

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Caracterização de células ligantes do aptâmero D4 pelos anticorpos marcadores de células tronco do câncer anti-CD44 e anti-CD133

Danilo Caixeta Moreira

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Março - 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Caracterização de células ligantes do aptâmero D4 pelos anticorpos marcadores de células tronco do câncer anti-CD44 e anti-CD133

Danilo Caixeta Moreira

Profª. Dra. Vivian Alonso Goulart

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Março - 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Caracterização de células ligantes do aptâmero D4 pelos anticorpos marcadores de células tronco do câncer anti-CD44 e anti-CD133

Danilo Caixeta Moreira

Prof^a. Dra. Vivian Alonso Goulart
Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em ____/____/____

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

Uberlândia - MG
Março -2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Caracterização de células ligantes do aptâmero D4 pelos anticorpos marcadores de células tronco do câncer anti-CD44 e anti-CD133

Danilo Caixeta Moreira

Aprovado pela Banca Examinadora em: _____ / _____ / _____ Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, _____ de _____ de _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a professora Dra. Vivian Alonso Goulart por me orientar durante o desenvolvimento deste trabalho e, além disso, por ter me acolhido em um momento que eu me encontrava sem perspectivas em relação a graduação e me mostrar um novo horizonte de possibilidades. À Esther Campos-Fernandes por me ajudar imensamente com os experimentos, análises e pela parceria no laboratório.

Aos meus pais, Maria Regina Caixeta e Jose Maria Vaz Moreira, por terem me dado força e apoio de todas as formas que poderiam ter concedido, por serem o alicerce de todas as minhas realizações, sendo aquelas que já realizei, que estou realizando e as que realizarei.

À minha madrinha Rosemeire Abadia Moreira por ser um referencial pessoal e por sempre estender a mão para ajudar quando percebia que eu precisava e por me apoiar em minhas escolhas.

Aos meus amigos, em especial à Luiza Seemann e Clara Maria Faria Silva por estarem ao meu lado quando precisei, sendo compartilhando momentos bons ou ruins vividos ao longo desses anos de graduação. À Luiza por ter sido uma ótima colega não só de classe, mas também de casa; por ter me motivado nos momentos mais difíceis; por ser uma perfeita parceira nos inúmeros trabalhos que fizemos durante esses anos e também por ser uma ótima parceira nas horas de lazer. À Clara por me motivar e ajudar a me tornar uma pessoa melhor a cada dia, seja por uma perspectiva pessoal ou profissional.

Aos meus amigos de infância que sempre me apoiaram e me estenderam a mão quando precisei de um apoio para me reestabelecer e reerguer.

E por fim, mas não menos importante, a mim. A mim por insistir em lutar cada batalha e enfrentar cada obstáculo mesmo quando parecia tudo em vão, por sempre buscar uma luz quando tudo parecia escuro e por continuamente arrumar uma forma de erguer a cabeça e

percorrer o caminho à frete, assim como diria o personagem Joe de *The Last Of Us* “*no matter what, you keep finding something to fight for*”.

RESUMO

Palavras-Chave: Nanobiotecnologia; Câncer de Próstata; Aptâmero.

O câncer de próstata é um mal que assombra muitos homens, principalmente quando ficam mais velhos. Para contornar essa doença temida por muitos, diversos diagnósticos e tratamentos estão sendo pesquisados e desenvolvidos para também trazer uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Dentre essas pesquisas, o campo da nanobiotecnologia está sendo amplamente utilizado devido sua alta maleabilidade e especificidade. Uma ferramenta que consegue trazer essas duas características são os aptâmeros cujo presente estudo se aprofundou. Por meio de citometria de fluxo foi analisado as características das células circulantes de pacientes diagnosticados com câncer de próstata afim de esclarecer o tipo celular alvo do aptâmero D4. Para tal, foi utilizado os anticorpos anti-CD44 e anti-CD133 visto que são biomarcadores associados ao câncer de próstata. A associação do aptâmero com os anticorpos realizada aponta a afinidade do D4 para células com maior marcação de anti-CD133, sendo esse, associado a células tumorais circulantes de tipos mais agressivos de câncer de próstata. A partir das análises feitas no estudo, pode-se dizer que o aptâmero mostra bom potencial para ser utilizado como marcador de células tumorais, sendo assim, um bom meio de desenvolver novos diagnósticos e tratamentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Antígeno prostático específico (PSA)	3
1.2 Aptâmero D4	4
1.3 Células tumorais circulantes	4
1.4 Anticorpo anti-CD 44 e anti-CD 133	5
1.5 Citometria de fluxo	6
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 Preparação das amostras de sangue periférico com os marcadores	7
3.2 Análise dos dados citométricos	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	10
4.1 Características dos pacientes	10
4.2 Intensidade média de fluorescência	11
4.3 Potencial de identificação de células tumorais circulantes	12
4.4 Caracterização das células alvo do aptâmero D4	15
5. CONCLUSÃO	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Dados Clínicos e laboratoriais dos grupos pacientes e controle.....	11
Tabela 2 - Análise comparativa dos marcadores.....	12

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Percentual de células D4 ⁺	13
Figura 2 - Células D4 ⁺ juntamente com outros marcadores.....	14
Figura 3 - Intensidade de Fluorescência dos Marcadores.....	16
Figura 4 - Fluorescência entre os grupos de estudo.....	17

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação tica

CaP – Câncer de Próstata

CTC – Célula Tronco Tumoral

EpCAM – Molécula de Adesão Celular Epitelial

INCA – Instituto Nacional de Câncer

MFI – Intensidade Média de Fluorescência

PHI – *Prostate Health Index*

PSA – Antígeno Prosttico específico

SELEX – Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEM – Transição Epitelial Mesenquimal

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

1. INTRODUÇÃO

De acordo com os dados levantados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA-2020) no Brasil, a estimativa de novos casos de Câncer em 2020, que também é válido para 2021, é de aproximadamente 626 mil casos. Desses, cerca de 66 mil casos são de Câncer de Próstata (CaP), o que corresponde a 29% dos casos de câncer que acometem homens. Quando analisada a relação dos casos de câncer e seus respectivos números de óbitos, constatou-se que o CaP é o segundo maior no quesito mortalidade (INCA, 2020). Ainda há alguns fatores de risco significativos para o Câncer de próstata, tais como: a idade, sendo esse o fator considerado mais decisivo; histórico familiar, podendo apontar riscos por fatores genéticos; excesso de gordura corporal; exposição à compostos químicos, como aminas aromáticas, arsênio e derivados do petróleo.

