata em diferentes fases da doença (SATELLI et al., 2017). Resultados esses mais próximos ao rendimento do aptâmero A4 o que sugere que o oligonucleotídeo possa ser marcador de fenótipo indiferenciado.

A análise dos dados dos participantes de nossa pesquisa permitiu observar diferença entre pacientes e controles nas porcentagens de granulócitos CD45-EpCAM+. A menor porcentagem de células com essa combinação de marcadores nos indivíduos com CaP durante ou após tratamento em relação àqueles sadios, sugere um maior grau de perda das características epiteliais das CTCs, indicando avanço no fenômeno EMT. Observação importante a ser feita em relação ao paciente 19, virgem de tratamento com doença loca-

lizada que apresentava baixa porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+ foi atribuída à reduzida quantidade de CTCs e não à indiferenciação celular.

Já a diferença entre os grupos na porcentagem de leucócitos A4+CD45-EpCAM+ e a MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+ foi interpretada como indicativo de maior presença de células neoplásicas indiferenciadas no sangue periférico dos pacientes com CaP. Valores de referência foram sugeridos para cada uma das combinações a partir dos quais os casos poderiam ser interpretados como portadores de CTCs uma vez que a situação não ocorre em nenhum indivíduo do grupo controle. Assim, a partir dos *cutoff* estabelecidos haveria elevada especificidade na identificação de CTCs no monitoramento da neoplasia de próstata em paciente durante ou após tratamento.

O PSA é preconizado em todas as etapas do câncer de próstata (CaP): rastreamento, diagnóstico, recidiva, prognóstico e eficácia do tratamento (SANHUEZA; KOHLI, 2018). A performance no rastreamento demonstra sensibilidade entre 70 e 90%, enquanto a especificidade gira em torno de 20 a 40% e Valor preditivo positivo (VPP) de 25%. VPP e Valor preditivo negativo (VPN) têm maior importância estatística por relatarem confiança no valor do teste (PRENSNER et al., 2012).

A meia vida das CTCs na corrente sanguínea é de 58 dias enquanto a da molécula de PSA é de 85 dias, um dos motivos pelos quais sugere-se maior fidedignidade da oscilação das CTCs no monitoramento da doença (WILBAUX et al., 2015). Os resultados do *Cell-Search* indicam que a quantificação de CTCs prediz melhor a sobrevida e seria, portanto, melhor marcador de resposta a diferentes tratamentos (MIYAMOTO; SEQUIST; LEE, 2014).

As análises das porcentagens de granulócitos CD45-EpCAM+ e leucócitos A4+CD45-EpCAM+, apresentaram sensibilidade inferior ao PSA para o diagnóstico, porém maior especificidade e VPP. O MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+ foi o que demonstrou maior acurácia dentre os três. Cada teste supracitado identificou CTCs em pouco mais da metade dos doentes, apesar da maioria ser considerada em situação de controle quando analisada a dosagem de PSA. As combinações específicas dos marcadores demonstraram ser promissoras na detecção de CTC, com maior confiança em relação ao PSA na identificação de metástases. Resta saber qual a importância prognóstica dos achados da biópsia líquida na sobrevida global e livre de progressão.

Quando analisados todos os participantes, houve uma relação inversa entre a porcentagem de granulócitos CD45-EpCAM+ e o PSA total. Considerando que o EpCAM é uma molécula de adesão celular e o CD45 é específico de leucócitos, os baixos níveis dessa combinação podem indicar a presença do fenômeno EMT com células tumorais indiferenciadas na corrente sanguínea. Estes marcadores foram coincidentemente associados aos valores mais elevados de PSA, o que sugere maior risco de progressão. Outros dois casos evidenciaram CTCs porém com baixo PSA, provavelmente em virtude de um processo de indiferenciação celular mais avançado que não é refletido pela dosagem do antígeno.

5.1 Monitoramento na doença localizada

Diferentes *cohorts* estabeleceram positividade do *CellSearch* em apenas 10% a 17% dos casos de CaP de alto grau localizado. Não houve correlação entre a detecção e o volume tumoral, PSA, escore de Gleason, estadiamento ou recidiva bioquímica (NEUHAUS; YANG, 2018; DAVIS et al., 2008; THALGOTT et al., 2015; MEYER et al., 2016). É incerto se a metodologia não possui sensibilidade para captura de baixos níveis de CTCs (KUSKE et al., 2016).

