



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

LAILA MACHADO HENRIQUES

**IDENTIFICAÇÃO POR BIÓPSIA LÍQUIDA DE PLOIDIAS NO DNA DE CÉLULAS
TUMORAIS CIRCULANTES DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

UBERLÂNDIA, MG

2024

LAILA MACHADO HENRIQUES

**IDENTIFICAÇÃO POR BIÓPSIA LÍQUIDA DE PLOIDIAS NO DNA DE CÉLULAS
TUMORAIS CIRCULANTES DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito para a obtenção do Título de
Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vivian Alonso
Goulart.

UBERLÂNDIA, MG

2024

LAILA MACHADO HENRIQUES

**IDENTIFICAÇÃO POR BIÓPSIA LÍQUIDA DE PLOIDIAS NO DNA DE CÉLULAS
TUMORAIS CIRCULANTES DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito para a obtenção do Título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) Vivian Alonso Goulart – Instituto de Biotecnologia – Universidade
Federal de Uberlândia

Dr.(a) Alinne Tatiane Faria Silva – Pós-Doutoranda na Fundação Pio XII - Hospital
de Câncer de Barretos

Msc. Mariana Cristina Teixeira de Moura – Doutoranda no Programa de Pós-
graduação em Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Vera e Paulo, por todo o apoio que me deram durante toda a minha vida, apesar das dificuldades sempre fizeram de tudo para me dar o suporte necessário para conseguir me formar. Além disso, também, agradeço aos meus familiares que sempre torceram pelo meu sucesso e ajudaram alguma forma.

Agradeço a professora Dra. Vivian Alonso Goulart pela orientação durante a execução desse trabalho, pela paciência, confiança, compreensão e por todos os ensinamentos.

Agradeço aos meus amigos da graduação, em especial ao meu trio, Ana Júlia e Maria Júlia, pelo apoio nos momentos mais difíceis da faculdade, tornando os dias mais divertidos, mesmo em meio a tanto caos. Aos meus amigos da vida, em especial, Skarllat e Viviane, agradeço pelos longos anos de amizade e por todo o apoio e companheirismo.

Sou imensamente grata ao meu namorado, Deivisson Rafael, pelo suporte nos dias mais difíceis, tornando os momentos da vida mais leves e alegres, pelo companheirismo e incentivo a continuar sempre lutando pelos meus objetivos.

Agradeço os amigos e integrantes do Grupo de Estudos e Pesquisa em Marcadores Moleculares (GEP-Mmol) que me deram a oportunidade de aprender mais sobre o universo científico e acadêmico. Em especial, agradeço a Nathalia Alqualo, minha companheira de pesquisa, que sempre esteve disponível para me ajudar e me ensinar nas bancadas e fora delas.

Agradeço a Fundação de Amparo do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro que foi extremamente importante para o desenvolvimento dessa pesquisa e ao Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Biotecnologia que abriu as portas para que eu pudesse realizar esse trabalho e concluir meu Estágio II.

Eu agradeço e dedico esse trabalho aos 4 pacientes com câncer de próstata metastático em tratamento no Hospital de Clínicas da UFU que aceitaram participar dessa pesquisa, apesar de todo sofrimento, dor e dificuldade que estão enfrentando. Eu espero que mais pesquisas como essa possam ser feitas para garantir uma melhor qualidade de vida para esses pacientes.

Por fim, estou orgulhosa de mim, por enfrentar todos desafios e obstáculos de uma graduação e de uma pesquisa, sempre agradecendo a Deus por permitir alcançar meus objetivos com saúde e determinação.

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo de câncer que mais afeta homens no mundo. Em muitos casos, os pacientes desenvolvem metástase em outros órgãos, a partir da liberação de Células Tumorais Circulantes (CTCs) na corrente sanguínea. Uma das características da doença é a alteração na ploidia das células, como, por exemplo, a aneuploidia, que é uma alteração cromossômica numérica, que consiste na deleção ou na duplicação de algum cromossomo. Diante disso, o objetivo da pesquisa foi analisar CTCs presentes no sangue dos pacientes diagnosticados com CaP e avaliar as possíveis ploidias cromossômicas dessas células. Inicialmente, foi feita a análise das amostras de sangue de 4 indivíduos saudáveis do sexo masculino (grupo controle) e de 4 pacientes com câncer de próstata metastático, por meio da técnica de citometria de fluxo, utilizando marcadores EpCAM e Aptâmero A4, que foi identificado pelo grupo de estudos (Souza et al, 2016 e patente BR1020170015637/PCT50290). A ploidia, também, foi avaliada por citometria de fluxo a partir da coloração dos núcleos das células com iodeto de propídeo. Os resultados da citometria de fluxo foram analisados no software FlowJo e as análises estatísticas foram feitas no software GraphPadPrism. Os pacientes possuem uma porcentagem maior de células A4+ em um subgrupo de células EpCAM+ do que os controles. Além disso, os pacientes, também, possuem uma maior porcentagem de células A4+ e EpCAM+ com alteração de ploidia quando comparado com os controles. Portanto, a citometria de fluxo demonstrou ser uma técnica promissora para detecção de CTCs e para análise de ploidia em células de pacientes com câncer de próstata metastático, o que pode auxiliar na melhora do diagnóstico e do prognóstico desses pacientes, impactando de forma positiva na qualidade de vida, caso seja aplicada na prática clínica.