Quando o indivíduo começa a desenvolver a doença, em sua fase inicial (mutações em células prostáticas que iniciam o processo tumoral), o CaP não apresenta nenhum sintoma, mas quando apresenta, são semelhantes aos do crescimento benigno da próstata. Por outro lado, com a evolução do tumor primário de CaP, pode-se tornar metastático. O processo de metástase ocorre quando uma subpopulação de células do tumor sofre o processo de Transição Epitelial Mesenquimal (TEM). Tal processo acontece devido a um acúmulo de mutações genéticas, ganho de atributos mesenquimais e perda de marcadores epiteliais. Com a soma desses fatores, as células adquirem fenótipo de indiferenciação celular, maior motilidade e capacidade de invasão tecidual; o que as permitem percorrer a corrente sanguínea e infiltrarem outros órgãos. Ao atingirem outro órgão sofrem o processo reverso, readquirindo sua capacidade proliferativa (PANTELEAKOU et al., 2009).

Os exames padrões de detecção do CaP podem ser realizados por meio do exame de toque retal e quantificação sérica do antígeno prostático específico (PSA). O primeiro busca evidenciar o crescimento excessivo da próstata, porém, proporciona relutância em muitos

homens por questões sociais (NASCIMENTO; FLORINDO; CHUBACI, 2010). Já o segundo, é um biomarcador específico do órgão, ou seja, não é específico do câncer de próstata e seu aumento pode estar relacionado a outras doenças benignas da próstata (Li, et al., 2015). Embora sejam dois exames diferentes, um não exclui a necessidade do outro, ambos se complementam.

Além desses exames que são mais comuns, também pode ser realizado uma ultrassonografia transretal e biópsia tecidual, sendo essa última considerada mais invasiva, porém mais eficiente. Esta metodologia utiliza o sistema de estadiamento, no qual, é determinado a localização e extensão do câncer presente no paciente para definir uma melhor abordagem de tratamento. Essa abordagem é dividida em três categorias: T, N e M. A primeira categoria é designada para a análise do tumor primário, levando em consideração as áreas da próstata afetadas pelo tumor. A segunda categoria, corresponde a análise dos linfonodos próximos, possivelmente afetados pelo CaP. Já a terceira categoria, agrupa as informações acerca da metástase tumoral (BUYOUNOUSKI et al., 2017). Além do estadiamento, para o câncer de próstata, também é usado a pontuação de Gleason (originalmente, Gleason Score), cuja distribuição de pontos se dá por semelhança do tecido analisado com tecido declarado normal. Após a oitava edição do *Cancer Staging Manual* ser publicada e implementada em 2018, juntamente com a pontuação Gleason deve ser utilizada a pontuação de grupo (Grade Group). Essa implementação teve o intuito de resolver alguns problemas que a pontuação Gleason possui, como os prognósticos diferentes para pacientes do mesmo grupo de pontuação. Entretanto, mesmo após essa recente modificação, a metodologia pode apresentar resultados débeis, quando as células analisadas não possuem padrão normal, mas também não possuem padrão cancerígeno (BUYOUNOUSKI et al., 2017).

Por conta da baixa sensibilidade dos testes atuais, pela biópsia ser uma opção invasiva e pela taxa de mortalidade ser crescente, existe uma importância cada vez maior de desenvolver meios de detectar o CaP. Para tal, os marcadores moleculares da doença têm sido amplamente

estudados nos últimos anos como ferramenta para desenvolver novos tipos de diagnósticos, que possibilitem uma detecção precoce do câncer com uma melhor chance de tratamento e, conseqüentemente, maior sobrevida.

1.1 Antígeno prostático específico (PSA)

As células luminais secretoras, principal tipo celular da próstata, possuem a função de secretar fluidos prostáticos, dentre eles, o antígeno específico da próstata (GOLDSTEIN et al., 2010). Após sua descoberta em 1979 por Wang, a detecção e o tratamento do CaP foram alterados de forma significativa (HELFAND; CATALONA, 2014). Dentre os possíveis tipos de PSA analisados, temos o PSA Total, PSA Livre, e p2PSA. O primeiro corresponde à quantidade de PSA presente no sangue, já o segundo mede a quantidade de PSA que circula pelo sangue, e por último, o p2PSA é a isoforma do PSA relacionado a formas mais agressivas de CaP (CALISTA; SILVA; FILHO, 2020). A quantidade de PSA considerada normal é menor ou igual a 4 ng/ml, porém o teste de PSA é pouco específico, uma vez que a quantidade do antígeno aumenta nos casos de prostatite, ejaculação ou traumas no reto. Por isso, o teste gera resultados falso positivos e até falsos negativos (BLACKWELDER; CHESSMAN, 2019).

Com o intuito de aumentar o potencial de detecção do CaP por PSA, o método PHI (*Prostate Health Index*) foi criado. Trata-se de um teste que usa os dados da quantificação da dosagem das três moléculas do PSA (PSA Total, PSA Livre, e p2PSA) e gera um valor com base na fórmula: $([-2] \text{proPSA}/\text{free PSA}) \times \sqrt{\text{PSA}}$, então o valor gerado é comparado com uma tabela padrão (LOEB; CATALONA, 2014). A partir das análises sobre o PHI feita por Stacy Loeb *et. al.* foi concluído que é um teste eficaz quando a dosagem do PSA é maior que 4 ng/ml e que reduz as biópsias feitas de forma desnecessária. Entretanto, sua utilização é limitada para fazer a distinção entre os estágios do CaP e as condições benignas, como a hiperplasia prostática (BUYOUNOUSKI et al., 2017).