Levando-se em conta o monitoramento de recidiva bioquímica após radioterapia, definida como PSA acima de 2ng/mL do nadir (NGUYEN; BOLDT; RODRIGUES, 2015), não foi estabelecido um valor absoluto abaixo do qual possa ser determinado controle a longo prazo. Até 25% dos pacientes apresentam elevação tardia, mesmo que inicialmente haja resposta favorável (VICINI et al., 2005). Cerca de 30 a 50% dos casos irão desenvolver recorrência nos primeiros 10 anos (ROVIELLO et al., 2017). Geara et al. (2017) sugerem que um nadir menor que 0,06ng/mL está associado a melhor prognóstico em relação a progressão clínica da doença (GEARA et al., 2017; STENMAN et al., 2005).

Os participantes do nosso estudo com doença localizada não apresentaram correlação entre os testes baseados na detecção de CTCs e o PSA total, semelhante ao que ocorre com o *CellSearch* (KHURANA et al., 2013; MEYER et al., 2016). Todos tinham PSA abaixo do valor definido como recidiva bioquímica e alguns com o marcador abaixo do nadir proposto de 0,06ng/mL. Mesmo com essa redução, CTCs foram identificadas em todos os casos por pelo menos uma das combinações propostas, o que reforça a precariedade do PSA no monitoramento do CaP (VICINI et al., 2005). A captura de CTCs pode corresponder à existência de células metastáticas com possível recorrência clínica da doença no futuro.

5.2 Monitoramento na doença metastática

Atualmente, a importância prognóstica das CTCs está bem documentada para a doença metastática resistente à castração. Poucos estudos abordam seu papel nos quadros hormônio-sensíveis. Entretanto, sugerem que haja piora na sobrevida e maior progressão tumoral com o aumento das CTCs (PANTEL; HILLE; SCHER, 2019; FOLKERSMA et al., 2012).

Pacientes com doença metastática em terapia hormonal são monitorados através da dosagem de PSA total. A maioria das *cohorts* sugere nadir de 0.2ng/mL, (HUSSAIN et al., 2006) enquanto DAMICO et al. propõe 0.5ng/mL (CRAWFORD et al., 2013). Sabe-se ainda que há piora prognóstica significativa quando o PSA está acima de 4ng/mL durante bloqueio androgênico (HUSSAIN et al., 2006). Menores valores sugerem baixa atividade do receptor androgênico ou progressão de doença independente deste. Dosagens elevadas podem indicar supressão incompleta ou atividade alterada do mesmo e, portanto,

risco de evolução para resistência à castração antes de evidências clínicas de recorrência da neoplasia. Assim, o PSA total não é fidedigno da resposta glandular ao tratamento (CRAWFORD et al., 2013). Segundo Helo et al. houve correlação moderada entre os valores de PSA e a contagem de CTC pelo *CellSearch* nas neoplasias hormônio-resistentes (HELO et al., 2009).

Dentre as três combinações de marcadores e as diferentes populações de células analisadas, nenhuma apresentou correlação estatisticamente significativa com a dosagem de PSA total, provavelmente em virtude do tamanho reduzido da amostra. O MFI de A4 em granulócitos A4+CD45-EpCAM+ apresentou p de 0.08 com pequena diferença em relação ao nível de confiança proposto de 0.05, mas correlação de Spearman de 0.9, altamente significativa. Considerando que a maioria dos pacientes apresentava PSA abaixo de 4ng/mL e que foram detectadas CTCs em todos esses, é possível que o MFI esteja relacionado à queda na atividade de receptor de andrógeno nessas situações, característico de doença indiferenciada e, assim, maior probabilidade de progressão para hormônio-refratária. O participante 17 estava no início tratamento hormonal e também apresentou MFI com resultado significativo, nesse caso compatível com a presença de CTCs por bloqueio incompleto e doença disseminada. Portanto, a oscilação do PSA é um fraco preditor de sucesso terapêutico (PANTEL; HILLE; SCHER, 2019; MIYAMOTO; SEQUIST; LEE, 2014).