Palavras-chave: ploidia, câncer de próstata, biópsia líquida.

ABSTRACT

Prostate cancer (CaP) is the second type of cancer that most affects men in the world. In many cases, patients develop metastasis in other organs, due to the release of circulating tumor cells (CTCs) into the bloodstream. One of the characteristics of the disease is the change in the ploidy of cells, such as, for example, aneuploidy, which is a numerical chromosomal change, which consists of the deletion or duplication of some chromosomes. Therefore, the objective of the research was to analyze CTCs present in the blood of patients with PCa and evaluate the possible chromosomal ploidy of these cells. Initially, blood samples from 4 healthy male individuals (control group) and 4 patients with metastatic prostate cancer were analyzed using the flow cytometry technique, using EpCAM and Aptamer A4 markers, which was identified by the study group (Souza et al, 2016 and patent BR1020170015637/PCT50290). Ploidy was also assessed by flow cytometry by staining cell nuclei with propidium iodide. Flow cytometry results were analyzed in FlowJo software and statistical analyzes were done in GraphPadPrism software. Patients have a higher percentage of A4+ cells in a subset of EpCAM+ cells than controls. Furthermore, patients also have a higher percentage of A4+ and EpCAM+ cells with altered ploidy when compared to controls. Therefore, the demonstrated flow cytometry is a promising technique for detecting CTCs and for analyzing ploidy in cells from patients with metastatic prostate cancer, which can help improve the diagnosis and prediction of these patients, positively impacting the quality of life, if applied in clinical practice.

Keywords: ploidy, prostate cancer, liquid biopsy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da localização da próstata no aparelho reprodutor masculino.....	13
Figura 2 – Cascata Metastática.....	17
Figura 3 – Imagem ilustrativa da seleção realizada para análise da população de leucócitos.....	25
Figura 4 – Porcentagem de células A4 ⁺ EpCAM ⁺	28
Figura 5 – Porcentagem de células duplo positivas para EpCAM e ploidia (Q2) em pacientes.....	29
Figura 6 – Porcentagem de células duplo positivas para EpCAM e ploidia (Q2) em controles.....	30
Figura 7 – Porcentagem de células EpCAM ⁺ que apresentam ploidia.....	31
Figura 8 – Porcentagem de células duplo positivas para Aptâmero A4 e ploidia (Q2) em pacientes.....	32
Figura 9 – Porcentagem de células duplo positivas para Aptâmero A4 e ploidia (Q2) em controles.....	33
Figura 10 – Porcentagem de Células A4 ⁺ que apresentam ploidia.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escore de Gleason.....	15
Tabela 2 – Estadiamento para Câncer de Próstata.....	15
Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com CaP.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – Acetato de Abiraterona
- ADT – Terapia de Privação Androgênica (do inglês Androgen Deprivation Therapy)
- AnLHRH – Agonistas do Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
- AR – Receptor de Andrógeno (do inglês Androgen receptor)
- CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CaP – Câncer de Próstata
- CEP/UFU – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia
- CNAs – Alterações no Número de Cópias (do inglês copy number alterations)
- CTCs – Células Tumorais Circulantes
- DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- EpCAM – Molécula de Adesão de Células Epiteliais (do inglês Epithelial cell adhesion molecule)
- FDA – Food and Drug Administration
- FSH – Hormônio Folículo-estimulante (do inglês Follicle-stimulating hormone)
- GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina (do inglês Gonadotropin-releasing Hormone)
- HC-UFU – Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
- LH – Hormônio Luteinizante (do inglês Luteinizing Hormone)
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- mCPRC – Câncer de Próstata Metastático Resistente a Castração (do inglês Metastatic castration-resistant prostate cancer)
- mCPSC – Câncer de Próstata Metastático Sensível a Castração (do inglês Metastatic castration-sensitive prostate cancer)
- MEC – Matriz Extracelular
- PSA – Antígeno Prostático Específico (do inglês Prostate-specific antigen)
- TCLE – Termo de Consentimento Livre Esclarecido
- TEM – Transição Epitélio Mesenquimal
- TME – Transição Mesenquimal Epitelial
- UFU – Universidade Federal de Uberlândia
- OMS – Organização Mundial de saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Geral	21
3.2. Específicos	21
4. METODOLOGIA	22
4.1. Coleta de Amostras Biológicas	22
4.2. Detecção das CTCs de amostras de sangue periférico e adição de marcadores	22
4.3. Marcação das células com iodeto de propídeo para análise de ploidia por citometria de fluxo	23
4.4. Análise dos dados da citometria de fluxo	24
4.5. Análise Estatística	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Dados clínicos e Laboratoriais dos Pacientes	26
5.2. Identificação e isolamento de CTCs	27
5.3. Análise de ploidia por quadrante	28
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças heterogêneas provocadas pelo crescimento desordenado e incontrolável de células, gerado por mutações genéticas e epigenéticas que controlam a proliferação, a sobrevivência, a propagação e a diferenciação celular (Sierra *et al.*, 2020). Atualmente, um dos cânceres mais frequentes na população masculina é o câncer de Próstata (CaP), considerado um problema de saúde pública, visto que é o segundo tipo de câncer que mais causa mortes em homens no mundo todo (Siegel *et al.*, 2020; Zang *et al.*, 2022). O CaP apresenta uma mortalidade significativa, pois os tumores da próstata são agressivos e muitos pacientes desenvolvem metástase em outros órgãos (Saini, 2016).