1.2 Aptâmero D4

Com a necessidade de desenvolver novas alternativas para a detecção do CaP, o uso de aptâmeros tem sido cada vez mais estudado. Os aptâmeros são oligonucleotídeos capazes de ligar-se a um alvo específico, de forma análoga a um anticorpo. A partir de estudos com a linhagem neoplástica PC-3 do câncer de próstata, vários aptâmeros de RNA foram isolados através do método de evolução sistemática de ligantes por enriquecimento (SELEX). A linhagem foi cultivada em meio tridimensional por levitação magnética, permitindo melhor representação da arquitetura celular *in vivo*. Com a associação dessas duas metodologias, foi possível o desenvolvimento da metodologia 3D Cell SELEX (SOUZA et al., 2015).

Com essa nova metodologia, diferentes sequências de oligonucleotídeos com capacidade de se ligar a células tumorais circulantes (CTC) do CaP foram selecionadas. Dentre essas moléculas, aquela que apresentou uma alta detecção de CTC em amostras de pacientes com CaP foi o Aptâmero A4 (SOUZA et al., 2015).

No presente estudo foi utilizado o Aptâmero A4 com as modificações feitas por Campos-Fernández et al (2020). Em seu estudo ele foi modificado (D4) pela adição de desoxirribonucleotídeos em suas extremidades com a finalidade de remover os grupos hidroxila 2', que são reativos do açúcar do RNA, para torná-lo mais estável. Segundo este estudo, o aptâmero D4 mostra um bom potencial para ser utilizado em diagnósticos, portanto é de forte interesse a caracterização das células ligantes a este aptâmero.

1.3 Células tumorais circulantes

À medida que as células de um tumor se proliferam, algumas se desprendem da massa do tumor e entram nas circulações, tanto sanguínea quanto linfática. Essas células são chamadas de Células Tumorais Circulantes (CTC). Depois que elas se desprendem do tumor e entram na circulação, podem se alojar em novos tecidos pelo corpo. Apesar disso, independentemente de estar na circulação ou alojada em outro tecido, as CTCs mantêm a informação sobre o tumor

inicial de onde elas se proliferaram. A partir dessas informações são analisadas diversas formas de diagnosticar ou realizar tratamentos contra os diferentes tipos de câncer (WILLIAMS, 2013). Tendo isso em vista, foi desenvolvida a biópsia líquida no CaP, onde usa-se o anticorpo que se liga à molécula de adesão celular epitelial (EpCAM) para a identificação das CTCs (CHAVVA, S.R.; PRAMANIK, A.; et al., 2014).

Apesar de serem poucos os testes que utilizam células circulantes tumorais, eles vêm aparecendo cada vez mais na prática clínica. Dentre outras metodologias que foram recentemente desenvolvidas para o diagnóstico do CaP, podemos citar o PCA3 (antígeno cancerígeno prostático), TMPRSS2-ERG, ExoDx e SelectMDx (RAJA, N; RUSSELL, C.M.; GEORGE, A.K, 2018).

1.4 Anticorpo anti-CD 44 e anti-CD 133

Nas últimas décadas as glicoproteínas CD44 e CD133 foram apontadas como marcadores de células tronco cancerígenas de diversos tipos de tumores, dentre eles, o CaP. A CD44 trata-se de uma molécula de adesão celular com múltiplas funções de sinalização em ambientes tumorais e também é sugerido seu papel na migração do tumor, sua progressão e posteriormente, metástase (PANTELEAKOU et al., 2009). Enquanto isso, a glicoproteína CD133 ainda não possui uma função esclarecida, entretanto foi identificada sua presença em biópsias de CaP e foi relacionada a uma maior agressividade da doença, metástase e uma menor sobrevida dos pacientes (KALANTARI et al., 2017). Ao testar a coexpressão de ambas moléculas em tecido de câncer de próstata, Kalantari et. al. (2017) constatou que há uma correlação significativa em quase metade dos casos de CaP e que esses marcadores possuem potencial em novas pesquisas de diagnóstico e tratamento.

1.5 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo trata-se de uma técnica sofisticada que mede características físicas de uma célula, dentre elas, tamanho e granularidade. Para medir tais parâmetros, as células fluem em suspensão através de um equipamento que faz a medição a partir da dispersão de luz ocasionada pelas células. Além disso, o citômetro de fluxo pode analisar diferentes marcadores celulares utilizando fluoróforos, que estão associados a anticorpos monoclonais ou aptâmeros (ADAN et al., 2017)

A partir das informações apresentadas acima, é de extrema importância o estudo e desenvolvimento de novas formas diagnósticas do câncer de próstata, pois é uma doença com alto potencial de letalidade e que acomete muitos homens. A utilização de biomarcadores, tais como o aptâmero D4, apresenta uma possibilidade de desenvolvimento de um diagnóstico menos invasivo ao paciente e, possivelmente, mais eficaz por conta de sua alta especificidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a associação do aptâmero D4 e dos anticorpos anti-CD44 e anti-CD133 para a marcação de células tumorais circulantes a partir da biópsia líquida, a fim de caracterizar a célula alvo do aptâmero D4.

2.2 Objetivos específicos

1. Analisar por citometria de fluxo a intensidade de fluorescência do aptâmero D4 com os anticorpos anti-CD44 e anti-CD133 na marcação de CTCs.
2. Analisar a % de células positivas para o aptâmero D4 e sua relação com os outros marcadores: anticorpos anti-CD44 e anti-CD133.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação das amostras de sangue periférico com os marcadores

Todos os pacientes convidados a participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes de doar as amostras no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas da UFU. Por se tratar de um projeto realizado com amostras biológicas humanas, o Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia aprovou o protocolo de pesquisa com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 71108817.2.0000.5152. Após a coleta do sangue, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da UFU, onde foram processadas e analisadas.

Para a inclusão dos pacientes com câncer de próstata, o critério utilizado foi o diagnóstico baseado em PSA e toque retal. Já para os controles, foi aderido a ausência do diagnóstico para câncer de próstata, incluindo indivíduos saudáveis ou com outras doenças da próstata tais como hiperplasia benigna e prostatites. Por outro lado, o critério de exclusão do projeto foi o diagnóstico anterior de qualquer tipo de câncer.