As porcentagens de leucócitos A4+CD45-EpCAM+ e granulócitos CD45-EpCAM+ foram capazes de detectar CTCs em quase todos os casos metastáticos, com exceção dos pacientes 15 e 17. No primeiro participante o PSA era compatível com baixo risco de progressão da doença e os achados foram compatíveis com poucas células indiferenciadas e maior quantidade de epiteliais no sangue, não necessariamente tumorais. No segundo caso a interpretação do autor consiste em limitação da detecção de CTCs em ambas as populações celulares analisadas.

5.3 Limitações do método

A pequena amostragem com 19 pacientes mostrou-se uma importante limitação do estudo.

O Tempo de dobra do PSA (PSADT) sugere a agressividade tumoral cuja principal aplicabilidade consiste na resistência à castração sem metástases identificadas. Quanto menor o valor, menor a sobrevida global e livre de metástases (HOWARD et al., 2017; D'AMICO et al., 2003). Estudos prospectivos de longo prazo comparando o PSADT com os testes sugeridos neste trabalho são necessários para prever a importância das CTCs na progressão da doença metastática. Assim, a comparação com uma medida única do PSA total foi outra limitação do projeto.

Estudos com *follow-up* mais longo são necessários para avaliar qual a relação entre

a oscilação na captura de CTCs e a evolução clínica da neoplasia. Faltam ensaios que correlacionem a progressão de doença baseada na detecção de CTCs e a mudança de tratamento do paciente.

A combinação dos marcadores se mostrou promissora para o monitoramento de recorrência do câncer de próstata, seja ele metastático ou localizado, mesmo com pequena amostragem e *follow-up* reduzido.

Conclusão

A metodologia aplicada utilizando a combinação de três marcadores como proposto neste estudo apresentou maior acurácia em relação ao *CellSearch*, método tradicional de detecção e marcação de células tumorais.

Foi possível identificar com maior fidedignidade a presença de metástases através das co-marcações pré-estabelecidas.

A capacidade de detecção foi mais simples com a população de leucócitos, requerendo uma janela mais simplificada para análise, com acurácia praticamente semelhante à detecção através de combinações nos granulócitos.

Em relação às perspectivas futuras, o seguimento de pacientes tratados a longo prazo e uma maior amostragem faz-se necessário para avaliar a associação entre o achado de células metastáticas e a sobrevida global ou livre de metástases, tanto nos casos com neoplasia localizada quanto nas disseminadas.

Referências

- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical reviews in biotechnology**, Taylor & Francis, v. 37, n. 2, p. 163–176, 2017.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- ALBINO, G. et al. Potential usefulness of ctc detection in follow up of prostate cancer patients. a preliminary report obtained by using adnagene platform. **Archivio Italiano di Urologia e Andrologia**, v. 85, n. 4, p. 164–169, 2013.
<https://doi.org/10.4081/aiua.2013.4.164>
- ARMAKOLAS, A. et al. Detection of the circulating tumor cells in cancer patients. **Future Oncology**, Future Medicine, v. 6, n. 12, p. 1849–1856, 2010.
<https://doi.org/10.2217/fon.10.152>
- ARTIBANI, W. et al. Management of biochemical recurrence after primary curative treatment for prostate cancer: a review. **Urologia internationalis**, Karger Publishers, v. 100, n. 3, p. 251–262, 2018.
<https://doi.org/10.1159/000481438>
- BITTING, R. L. et al. Clinical phenotypes associated with circulating tumor cell enumeration in metastatic castration–resistant prostate cancer. In: ELSEVIER. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. [S.l.], 2015. v. 33, n. 3, p. 110–e1.
<https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2014.09.002>
- BROECK, T. Van den et al. Prognostic value of biochemical recurrence following treatment with curative intent for prostate cancer: a systematic review. **European urology**, Elsevier, 2018.
- CAMPOS, A. et al. Epcam expression in lymph node and bone metastases of prostate carcinoma: A pilot study. **International journal of molecular sciences**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 17, n. 10, p. 1650, 2016.
<https://doi.org/10.3390/ijms17101650>
- CEGAN, M. et al. Circulating tumor cells in urological cancers. **Folia histochemica et cytobiologica**, v. 55, n. 3, p. 107–113, 2017.
<https://doi.org/10.5603/FHC.a2017.0015>
- Centers for Disease Control and Prevention and others. United states cancer statistics: Data visualizations. **Retrieved September**, v. 27, 2018. Disponível em: <<https://gis.cdc.gov/Cancer/USCS/DataViz.html>>.