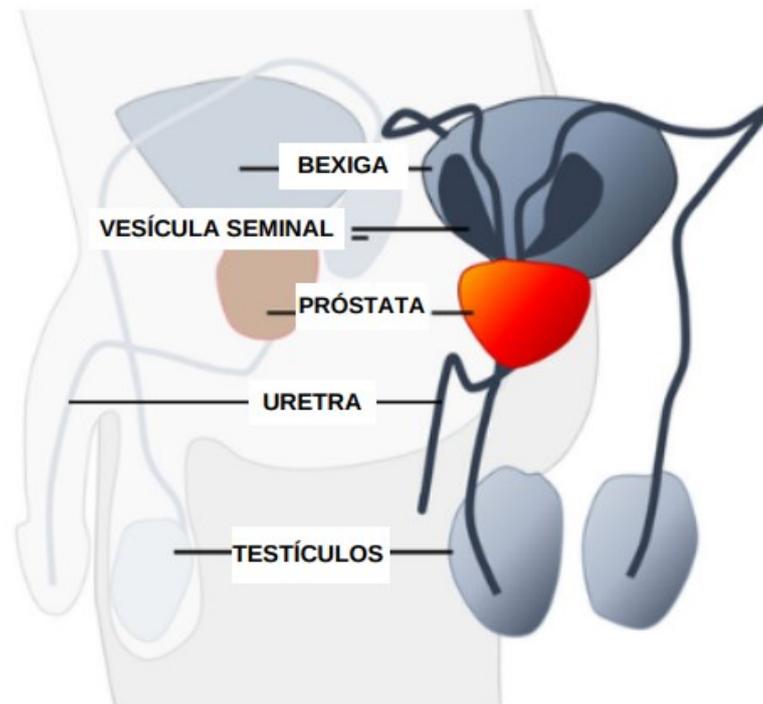
De acordo com a Organização Mundial de saúde (OMS), em 2020, o número estimado de novos casos de câncer de próstata foi de 1,4 milhão, o que corresponde a 15,2% de todos os tipos de câncer no mundo que afetam homens. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2020 foram registrados 15.841 óbitos por CaP, sendo que o número estimado de novos casos da doença de 2023 até 2025 é de 71.730. Sabe-se que o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença é a idade, visto que 75% dos novos casos no mundo se desenvolvem em homens acima de 65 anos. Além da idade, hereditariedade, etnia e peso corporal também são fatores de risco consideráveis para o desenvolvimento da doença (INCA, 2022).

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino em formato de pirâmide localizada abaixo da bexiga, na frente do reto e seu ápice fica em contato com a uretra (Figura 1). A função dessa glândula é produzir o líquido prostático, ou seja, o fluido que compõe o sêmen (Ittmann, 2018). O tumor da próstata se desenvolve, inicialmente de forma localizada, quando as células epiteliais basais e luminais da próstata se proliferam de forma progressiva e descontrolada devido as mutações somáticas no genoma.

A partir desse crescimento descompensado inicia-se a cascata metastática, que ocorre quando o crescimento de células tumorais primárias se estende para tecidos próximos a próstata. As células tumorais alcançam a corrente sanguínea e os vasos linfáticos, sendo transportadas para outros tecidos, onde se proliferam e desenvolvem um tumor metastático (Eslami-s *et al.*, 2020; Imodoye *et al.*, 2021). Os

primeiros alvos da disseminação metastática são linfonodos pélvicos e ossos. Posteriormente, a doença pode chegar até órgãos distantes, como fígado, pulmões e cérebro, quando é associada a uma pior sobrevida dos pacientes (Miller *et al.*, 2018; Rebello *et al.*, 2021).

Figura 1 - Representação esquemática da localização da próstata no aparelho reprodutor masculino



Fonte: Figura adaptada de SAUER *et al* (2020).

O tratamento hormonal de pacientes com câncer de próstata metastático é feito com medicamentos que possuem diversos mecanismos de ação, mas que visam prolongar a sobrevida global, como, por exemplo, os fármacos de terapia de privação androgênica (ADT, do inglês Androgen Deprivation Therapy), os radioisótopos, os taxanos e o acetato de abiraterona (AA) inibidor da CYP17 (Miller *et al.*, 2018).

Porém, em alguns casos, os pacientes se tornam resistentes aos fármacos, e, assim, a eficácia do medicamento diminui. Dessa forma, a doença evolui de um câncer de próstata metastático sensível a castração (mCPSC) para um o câncer de próstata metastático resistente a castração (mCPRC), um tipo mais avançado de câncer responsável por uma alta mortalidade dos pacientes. O local de metástase mais

frequente é o tecido ósseo e, nessa fase, ocorre a reincidência da doença, mesmo após cirurgia ou terapia hormonal, o que indica necessidade de cuidados paliativos (Eslami-s *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2023).

Atualmente, devido à alta mortalidade por CaP, o diagnóstico, o rastreamento e a análise de progressão da doença são realizadas por meio do exame clínico de toque retal, que avalia o tamanho da próstata e a presença de nódulos e, da dosagem sérica de uma serino-protease conhecida como antígeno prostático específico (PSA), que é secretado pelas células do epitélio prostático em casos de CaP, hiperplasia prostática, aumento da idade, cirurgias ou tratamentos hormonais (Merriel *et al.*, 2018; Campos-Fernández *et al.*, 2021). Logo, o PSA pode ser encontrado em secreções normais, mas os níveis elevados estão, frequentemente, associados ao CaP, sendo que o valor considerado normal de PSA é menor ou igual a 4 ng/mL (Saini, 2016).