As amostras de sangue periférico de 32 indivíduos foram coletadas utilizando tubos a vácuo com EDTA para 4 mL (Vacuette Greiner Bio-One, Americana, SP, Brasil) no Hospital de Clínicas da UFU, seguindo o protocolo de pesquisa com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 71108817.2.0000.5152, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da UFU. Dentre as amostras, 15 pertenciam a pacientes com câncer de próstata e 17 controles.

Com a chegada das amostras no Laboratório de Nanobiotecnologia, os tubos foram centrifugados a 200 g por 15 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, o anel leucocitário de cada amostra foi coletado e dividido em três tubos para citometria de 5 mL (*Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha*), colocando 90 μ L do anel leucocitário em cada tubo. Foi

adicionado 2 mL da solução de lise de hemácias DB Pharm Lyse (Franklin Lakes, NJ, EUA) por tubo, consecutivamente, foram vortexados para sua incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Posterior a incubação, os tubos foram centrifugados a 200 g por 5 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado por inversão. O *pellet* de cada tubo foi ressuspensionado duas vezes usando 2 mL de solução de lavagem *in-house* (tampão PBS 1x, pH 7,4 1% BSA e 0,1% azida básica), posteriormente foram homogeneizados e centrifugados a 200 g por 5 minutos à temperatura ambiente.

Então, o *pellet* foi ressuspensionado em cada tubo com 90 µL da solução de lavagem e 10 µL de plasma humano inativado de sangue tipo AB, utilizado como solução de bloqueio, e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os marcadores: o aptâmero e os anticorpos nos tubos correspondentes. O aptâmero D4 foi sintetizado e liofilizado (IDT, Coralville, IA, EUA) com sua sequência e modificações:

(5' → 3') Biotina5'dAdGdCdCdGdAdGdAdGdGdUdAdAdGdCdAdAdAdCdCdAdCdGdCdCdCdGdT5'. Para ser utilizado, o aptâmero foi ressuspensionado em água de injeção até uma solução estoque com uma concentração de 100 µM. A fim de marcar o aptâmero, foi usado estreptavidina ligada ao fluorocromo FITC (SAV-FITC, 405201, BioLegend, San Diego, CA, EUA). Todos os anticorpos também foram adquiridos da empresa BioLegend.

Logo após homogeneizar os tubos, foram incubados a 4 °C por 30 minutos no escuro, para evitar possíveis alterações nos fluorocromos, da seguinte forma:

-Tubo 1: sem marcadores para ser usado como controle;

-Tubo 2: 0,2 µL de D4, 0,25 µL de CD-44APC (338806) e 0,25 µL de CD133-PE (372804);

-Tubo 3: 0,2 µL de SAV-FITC, 0,25 µL do isotipo de CD44 IgG1κ-APC (400120) e 0,25 µL do isotipo de CD133 IgG1κ-PE (400114).

Posterior a incubação, os tubos foram centrifugados a 200 g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado por inversão. Foi ressuspendido o *pellet* de cada tubo duas vezes com 2 mL da solução de lavagem, homogeneizado e centrifugado a 200 g por 5 minutos a 4 °C. Por fim, foram ressuspendidos em 100 µL de solução de lavagem.

Após esse processamento, os tubos 1 e 3 foram mantidos no escuro enquanto era finalizado o processo do tubo 2. Para o segundo tubo de cada indivíduo, foi homogeneizado e incubado a 4 °C por 30 minutos no escuro com 0,2 µL de SAV-FITC. Ao fim da incubação, estes tubos foram centrifugados e o *pallet* ressuspendido conforme descrito acima. Dessa forma, as amostras foram devidamente processadas para serem analisadas.

3.2 Análise dos dados citométricos

Para realizar as análises das marcações por citometria, foi usado o citômetro Accuri C6 (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) com o laser azul de 488 nm e os filtros 533/30 e 585/40 para ler fluorescência de FITC (FL-1), PE (FL-2), respectivamente. Além do laser azul com laser vermelho de 640 nm e o filtro 670 LP para ler a fluorescência de APC (FL-4). Os dados gerados pelo citômetro foram analisados utilizando o programa FlowJo, versão X 10.0.7r2 para Windows.

Para realizar as análises dos dados, primeiro foi selecionada uma população de 500 mil leucócitos do Tubo 1, sendo essa identificada segundo seu tamanho e granulosidade. A partir dessa população foram selecionados os *singlets* (leucócitos com relação entre área e altura próxima a 1), de forma a excluir os *doublets* (2 ou mais leucócitos que tiveram leitura simultânea no citômetro). Estas configurações também foram aplicadas nos dados citométricos dos demais tubos.

Dentre as células do segundo e terceiro tubo, foram determinadas, de forma individual, as marcações específicas por meio de histograma. Para o tubo 2 e 3, foram estabelecidas as marcações de CD133 e CD44 e do alvo do aptâmero a partir das marcações dos isotipos destes anticorpos e da SAV-FITC. Com base nas marcações foram identificadas as células positivas para CD44, dentre essas células foram identificadas aquelas também positivas para CD133 e separadamente para D4. Além disso, também foi identificada aquelas que eram positivas para D4 dentro da subpopulação de células positivas para CD133, dentre as positivas para CD44. A mesma análise descrita acima foi feita utilizando as células positivas para CD133 como ponto principal de análise.

Por conta desta análise foram obtidos os dados da percentagem de células marcadas das seguintes formas: células CD44+ CD133+; células CD44+ D4+; células CD44+ CD133+ D4+; células CD133+ CD44+; células CD133+ D4+; células CD133+ CD44+ D4+. A partir de cada um desses arranjos foi possível obter os dados da intensidade média da fluorescência (MFI, do inglês *Mean Fluorescence Intensity*).