- CHANG, Y. M.; DONOVAN, M. J.; TAN, W. Using aptamers for cancer biomarker discovery. **Journal of nucleic acids**, Hindawi, v. 2013, 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/817350>
- CRAWFORD, E. D. et al. The utility of prostate-specific antigen in the management of advanced prostate cancer. **BJU international**, Wiley Online Library, v. 112, n. 5, p. 548–560, 2013.
<https://doi.org/10.1111/bju.12061>
- DAVIS, J. W. et al. Circulating tumor cells in peripheral blood samples from patients with increased serum prostate specific antigen: initial results in early prostate cancer. **The Journal of urology**, Elsevier, v. 179, n. 6, p. 2187–2191, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.01.102>
- DIJKSTRA, S. et al. Personalized management in low-risk prostate cancer: the role of biomarkers. **Prostate cancer**, Hindawi, v. 2012, 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/327104>
- D'AMICO, A. V. et al. Surrogate end point for prostate cancer-specific mortality after radical prostatectomy or radiation therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford University Press, v. 95, n. 18, p. 1376–1383, 2003.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djg043>
- FOLKERSMA, L. R. et al. Prognostic significance of circulating tumor cell count in patients with metastatic hormone-sensitive prostate cancer. **Urology**, Elsevier, v. 80, n. 6, p. 1328–1332, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.urology.2012.09.001>
- FRANCA, C. A. da S.; VIEIRA, S. L.; PENNA, A. B. R. C. Definição de recidiva bioquímica após tratamento radioterápico do câncer de próstata localizado: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 57–61, 2008.
- GEARA, F. B. et al. Nadir psa is a strong predictor of treatment outcome in intermediate and high risk localized prostate cancer patients treated by definitive external beam radiotherapy and androgen deprivation. **Radiation Oncology**, BioMed Central, v. 12, n. 1, p. 149, 2017.
<https://doi.org/10.1186/s13014-017-0884-y>
- HELO, P. et al. Circulating prostate tumor cells detected by rt-pcr in men with localized or castration-refractory prostate cancer: concordance with cellsearch assay and association with bone metastases and with survival. **Clinical chemistry**, NIH Public Access, v. 55, n. 4, p. 765, 2009.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.117952>
- HORI, S.-i. et al. Current advances in aptamers for cancer diagnosis and therapy. **Cancers**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 10, n. 1, p. 9, 2018.
<https://doi.org/10.3390/cancers10010009>
- HOWARD, L. E. et al. Thresholds for psa doubling time in men with non-metastatic castration-resistant prostate cancer. **BJU international**, Wiley Online Library, v. 120, n. 5B, p. E80–E86, 2017.
<https://doi.org/10.1111/bju.13856>

HUANG, L. et al. Functions of epcam in physiological processes and diseases. **International journal of molecular medicine**, Spandidos Publications, v. 42, n. 4, p. 1771–1785, 2018.

<https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3764>

HUSSAIN, M. et al. Absolute prostate-specific antigen value after androgen deprivation is a strong independent predictor of survival in new metastatic prostate cancer: data from southwest oncology group trial 9346 (int-0162). **Journal of clinical oncology**, American Society of Clinical Oncology, v. 24, n. 24, p. 3984–3990, 2006.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.4246>

IMRICH, S.; HACHMEISTER, M.; GIRES, O. Epcam and its potential role in tumor-initiating cells. **Cell adhesion & migration**, Taylor & Francis, v. 6, n. 1, p. 30–38, 2012.

<https://doi.org/10.4161/cam.18953>

INCA - Brasil. Ministério da saúde. **Instituto Nacional de Câncer-INCA, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA**, p. 83, 2016.

KHURANA, K. K. et al. Prevalence of circulating tumor cells in localized prostate cancer. **Current urology**, Karger Publishers, v. 7, n. 2, p. 65–69, 2013.

<https://doi.org/10.1159/000356251>

KIRBY, B. J. et al. Functional characterization of circulating tumor cells with a prostate-cancer-specific microfluidic device. **PloS one**, Public Library of Science, v. 7, n. 4, p. e35976, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035976>

KOZMINSKY, M. et al. Detection of ctc clusters and a dedifferentiated rna-expression survival signature in prostate cancer. **Advanced Science**, Wiley Online Library, 2019.