Porém, o teste de PSA tem baixa especificidade, visto que o nível desse antígeno pode aumentar em outras condições além do CaP, como, por exemplo, em situações de prostatite ou hiperplasia benigna da próstata, o que pode gerar resultados falso positivos (Saini, 2016; Blackwelder *et al.*, 2019). Ambos os exames auxiliam na decisão de realizar outros testes diagnósticos, como ressonância magnética e biópsia de tecido, visto que qualquer alteração nos níveis de PSA ou na anatomia da próstata indica necessidade de realizar esses exames para confirmação da doença (Fenton *et al.*, 2018; Merriel *et al.*, 2018; INCA, 2022).

Além do PSA, o *Escore de Gleason* é um importante critério prognóstico capaz de prever a sobrevida dos pacientes com CaP a partir da avaliação histológica de tecidos para biópsia (Bai *et al.*, 2021). A partir da biópsia tecidual, os pacientes são categorizados em 5 grupos cujos padrões primários e secundários das células do câncer de próstata variam de 1 a 5, de acordo com o grau de danificação dessas células e com o risco de disseminação para outras regiões do organismo. O *Escore de Gleason* (Tabela 1) é a soma desses dois padrões, sendo que o primeiro dígito indica o tipo de célula mais numerosa do padrão primário e o segundo dígito indica o tipo de célula mais numerosa no padrão secundário. Diante disso, quanto maior o Escore de Gleason, mais avançado é o tumor e, conseqüentemente, mais agressiva é a doença (Buyyounouski *et al.*, 2017).

Tabela 1- Escore de Gleason

Grupos	Escore de Gleason
1	≤6 (≤3 + 3)
2	7 (3+4)
3	7 (4+3)
4	8 (4+4; 3+5; 5+3)
5	9 ou 10 (4+5; 5+4; 5+5)

Fonte: Autoria própria baseado em BUYYOUNOUSKI *et al.* (2017)

Além disso, o risco de progressão da doença pode ser definido a partir da classificação patológica do Estadiamento TNM que correlaciona a localização e a extensão do tumor, de acordo a biópsia tecidual, sendo dividido em 3 categorias: (T) que analisa a extensão do tumor primário, avaliando as regiões afetadas da próstata, (N) que avalia os linfonodos regionais afetados pelo câncer e (M) que indica metástase tumoral à distância. Portanto, a partir do estadiamento TNM, os pacientes são agrupados em diferentes estadios: I, II, III e IV (Tabela 2) (Buyyounouski *et al.*, 2017).

Tabela 2- Estadiamento para Câncer de Próstata

Estadio I	Câncer diagnosticado devido aumento de PSA
Estadio II	Câncer diagnosticado devido a presença de nódulo na próstata IIA → Câncer localizado em um lado só da próstata IIB → Câncer localizado em ambos os lados da próstata
Estadio III	Câncer que disseminou para os tecidos ao redor da próstata IIIA → Câncer que disseminou para vesícula seminal IIIB → Câncer que disseminou para o reto IIIC → Câncer que disseminou para a bexiga urinaria
Estadio IV	IVA → Câncer que disseminou para os linfonodos IVB → Câncer que disseminou para os ossos e outros órgãos

Fonte: Autoria própria baseado em BUYYOUNOUSKI *et al.* (2017)

Portanto, a biópsia de tecido é um procedimento tradicional utilizado para detecção, confirmação, estadiamento e prognóstico do câncer (Chen *et al.*, 2019).

Porém, apesar de ser o padrão ouro, essa ferramenta diagnóstica é extremamente agressiva e desconfortável, pois o paciente precisa passar por cirurgia, com risco de complicações, como sangramento, infecção e retenção urinária, além de ser um método menos abrangente na avaliação da heterogeneidade do tumor (Crocetto *et al.*, 2022; Lone *et al.*, 2022).