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *Graph Pad Prism*, versão 7.0 para Windows, considerando o valor de p menor que 0,05 como significativo. Nele, a comparação entre os tipos de amostra foi realizada pelo teste de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas e pelo teste t não pareado para variáveis paramétricas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Características dos pacientes

As características clínicas e laboratoriais das populações de controles e pacientes se encontram na Tabela 1. A população de pacientes tinha idade superior a 41 anos, já os controles por sua vez, eram homens a partir de 21 anos. Os valores de PSA Total, Gleason Score e Cor de pele foram obtidos apenas para o grupo paciente, visto que são dados clínicos quantitativos e qualitativos de paciente de CaP. O parâmetro idade apresentou uma diferença

significativamente diferentes entre os grupos controle e paciente. Tal diferença pode ter ocorrido devido ao método de seleção de voluntários para a pesquisa, pois, para o grupo controle, não foi estabelecido idade mínima ou máxima. O mesmo ocorreu com o grupo de pacientes.

Tabela 1: Dados Clínicos e laboratoriais dos grupos pacientes e controle

Variável	Controles (n=17)	Pacientes (n=15)	Valor de p
Idade (anos) - média (intervalo)	53 (21-67)	63 (41-73)	0,0242
PSA Total (ng/ml) - mediana (intervalo)	-	7,9 (0,3-14,2)	-
Gleason Score (1-2-3-4)%	-	36,5-36,5-18-9	-
Cor da pele (branco-preto)%	-	54-46	-

4.2 Intensidade média de fluorescência

Foi realizada a comparação entre o Grupo Controle e os pacientes com diagnóstico de CAP em relação a intensidade média de fluorescência (MFI) dos marcadores CD133, CD44 e o aptâmero D4 utilizando o teste Mann-Whitney. Foi observado que os parâmetros de intensidade média de fluorescência (MFI) de CD133+ em leucócitos D4+, CD44+, bem como MFI de CD133+ em leucócitos D4+, CD44+, CD133+ foram significativamente diferentes entre os grupos controle e paciente, apresentando maior intensidade do marcador CD133+ nas amostras de paciente com CaP. Foi considerado significativo a partir do valor de $p < 0,05$ (Tabela 2). O estudo realizado por Chen-Ying Su (2021), utilizando linhagens celulares (como PC3 e LNCaP) para analisar a expressão de biomarcadores em celular de câncer de próstata também utilizando citometria de fluxo, apontou que os biomarcadores CD133 e CD44 são boas opções, visto que são marcadores expressos comumente entre diferentes linhagens celulares de câncer de próstata. A diferença na intensidade média de fluorescência encontrada no presente estudo pode ser resultado de uma alta interação dos biomarcadores.

Tabela 2: Análise comparativa dos marcadores

Variável	Controles (n=17)	Pacientes (n=15)	Valor de p
Leucócitos D4+, CD133-, CD44+ (%) - mediana (intervalo)	70,95 (0,29-97)	78,4 (28,9-95,6)	0,1762
Leucócitos D4+, CD133+, CD44+ (%) - mediana (intervalo)	8,955 (3,54-40,5)	11,8 (0,35-42,5)	0,4723
Leucócitos D4+, CD133+, CD44- (%) - mediana (intervalo)	3,065 (0,29-56,9)	3,23 (0,35-44)	0,1748
Leucócitos D4+, CD133-, CD44- (%) - mediana (intervalo)	8,14 (0,51-42)	2,805 (0,35-44,2)	0,2043
MFI de D4 em leucócitos D4+ (u. a.) - mediana (intervalo)	2547,5 (2004-6429)	2984 (2264-5080)	0,1989
MFI de D4 em leucócitos D4+, CD44+ (u. a.) - mediana (intervalo)	3082 (1502-8371)	4627 (2506-8270)	0,1858
MFI de D4 em leucócitos D4+, CD133+ (u. a.) - mediana (intervalo)	2674 (1980-10132)	2877 (2245-9729)	0,4802
MFI de D4 em leucócitos D4+, CD133+, CD44+ (u. a.) - mediana (intervalo)	3731 (1402-14426)	4479 (2435-22828)	0,2455
MFI de CD44 em leucócitos D4+, CD44+ (u. a.) - mediana (intervalo)	2045,5 (1303-9043)	2128 (1514-2762)	0,6194
MFI de CD44 em leucócitos D4+, CD133+, CD44+ (u. a.) - mediana (intervalo)	2251 (1368-13193)	2143,5 (1508-3482)	0,5054
MFI de CD133 em leucócitos D4+, CD133+ (u. a.) - mediana (intervalo)	5862 (1496-23108)	13519 (2079-71178)	0,0323
MFI de CD133 em leucócitos D4+, CD133+, CD44+ (u. a.) - mediana (intervalo)	4497 (1697-11871)	9768 (1909-68902)	0,0197

4.3 Potencial de identificação de células tumorais circulantes

Dentre as células com marcação positiva para o aptâmero D4, foi observado que em torno de 70% das CTC apresentaram CD133- CD44+. Além disso, as CTCs D4+, CD133- CD44+ apresentaram uma diferença significativa entre aquelas que foram CD133- CD44+, quando comparado com os demais arranjos. Além disso, também houve diferença significativa entre as CD133+ CD44+ em relação as CD133+ CD44-. Em todos os casos acima, os cálculos foram feitos juntando os dados de células positivas para os arranjos de marcadores dos dois grupos estudados (Figura 1).

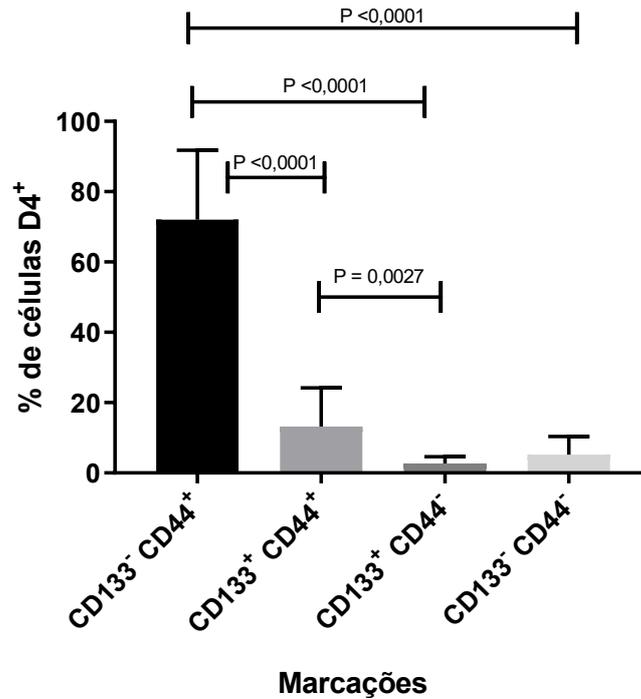


Figura 1: Percentual de células D4⁺. Porcentagens das células marcadas com o aptâmero D4 cujas marcações também foram positivas para os diferentes marcadores nos seguintes arranjos: CD133⁻ CD44⁺; CD133⁺ CD44⁺; CD133⁺ CD44⁻; CD133⁻ CD44⁻. O valor de p foi calculado, após avaliação multiparamétrica (ANOVA), com o teste t..