<https://doi.org/10.1002/adv.201801254>

KUSKE, A. et al. Improved detection of circulating tumor cells in non-metastatic high-risk prostate cancer patients. **Scientific reports**, Nature Publishing Group, v. 6, p. 39736, 2016.

<https://doi.org/10.1038/srep39736>

LEÓN-MATEOS, L. et al. Clinical application of circulating tumour cells in prostate cancer: from bench to bedside and back. **International journal of molecular sciences**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 17, n. 9, p. 1580, 2016.

<https://doi.org/10.3390/ijms17091580>

LI, J. et al. Using circulating tumor cells to inform on prostate cancer biology and clinical utility. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, Taylor & Francis, v. 52, n. 4, p. 191–210, 2015.

<https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1023430>

LOWES, L. E. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to disease-stage differences in circulating tumor cell detection and metastasis in pre-clinical models of prostate cancer. **Oncotarget**, Impact Journals, LLC, v. 7, n. 46, p. 76125, 2016.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12682>

- MAAS, M. et al. Circulating tumor cells and their role in prostate cancer. **Asian journal of andrology**, Wolters Kluwer–Medknow Publications, v. 21, n. 1, p. 24, 2019. https://doi.org/10.4103/aja.aja_29_17
- MCCORMICK, B. Z. et al. Biochemical recurrence after radical prostatectomy: Current status of its use as a treatment endpoint and early management strategies. **Indian Journal of Urology: IJU: Journal of the Urological Society of India**, Wolters Kluwer–Medknow Publications, v. 35, n. 1, p. 6, 2019.
- MEYER, C. P. et al. Limited prognostic value of preoperative circulating tumor cells for early biochemical recurrence in patients with localized prostate cancer. In: ELSEVIER. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. [S.l.], 2016. v. 34, n. 5, p. 235–e11. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.12.003>
- MIYAMOTO, D. T.; SEQUIST, L. V.; LEE, R. J. Circulating tumour cells—monitoring treatment response in prostate cancer. **Nature reviews Clinical oncology**, Nature Publishing Group, v. 11, n. 7, p. 401, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.82>
- NEUHAUS, J.; YANG, B. Liquid biopsy potential biomarkers in prostate cancer. **Diagnostics**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 8, n. 4, p. 68, 2018. <https://doi.org/10.3390/diagnostics8040068>
- NGUYEN, T.; BOLDT, R. G.; RODRIGUES, G. Prognostic factors for prostate cancer endpoints following biochemical failure: a review of the literature. **Cureus**, Cureus Inc., v. 7, n. 1, 2015. <https://doi.org/10.7759/cureus.238>
- NI, J. et al. Epithelial cell adhesion molecule (epcam) is involved in prostate cancer chemotherapy/radiotherapy response in vivo. **BMC cancer**, BioMed Central, v. 18, n. 1, p. 1092, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5010-5>
- OLIVEIRA, L. A. d. et al. Implicações translacionais de uma nova ferramenta de detecção de célula: tumorais circulantes no monitoramento do câncer de próstata. Universidade Federal de Uberlândia, 2017.
- PANTEL, K.; HILLE, C.; SCHER, H. I. Circulating tumor cells in prostate cancer: From discovery to clinical utility. **Clinical chemistry**, Clinical Chemistry, v. 65, n. 1, p. 87–99, 2019. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.287102>
- PANTELEAKOU, Z. et al. Detection of circulating tumor cells in prostate cancer patients: methodological pitfalls and clinical relevance. **Molecular medicine**, Springer, v. 15, n. 3-4, p. 101–114, 2009. <https://doi.org/10.2119/molmed.2008.00116>
- PRENSNER, J. R. et al. Beyond psa: the next generation of prostate cancer biomarkers. **Science translational medicine**, American Association for the Advancement of Science, v. 4, n. 127, p. 127rv3–127rv3, 2012. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003180>