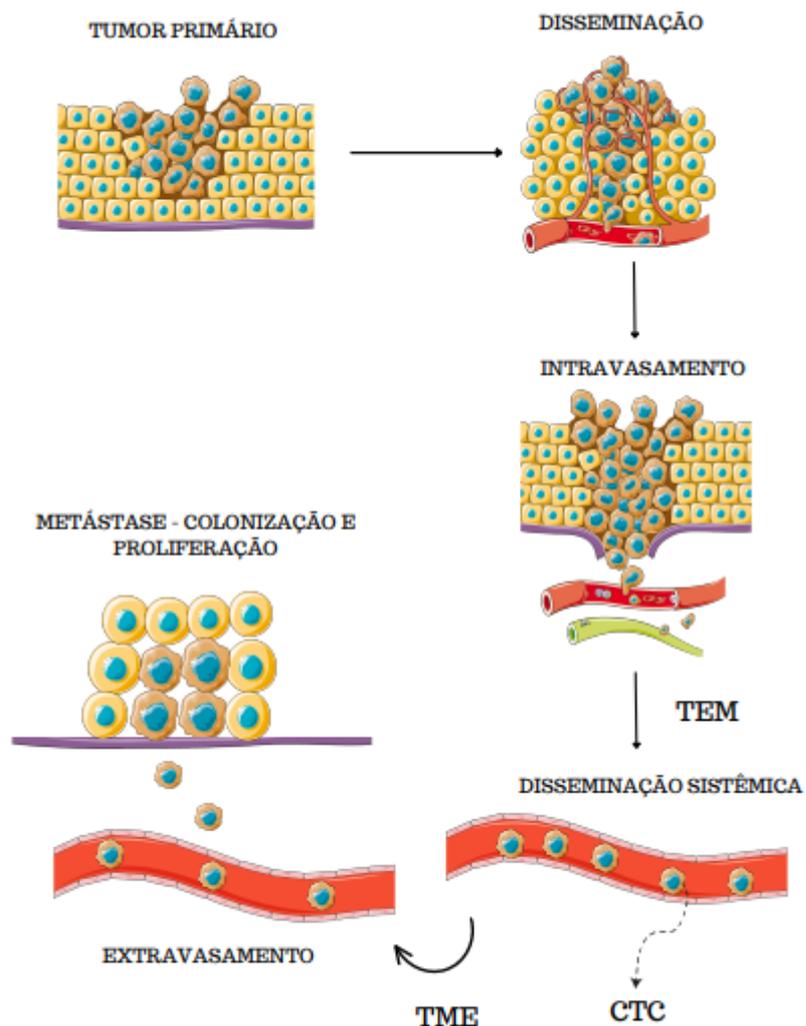
Diante dessa situação, a pesquisa oncológica atual apresenta uma nova alternativa para detecção de tumores, a partir da análise de fluidos biológicos, por meio de biópsia líquida, uma técnica promissora na prática clínica, visto que pode ser aplicada em diferentes estadios da doença e, inclusive, durante o tratamento (Armakolas *et al.*, 2023). Além disso, é pouco invasiva, possui maior sensibilidade diagnóstica comparada ao método tradicional e fornece informações sobre mutações genômicas, ploidias, alterações no número de cópias (CNAs, do inglês *copy number alterations*) de genes e alterações epigenéticas (Chen *et al.*, 2019; Michela, 2021; Armakolas *et al.*, 2023).

A biópsia líquida pode ser realizada a partir da avaliação genômica e proteômica de elementos provenientes do tumor como, por exemplo, as Células Tumorais Circulantes (CTCs) (Lone *et al.*, 2022). A epigenética pode modificar a expressão de genes responsáveis pela migração celular, fazendo com que células cancerígenas se desprendam do tumor primário, atravessem a barreira endotelial e a matriz extracelular (MEC) e entrem na corrente sanguínea ou na corrente linfática, tornando-se células tumorais circulantes, que são transportadas pelo sangue e chegam até tecidos distantes, onde ocorre o extravasamento e a proliferação (Dhar *et al.*, 2018; Eslami-s *et al.*, 2020; Imodoye *et al.*, 2021).

Para sobreviver a mudança de ambiente, as CTCs adquirem um fenótipo mesenquimal durante o processo de transição epitélio mesenquimal (TEM) e, posteriormente, durante a transição mesenquimal epitelial (TME) essas células adquirem novamente um fenótipo epitelial. Portanto, a TEM é um processo que ocorre devido a sinais do microambiente, a fim de garantir maior capacidade migratória e propriedades invasivas às CTCs. Além disso, ao chegarem em outro microambiente favorável para proliferação, as CTCs interagem com células endoteliais, o que promove o aumento da permeabilidade da barreira endotelial e, conseqüentemente, possibilita o extravasamento dessas células em um órgão ou tecido, onde se proliferam gerando a metástase (Figura 2). Porém, em alguns casos, não ocorre a

TEM ou ocorre de forma incompleta, o que resulta em CTCs com fenótipo intermediário, com características epiteliais e mesenquimais (Scheel *et al.*, 2012; Eslami-s *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020; Imodoye *et al.*, 2021).

Figura 2 - Cascata Metastática



Legenda: As etapas da cascata metastática estão divididas em invasão, disseminação, intravasamento de células, transporte das CTCs pela circulação sistêmica, extravasamento, colonização de um novo tecido ou órgão e proliferação.

Fonte: Autoria própria baseado em SCHEEL et al (2012).

Dessa forma, como as CTCs podem se originar de diversos tecidos são uma população de células heterogêneas que indicam a progressão da doença. Além disso, essas células são liberadas no sangue, mas em pacientes com CaP, também, podem

ser identificadas na urina, no líquido seminal ou nas fezes, tendo em vista que são células derivadas da próstata (Campos-Fernández *et al.*, 2019). No caso do CaP, as CTCs de amostras de sangue são o alvo principal da biópsia líquida (Campos-Fernández *et al.*, 2020). Assim, com auxílio dessa técnica promissora, o diagnóstico e o prognóstico do CaP podem ser avaliados a partir do estudo das CTCs com seus ligantes específicos, como os aptâmeros e biomarcadores tumorais (Souza *et al.*, 2016).

Diante disso, pesquisadores estão analisando moléculas que apresentem afinidade a alvos específicos e que podem ser uma alternativa de novos marcadores para diagnóstico, prognóstico e terapia do CaP. Portanto, um exemplo dessas moléculas são os aptâmeros, que consistem em oligonucleotídeos capazes de se ligar a um alvo específico, de forma análoga a um anticorpo.