Dentre as diferenças observadas, o fator em comum é a marcação positiva do marcador CD44 que é o marcador que tende a ter uma expressão constante (THEIL et al., 2021). Além disso, CD44 pode ser responsável pela migração de células do câncer de próstata (Junhao Lin, 2021). Ambos fatores descritos acima podem ser a razão pela maior percentagem de células serem positivas para CD44.

A partir das diferenças supracitadas, foi realizado a comparação entre os grupos, controle e paciente, para cada arranjo de marcadores: CD133⁻ CD44⁺; CD133⁺ CD44⁺; CD133⁺ CD44⁻; CD133⁻ CD44⁻. Dentre as comparações realizadas, apenas as células marcadas com o aptâmero D4 duplas negativas, sem marcação para os anticorpos anti CD133 e CD44 (Figura 2, B), e as que também foram positivas para o anticorpo anti CD133 (Figura 2, A) apresentaram diferença significativa. Os demais arranjos, as duplas positivas para os

anticorpos anti CD133 e CD44 (Figura 2, D) e as negativas para anti CD133 com positividade para anti CD44 (Figura 2, C), apresentaram $p = 0,16$ e $0,58$, respectivamente.

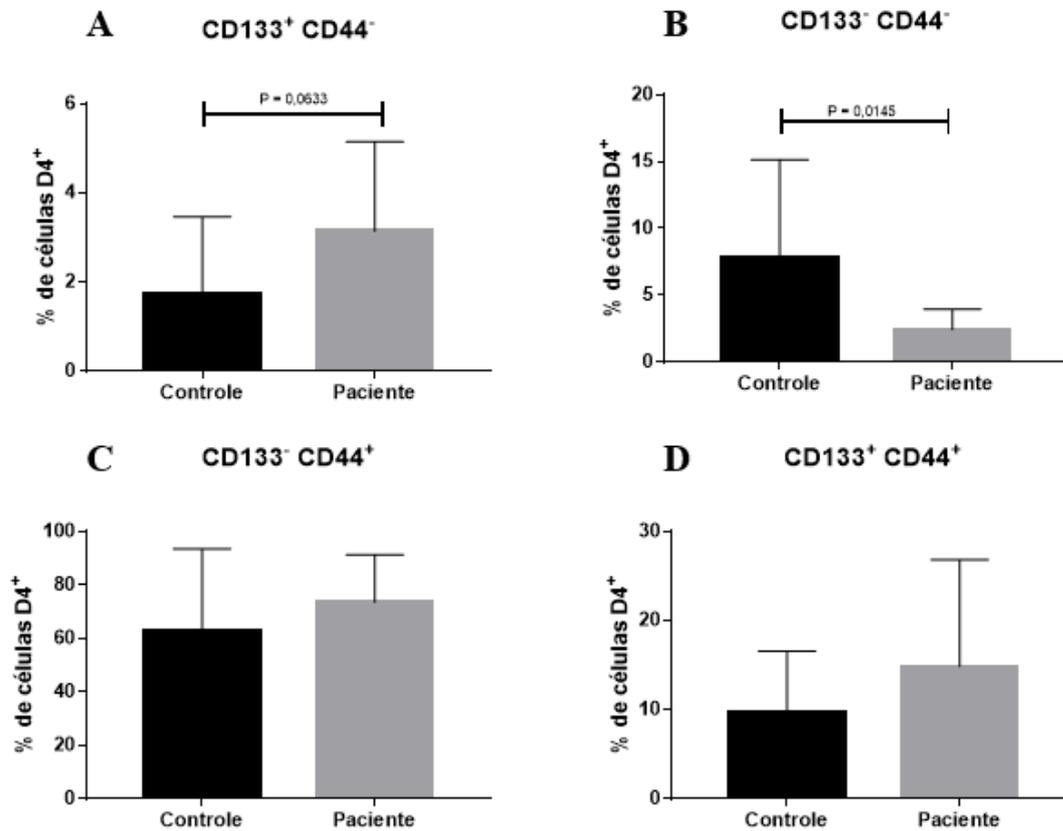


Figura 2: Células D4⁺ juntamente com outros marcadores. Percentagens das células marcadas positivamente para o aptâmero D4 que também possuíam outras marcações, seja por CD133 ou CD44 ou ambas ou nenhuma outra marcação. A: células também positivas para CD133, mas negativas para CD44. B: células negativas para as marcações dos anticorpos. C: células negativas para CD133, mas positivas para CD44. D: células positivas para ambas marcações dos anticorpos. Aa escala do eixo X varia de 0 à 100%, entretanto nos gráficos A, B e D houve uma ampliação para melhor visualização dos resultados.

Além disso, foi observado um alto desvio padrão dentre os dados de cada grupo variando de 1,5, grupo paciente do gráfico B, à 30,5 no grupo controle do gráfico C. Tais diferenças entre os dados possivelmente foram obtidas a partir de possíveis erros no processamento das amostras, ou até mesmo, a própria variabilidade biológica dos diferentes organismos. O alto desvio padrão obtido nessa análise pode ser a razão de não haver diferença nos gráficos C e D. Já a diferença encontrada em relação as positivas para CD133, pode se dar

ao fato de que a expressão de CD133 pode ser alta em alguns casos, assim como em culturas de PC3 (SU et al., 2021). Em contrapartida, a diferença observada entre as duplo negativas que mostra uma maior ligação do aptâmero D4 para o grupo controle é um indicativo de que ele não se ligue apenas em células tronco do câncer de próstata (CD133+).