- QASEEM, A. et al. Screening for prostate cancer: a guidance statement from the clinical guidelines committee of the american college of physicians. **Annals of internal medicine**, Am Coll Physicians, v. 158, n. 10, p. 761–769, 2013.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-10-201305210-00633>
- ROVIELLO, G. et al. Circulating tumor cells correlate with patterns of recurrence in patients with hormone-sensitive prostate cancer. **OncoTargets and therapy**, Dove Press, v. 10, p. 3811, 2017.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S143020>
- SAINI, S. Psa and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular Oncology**, Springer, v. 39, n. 2, p. 97–106, 2016.
<https://doi.org/10.1007/s13402-016-0268-6>
- SANHUEZA, C.; KOHLI, M. Clinical and novel biomarkers in the management of prostate cancer. **Current treatment options in oncology**, Springer, v. 19, n. 2, p. 8, 2018.
<https://doi.org/10.1007/s11864-018-0527-z>
- SATELLI, A. et al. Emt circulating tumor cells detected by cell-surface vimentin are associated with prostate cancer progression. **Oncotarget**, Impact Journals, LLC, v. 8, n. 30, p. 49329, 2017.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.17632>
- SEYFRIED, T. N.; HUYSENTRUYT, L. C. On the origin of cancer metastasis. **Critical reviews in oncogenesis**, NIH Public Access, v. 18, n. 1-2, p. 43, 2013.
<https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.v18.i1-2.40>
- SHAO, Y.-H. et al. Contemporary risk profile of prostate cancer in the united states. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, Oxford University Press, v. 101, n. 18, p. 1280–1283, 2009.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djp262>
- SOUZA, A. G. d. et al. 3d cell-selex: seleção e caracterização in vitro de aptâmeros de rna ligantes específicos às células tumorais prostáticas. Universidade Federal de Uberlândia, 2015.
- SPIZZO, G. et al. Epcam expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. **Journal of clinical pathology**, BMJ Publishing Group, v. 64, n. 5, p. 415–420, 2011.
<https://doi.org/10.1136/jcp.2011.090274>
- STENMAN, U.-H. et al. Prognostic value of serum markers for prostate cancer. **Scandinavian journal of urology and nephrology**, Taylor & Francis, v. 39, n. sup216, p. 64–81, 2005.
<https://doi.org/10.1080/03008880510030941>
- THALGOTT, M. et al. Detection of circulating tumor cells in locally advanced high-risk prostate cancer during neoadjuvant chemotherapy and radical prostatectomy. **Anticancer research**, International Institute of Anticancer Research, v. 35, n. 10, p. 5679–5685, 2015.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, Elsevier, v. 147, n. 2, p. 275–292, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>

VICINI, F. A. et al. Limitations in the use of serum prostate specific antigen levels to monitor patients after treatment for prostate cancer. **The Journal of urology**, Elsevier, v. 173, n. 5, p. 1456–1462, 2005.

<https://doi.org/10.1097/01.ju.0000157323.55611.23>

WANG, L. et al. Promise and limits of the cellsearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. In: ELSEVIER. **Seminars in oncology**. [S.l.], 2016. v. 43, n. 4, p. 464–475.

<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.06.004>

WILBAUX, M. et al. A joint model for the kinetics of ctc count and psa concentration during treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. **CPT: pharmacometrics & systems pharmacology**, Wiley Online Library, v. 4, n. 5, p. 277–285, 2015.

<https://doi.org/10.1002/psp4.34>

ZHANG, T.; ARMSTRONG, A. J. Clinical utility of circulating tumor cells in advanced prostate cancer. **Current oncology reports**, Springer, v. 18, n. 1, p. 3, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s11912-015-0490-9>

Apêndices

APÊNDICE **A**

Parecer Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização in vitro e in vivo do aptâmero A4 de RNA ligante específico de células de câncer de próstata

Pesquisador: VIVIAN ALONSO GOULART

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71108817.2.0000.5152

Instituição Proponente: Instituto de Genética e Bioquímica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.451.492

Apresentação do Projeto:

Trata-se de análise de respostas às pendências apontadas no parecer consubstanciado número 2.250.011, de 31 de Agosto de 2017.

Segundo os pesquisadores:

"Serão selecionados os pacientes com câncer e neoplasias benignas, onde será coletado tecido, sangue e urina. O tecido será submetido ao isolamento de células da próstata e analisado histopatologicamente. As células isoladas de tecidos serão incubadas com o aptâmero A4 de RNA e serão realizados ensaios in vitro de citotoxicidade, proliferação e migração celular. Usando a técnica de PCR em tempo real será analisado o perfil da expressão gênica das células. O sangue dos pacientes serão utilizados para o isolamento das células tumorais circulantes, que serão separadas por citometria de fluxo aquelas células ligantes ao aptâmero A4 de RNA. Em seguida estas células serão caracterizadas e inoculadas em camundongos para avaliação de metástases.