Um estudo feito por Souza *et al* (2016) utilizando a linhagem celular PC-3 de câncer de próstata foi realizado para selecionar aptâmeros de RNA específicos do CaP, por meio de uma variante da técnica SELEX, conhecida como Cell-SELEX associada à cultura celular tridimensional (3D) por levitação magnética. Com base nisso, foram analisados 8 aptâmeros presentes em uma biblioteca de RNA extraída de amostras de sangue de pacientes com CaP e selecionou-se o Aptâmero A4, uma molécula que apresentou alta capacidade de ligação às células tumorais da próstata (Souza *et al.*, 2016).

Ademais, uma das características do câncer é uma alteração na ploidia das células, como a aneuploidia, que é uma alteração cromossômica numérica que consiste na deleção ou duplicação de algum cromossomo no cariótipo. Essa alteração pode ocorrer devido à instabilidade genômica e é capaz de provocar mutações, desregulação gênica e perda do controle do ciclo celular (Kildal *et al.*, 2017).

As células cancerígenas, geralmente, apresentam um número de cromossomos acima do número diploide normal e, por isso, a maior parte dos tumores cromossomicamente instáveis possuem aneuploidia (Kildal *et al.*, 2017; Kojima *et al.*, 2019). A alteração na ploidia pode mediar as alterações genéticas associadas ao estabelecimento do tumor e o aumento do número de cópias cromossômicas pode indicar se uma linhagem celular é invasiva ou não, o que influencia, diretamente, na escolha do tratamento adequado (De Oliveira-Júnior *et al.*, 2016).

Portanto, a análise de ploidia é um elemento prognóstico significativo e determinante terapêutico do câncer, tendo em vista que as CTCs que apresentam ploidia no DNA estão associadas com um pior prognóstico do paciente e com uma diminuição na eficácia do tratamento. Assim, o estudo dessa anormalidade na quantidade de material genético pode indicar a melhor abordagem terapêutica, a fim de evitar o tratamento excessivo, o que, conseqüentemente, melhora a qualidade de vida dos homens diagnosticados com CaP (Kildal *et al.*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

O Câncer de Próstata é uma doença com alta prevalência mundial e é considerado um problema de saúde pública. Em muitos casos os pacientes desenvolvem metástase devido a liberação de CTCs na corrente sanguínea. A biópsia líquida, técnica abordada nesse estudo, é importante de ser estudada, tendo em vista que é um procedimento pouco invasivo e extremamente promissor na prática clínica. Além disso, a alteração de ploidia, como a aneuploidia, também, é importante de ser estudada, visto que é um biomarcador prognóstico do CaP. Essa pesquisa de identificação de ploidias no DNA das Células Tumorais Circulantes do CaP foi feita utilizando biópsia líquida, com aptâmeros e biomarcadores ligantes das CTCs de CaP. Portanto, esse trabalho mostra a importância de investigar as possíveis alterações cromossômicas existentes no material genético dessas células, que podem causar metástase. Conseqüentemente, esta metodologia poderá auxiliar na melhora do prognóstico e do tratamento de pacientes com CaP, visto que de acordo com a ploidia presente na CTC, o prognóstico do paciente pode ser ruim, tendo uma piora na eficácia do tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- ✓ Analisar Células Tumerais Circulantes presentes no sangue dos pacientes diagnosticados com Câncer de Próstata e as possíveis ploídias de DNA no núcleo dessas células.

3.2. Específicos

- ✓ Isolar células do sangue de pacientes com CaP e de pacientes saudáveis e analisar por meio da técnica de citometria de fluxo utilizando os marcadores Aptâmero A4⁺ e EpCAM⁺;
- ✓ Analisar as CTCs em relação a intensidade de fluorescência e tamanho dos núcleos, para avaliar a ploídia;
- ✓ Fazer uma análise relacionando os resultados da citometria de fluxo com os dados dos prontuários dos pacientes com CaP.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta de Amostras Biológicas

A pesquisa foi realizada mediante a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), de acordo com o número de Protocolo de Pesquisa com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 71108817.2.0000.5152. Os pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) convidados a participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) antes da coleta autorizando a doação de amostras.

Foram coletadas 4 amostras de sangue de pessoas do sexo masculino saudáveis (grupo controle) e 4 amostras de pacientes com câncer de próstata metastático, que estavam em tratamento no Setor de Oncologia do HC-UFU. Essas amostras biológicas foram coletadas em tubos a vácuo de 4 mL contendo EDTA, mantidas em temperatura ambiente e encaminhadas para o Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Biotecnologia da UFU para processamento e análise. Além disso, os dados clínicos e os prontuários dos pacientes foram consultados.