4.4. Caracterização das células alvo do aptâmero D4

Com o intuito de caracterizar as células alvo do aptâmero, os dados de ambos os grupos (controle e paciente) foram agregados com o intuito de aumentar o n amostral cujo total se elevou para 32. Na figura 3-A foi analisado a fluorescência emitida pelo aptâmero D4 para os diferentes arranjos de marcação. Quando apenas o aptâmero estava aderido nas células alvo, a emissão de fluorescência foi significativamente menor do que quando o anticorpo anti CD44 ou ambos anticorpos (anti CD133 e CD44) também estavam presentes. Também houve diferença significativa quando comparadas as células positivas para todos os marcadores com a que era apenas negativa para CD44. O mesmo foi obtido comparando as células negativas para os anticorpos com aquela que eram positivas para ambos (Figura 3-A e B, B para uma melhor visualização). As diferenças mostram que a intensidade de fluorescência do aptâmero aumenta quando há outros marcadores presentes nas células. Como a intensidade se dá a partir da ligação do marcador com seu alvo específico, pode-se afirmar que aquelas células com maior intensidade possuem maior quantidade do marcador ligado, tendo isso em mente, o aptâmero D4 apresenta maior resposta fluoro-métrica quando analisado junto a marcadores de células cancerosas de próstata.

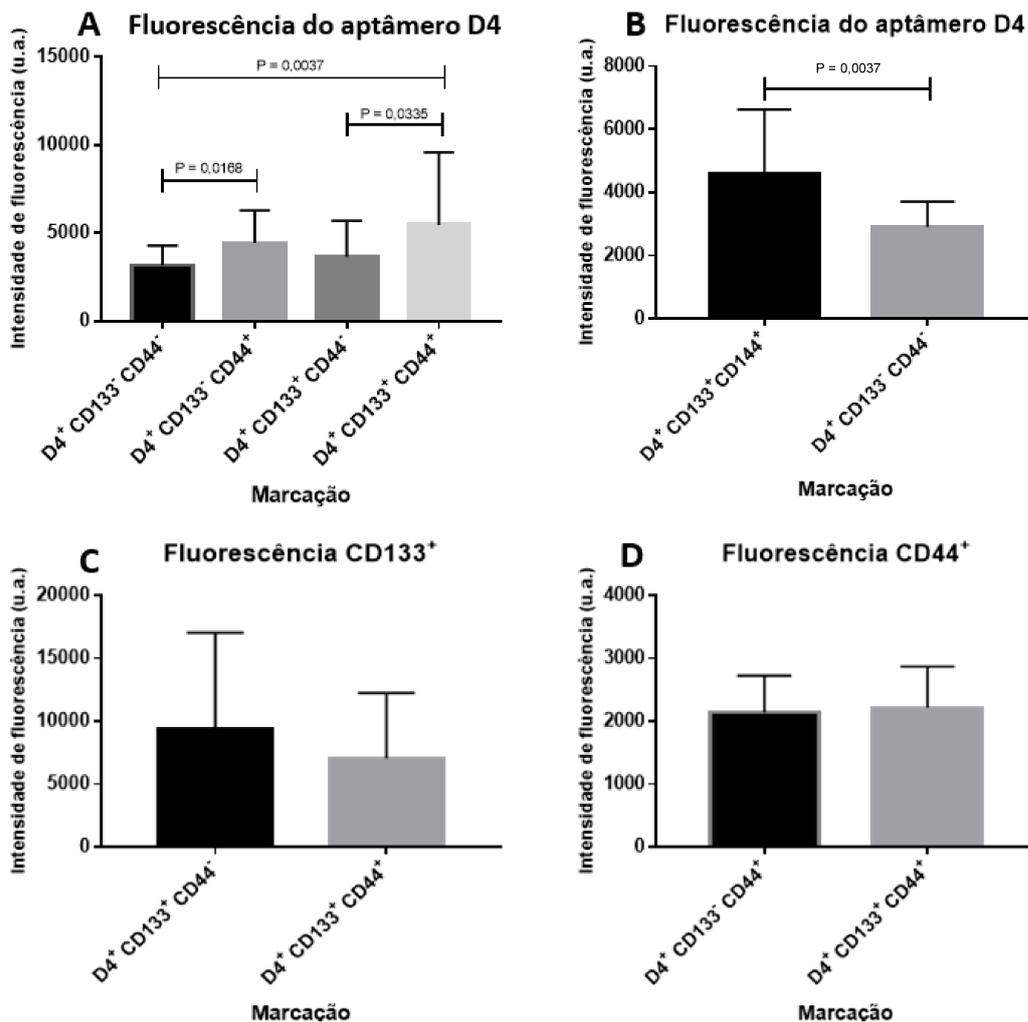


Figura 3: Intensidade de Fluorescência dos Marcadores. Fluorescência dos diferentes marcadores para diferentes arranjos de marcação, sendo em A: fluorescência do aptâmero D4 para os diferentes arranjos de marcadores obtidos avaliação multiparamétrica (ANOVA); B: comparação da fluorescência do marcador D4 entre as células positivas para os demais marcadores e as negativas para tais; C: comparação da fluorescência de CD133 das células positivas para D4 e negativas para CD44, com $p= 0,3836$; D: comparação da fluorescência de CD44 quando as células foram positivas e negativas para CD133, com $p= 0,7483$.

Além de observar a fluorescência do aptâmero, também foi analisada as fluorescências dos anticorpos CD44⁺ e CD133⁺. Para ambos foi comparada a fluorescência obtida quando as células eram positivas para D4 e o anticorpo em análise, com as células positivas para todos os marcadores. Entretanto, para os dois anticorpos não houve diferença significativa na intensidade de fluorescência de nenhum anticorpo (Figura 3-C e 3-D). Ou seja, apesar do aptâmero responder aos outros marcadores, o oposto não foi observado. Como o marcador CD44 é associado ao crescimento e disseminação do câncer de próstata, a capacidade do

aptâmero de se ligar as células marcadas para esse marcador mostra sua capacidade de identificar células tumorais circulantes do câncer de próstata.