Os aptâmeros são oligonucleotídeos que podem atuar como ferramentas teranósticas por se unirem a alvos específicos podendo constituir biomarcadores de doenças. O aptâmero de RNA A4 é um ligante específico de células de câncer de próstata, selecionado pela técnica de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento EXponencial em cultura 3D (3D Cell-SELEX). Este estudo visa caracterizar in vitro e in vivo o aptâmero A4. Primeiramente, será avaliada a

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.451.492

citotoxicidade, a proliferação e migração celular, e a expressão de genes associados ao câncer de próstata em linhagens celulares e em células isoladas dos tecidos dos pacientes (prostáticas normais e tumorais) após incubação com o aptâmero A4. Em seguida, serão isoladas células tumorais circulantes (CTC) do sangue e células da urina de pacientes com câncer de próstata por citometria de fluxo usando o aptâmero A4 como marcador destas células. Posteriormente, será estudado o potencial metastático das CTCs identificadas pelo aptâmero A4 através da inoculação in vivo destas células. Uma vez que o aptâmero A4 seja caracterizado, este poderá ser empregado para detecção do câncer de próstata e em sistemas de drug delivery para tratamento desta doença".

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os documentos da pesquisa:

"Objetivo Primário: Caracterizar in vitro e in vivo o aptâmero de RNA A4 ligante de células tumorais da próstata para o desenvolvimento de uma nova metodologia de diagnóstico.

Objetivo Secundário:

- Analisar a citotoxicidade, proliferação e migração das células isoladas da próstata de tecido normal e tumoral de pacientes incubadas com o aptâmero de RNA A4;- Analisar a expressão gênica das células isoladas da próstata de tecido normal e tumoral de pacientes".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme os pesquisadores:

"Riscos: O estudo não oferecerá risco considerável, garantirá o sigilo dos dados coletados e os indivíduos envolvidos serão identificados por meio de códigos (números). Entretanto, existe risco de identificação do participante durante a pesquisa. Um leve desconforto poderá ocorrer apenas devido a possibilidade de formação de um pequeno hematoma no local de punção venosa e devido a picada necessária para o procedimento de coleta de sangue dos pacientes, contudo poderá ser amenizado pela realização do mesmo por profissionais habilitados. Serão respeitadas as orientações do Ministério da Saúde do Brasil, resolução 466/12 para a pesquisa de seres humanos.

Benefícios: Possibilidade de seleção de marcadores moleculares que auxiliarão no desenvolvimento de uma nova técnica de diagnóstico diferencial entre os casos de câncer de próstata e tumores

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.451.492

benignos, auxiliando no prognóstico da doença e possibilitando o uso dos aptâmeros como carreadores de drogas".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As pendências relacionadas no Parecer Consubstanciado anterior do CEP/UFU foram respondidas e feitos os ajustes solicitados. A pesquisa será explicada e fornecido um tempo para o participante decidir se deseja ou não participar do estudo, o TCLE incluiu todas as etapas do estudo, esclareceu-se ainda que a não participação no estudo não interferirá no tratamento recebido no hospital, os objetivos adequados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados e estão em conformidade com a legislação vigente.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer consubstanciado número 2.250.011, de 31 de Agosto de 2017, foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Janeiro de 2019.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Janeiro de 2020.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Janeiro de 2021.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.451.492

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_899245.pdf	11/09/2017 14:31:45		Aceito
Outros	respostaspendencias110917.pdf	11/09/2017 14:29:36	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE.pdf	11/09/2017 14:29:00	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.451.492

Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	11/09/2017 14:29:00	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	11/09/2017 14:28:30	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	stephania.pdf	23/06/2017 15:43:22	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termodecompromisso2017.pdf	12/06/2017 13:52:54	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	coparticipanteHCU.pdf	12/06/2017 13:25:20	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	06/06/2017 10:13:33	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Outros	linkCurriculoLattes.doc	06/06/2017 09:46:07	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Outros	INSTRUMENTOCOLETA.pdf	05/05/2017 10:46:36	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 20 de Dezembro de 2017

Assinado por:

**Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)**

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br