4.2. Detecção das CTCs de amostras de sangue periférico e adição de marcadores

Os tubos com EDTA contendo as amostras de sangue que chegaram ao Laboratório de Nanobiotecnologia foram centrifugados a 200 g por 15 minutos à temperatura ambiente, a fim de separar o anel leucocitário. Portanto, após centrifugar, o anel leucocitário das amostras foi coletado e dividiu-se 90 µL em cada tubo. Em seguida, foi feita a lise das hemácias utilizando 2mL de solução de lise de hemácias DB Pharm Lyse (Franklin Lakes, NJ, EUA) por tubo, tendo em vista que se não for feita a lise de maneira correta as hemácias são contadas como eventos no citômetro de fluxo. Após a lise das hemácias, os tubos de citometria foram vortexados e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 200 g por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado por inversão, o *pellet* de cada tubo foi ressuspenso em 1 mL de solução de lavagem contendo tampão PBS 1x, pH 7,4; 1% BSA e 0,1% azida básica e esse procedimento de lavagem foi repetido duas

vezes. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado em 90 μL de solução de lavagem e 10 μL de solução de bloqueio, composta por plasma humano do tipo AB inativado, e os tubos foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, no escuro, foram adicionados os marcadores nos tubos correspondentes:

- Tubo 1: contendo apenas células sem marcação, para ser utilizado como controle negativo;
- Tubo 2: contendo marcadores- 0,2 μL do Aptâmero A4⁺ e 0,25 μL do EpCAM⁺;
- Tubo 3: contendo isotipos dos marcadores- 0,2 μL de SAV-FITC (isotipo do Aptâmero A4⁺); 0,25 μL de IgG1 κ -APC (400120) (isotipo do EpCAM⁺).

Após a adição dos anticorpos, os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos a 4 °C no escuro, a fim de evitar interferência da luz nos fluorocromos dos marcadores. Posterior a incubação, os tubos foram centrifugados a 200 g por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado por inversão, o *pellet* de cada tubo foi ressuspensionado em 1 mL de solução de lavagem e esse processo foi repetido duas vezes. O tubo 2 foi ressuspensionado em 100 μL de solução de lavagem e os tubos 1 e 3 foram mantidos no escuro a 4 °C.

Após esse processo, foi feita a marcação indireta do tubo 2, ou seja, foi adicionado 0,2 μL de SAV-FITC no escuro, o tubo foi homogeneizado e incubado a 4 °C por 30 minutos no escuro. Após a incubação, o tubo 2 foi centrifugado a 200 g por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* do tubo 2 foi ressuspensionado em 1 mL de solução de lavagem. Em seguida, o tubo 2 foi centrifugado novamente por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado por inversão e o procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez.

4.3. Marcação das células com iodeto de propídeo para análise de ploidia por citometria de fluxo

Para realizar a análise de ploidia, os tubos 1, 2 e 3 foram fixados com 100 μL de glutaraldeído 0,25% e incubados por 15 minutos a 4° C no escuro. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 200 g por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de solução de lavagem. Posteriormente, os tubos foram centrifugados novamente a 200 g por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado por inversão, o *pellet* foi ressuspensionado

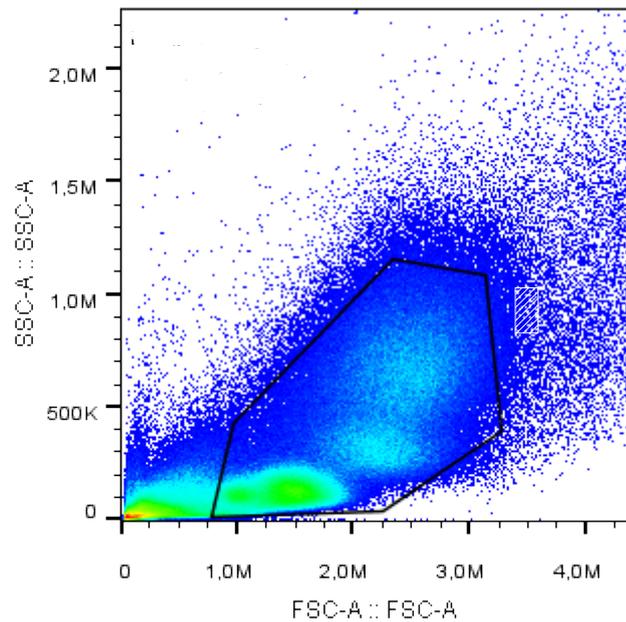
em 100 µL de solução de lavagem e o tubo 1 foi mantido no escuro a 4 °C até ser feita a leitura. Além disso, nos tubos 2 e 3 foram adicionados 2 µL de iodeto de propídeo (Invitrogen™ REF:1921848) e 5 µL de RNase (Sigma-Aldrich). Por fim, os tubos 2 e 3 foram incubados por 30 minutos a 37 °C no escuro e após a incubação, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

4.4. Análise dos dados da citometria de fluxo

As amostras foram analisadas utilizando o citômetro Accuri C6 (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), sendo filtro 533/30 para ler fluorescência do Aptâmero - FITC (FL-1), o filtro 585/40 para ler fluorescência do iodeto de propídeo - PE (FL-2) e o filtro 670 LP para ler a fluorescência de EpCAM - APC (FL-4), considerando até 500.000 eventos no tubo sem marcação (tubo 1) identificados segundo seu tamanho e granulosidade. De acordo com essas células encontradas no tubo 1 foi feito um “*gate*” de células a fim de eliminar os “*debris*”. Em seguida, o tubo com células marcadas (tubo 2) e o tubo com isotipos (tubo 3) foram analisados conforme os parâmetros de *gate* já aplicados para o tubo 1.

Os resultados obtidos no citômetro de fluxo foram analisados utilizando o software FlowJo, versão X 10.0.7r2 para Windows. Primeiramente, foi feito um “*gate*” selecionando a população de leucócitos do tubo sem marcação (tubo1) (Figura 3), a partir dessa população foi feito delimitado o “*single cells*” e essa configuração foi aplicada para os tubos 2 e 3. Em seguida, nas células marcadas com os isotipos (tubo 3) foi feita uma delimitação específica por meio de histogramas, identificando as células positivas para EpCAM e para Aptâmero A4.