Não houve diferença significativa na fluorescência emitida pelo aptâmero entre os grupos estudados quando as células possuíam marcação positiva para ambos anticorpos anti CD133 e anti CD44. Tal observação aponta que as células alvo do aptâmero podem ser encontradas tanto em pacientes quanto em grupos controle. Entretanto, devido ao alto desvio padrão, em um futuro estudo com um maior número amostral pode ocorrer um resultado diferente.

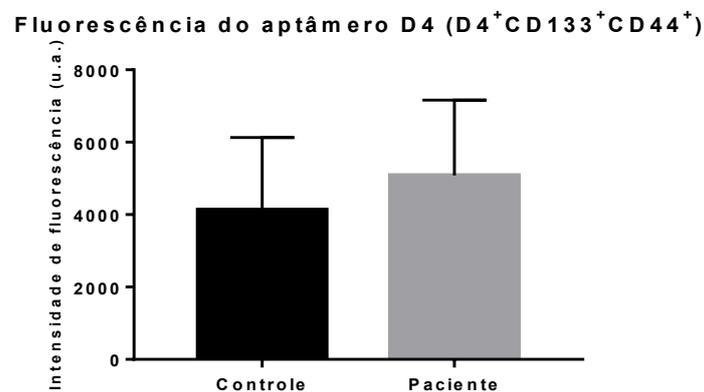


Figura 4: Fluorescência entre os grupos de estudo. Comparação da fluorescência de D4 entre o grupo controle e paciente, com $p = 0,2136$.

5. CONCLUSÃO

O aptâmero D4 se mostrou capaz de identificar células tumorais circulantes (CTCs) e mostrou um aumento significativo de intensidade do marcador CD133+ em pacientes com CaP quando analisado em células com os anticorpos anti CD133+ e anti CD44+, isso mostra sua capacidade de se ligar a células que expressam uma maior quantidade de marcadores de células tumorais de câncer de próstata. As CTCs positivas para o aptâmero D4 apresentaram em sua maioria (em torno de 70%) positivas também para CD44 e CD133.

Perspectivas futuras:

O uso do aptâmero D4 conjugado com outros marcadores apresenta ser um bom material para futuros estudos, pois apresentou especificidade às células circulantes tumorais, tanto para desenvolvimento de novos diagnósticos quanto para tratamentos, podendo assim, proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes e à sociedade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 17 fev. 2017.

BUYYOUOUSKI, M. K. et al. Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 3, p. 245–253, 2017.

CALISTA, E. F.; SILVA, K. M.; FILHO, D. R. DA R. Avaliação da eficácia do teste psa no diagnóstico do câncer de próstata/ Evaluation of the effectiveness of psa testing in the diagnosis of prostate cancer. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 16688–16701, 2020.

CAMPOS-FERNÁNDEZ, E. et al. Post-SELEX Optimization and Characterization of a Prostate Cancer Cell-Specific Aptamer for Diagnosis. **ACS Omega**, v 5, n. 7, p. 3533-3541, 2020.

CAMPOS-FERNÁNDEZ, E. et al. The use of aptamers in prostate cancer: A systematic review of theranostic applications. **Clinical Biochemistry**, v. 93, p. 9–25, jul. 2021.

CHAVVA, S.R.; PRAMANIK, A.; et al. Theranostic graphene oxide for prostate cancer detection and treatment. **Particle Systems Characterization**, v. 31, n. 12, p. 1252–1259, 2014.

Estatísticas de Câncer. **Instituto Nacional de Câncer**, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 04 de maio, 2021.

GOLDSTEIN, S. et al. Identification of a cell of origin for human prostate câncer. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 568-571, 2010.

HELFAND, B. T.; CATALONA, W. J. The epidemiology and clinical implications of genetic variation in prostate câncer. **Urologic Clinics of North America**, v. 41, n. 2, p. 277-297, 2014.

KALANTARI, E. et al. Co-Expression of Putative Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD133 in Prostate Carcinomas. **Pathology & Oncology Research**, v. 23, n. 4, p. 793–802, out. 2017.

Li, Q.K., Chen, L., Ao, M.H., Chiu, J.H., Zhang, Z., Zhang, H., Chan, D.W. Serum fucosylated prostate-specific antigen (PSA) improves the differentiation of aggressive from non-aggressive prostate cancers. **Theranostics**, v 5, n. 3, p. 267–276, 2015.

LIN, J. et al. Screening of hub genes and evaluation of the growth regulatory role of CD44 in metastatic prostate cancer. **Oncology Reports**, v. 46, n 196, mar. 2021.

LOEB, S.; CATALONA, W. J. The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 6, n. 2, p. 74–77, abr. 2014.

NASCIMENTO, E. P.; FLORINDO, A. A.; CHUBACI, R. Y. S. Exame de detecção precoce do câncer de próstata na terceira idade: conhecendo os motivos que levam ou não a sua realização. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 34, n.1, p. 7-18, 2010.

Naughty Dog (2013). The Last of Us. PlayStation 3. Sony Computer Entertainment. Fase: "Jackson". " **Joel**: no matter what, you keep finding something to fight for".

PANTELEAKOU, Z. et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer Patients: Methodological Pitfalls and Clinical Relevance. **Molecular Medicine**, v. 15, n. 3–4, p. 101–114, mar. 2009.

RAJA, N; RUSSELL, C.M.; GEORGE, A.K. Urinary markers aiding in the detection and risk stratification of prostate cancer. **Translational Andrology and Urology**, v. 7, n. 4, p. 436–442 set. 2018.

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.

SU, C.-Y. et al. Analyzing the Expression of Biomarkers in Prostate Cancer Cell Lines. **In Vivo**, v. 35, n. 3, p. 1545–1548, 2021.

THEIL, G. et al. Association of Circulating Tumor Cells with Inflammatory and Biomarkers in the Blood of Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **Life**, v. 11, n. 7, p. 664, 6 jul. 2021.

WILLIAMS, S. C. P. Circulating tumor cells. **Core Concepts**, v. 119, n. 13, p. 4861, 2013.