Figura 3- Imagem ilustrativa da seleção realizada para análise da população de leucócitos



Nesse caso, o isotipo é um controle negativo que determina a fluorescência basal que a própria célula emite quando é marcada com um anticorpo não específico a nenhuma proteína desta célula. Diante disso, o isotipo é utilizado para padronizar o limite de interpretação dos sinais de fluorescência durante a análise dos resultados, sendo que os sinais considerados como positivos são aqueles acima dos valores de fluorescência do isotipo (Pereira, 2007).

Por fim, a partir da análise do isotipo, no tubo contendo células marcadas (tubo 2) foram identificadas as células positivas para Aptâmero A4 dentro da subpopulação de células positivas para EpCAM. Diante disso, foram obtidos valores de porcentagem de células EpCAM⁺ A4⁺. Além disso, foi feita uma análise separada por quadrante duplo positivo para identificar a porcentagem de células com ploidia EpCAM⁺ e células com ploidia A4⁺.

4.5. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPadPrism*, versão 8.0.1, considerando o valor de p menor que 0,05 ($p < 0,05$) como significativo. Primeiramente, realizou-se o teste de normalidade de dados e, a partir do resultado das variáveis, foi feito Teste-T não pareado para variáveis paramétricas, com distribuição normal, e teste Mann-Whitney para variáveis não paramétricas.

5. RESULTADOS

5.1. Dados Clínicos e Laboratoriais dos Pacientes

As características clínicas e laboratoriais dos pacientes voluntários da pesquisa estão presentes na Tabela 3. A pesquisa foi realizada com 4 pacientes que possuem idade superior a 55 anos e com 4 voluntários controle do sexo masculino com idade variando entre 20 e 30 anos, o que permite inferir que o PSA total desses indivíduos controle é menor que 4,0 ng/mL. Os valores de PSA Total e *Escore de Gleason* foram registrados apenas para o grupo de pacientes, visto que são dados clínicos específicos para pacientes com CaP. Analisando PSA Total é possível observar que 2 pacientes (50%) apresentaram PSA maior que 4,0 ng/mL e 2 pacientes (50%) possuem PSA menor que 4,0 ng/mL.

Com relação ao Escore de Gleason, todos os 4 pacientes (100%) possuem a soma dos padrões maior ou igual a sete. Além disso, também foram obtidos, por meio dos prontuários, dados de estadiamento, sítio metastático, realização de cirurgia e tratamento de cada paciente com CaP. Diante disso, todos os 4 pacientes (100%) possuem estadiamento IVB, o que indica metástase óssea como principal sítio metastático.

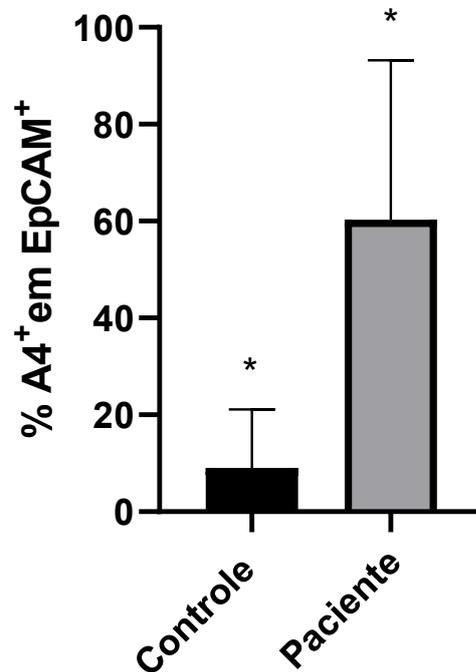
Tabela 3- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com CaP

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Idade (anos)	63	62	56	73
PSA Total (ng/mL)	34,146	173,912	0,02	0,6
Escore de Gleason	8 (5+3)	8 (4+4)	7 (4+3)	7 (3+4)
Estadiamento	IVB	IVB	IVB	IVB
Metástase	Ossos e vesícula seminal	Ossos e linfonodos não regionais	Ossos e linfonodos regionais	Ossos
Cirurgia	Prostatectomia radical	Orquiectomia bilateral	Prostatectomia radical	-
Tratamento	2021-2022: AnLHRH, Docetaxel e Ácido zoledrônico 2022-2023: Abiraterona + prednisona 11/2023: Leuprorrelina + zometa	02/2023: Bicalutamida	2021-2023: AnLHRH	2021-2023: AnLHRH 2023: Leuprorrelina

5.2. Identificação e isolamento de CTCs

A metodologia de citometria de fluxo foi capaz de diferenciar CTCs de células não tumorais a partir da emissão de fluorescência emitida pelos marcadores aptâmero A4 e EpCAM em células A4⁺ EpCAM⁺. O teste demonstrou um valor de $p=0,0265$ ($p<0,05$), sendo significativo para uso no diagnóstico de CaP por meio de citometria de fluxo. Portanto, a metodologia mostrou que pacientes possuem 60,3% de células A4⁺ em EpCAM⁺ e controles possuem 9.065% de células A4⁺ em EpCAM⁺ (Figura 4).

Figura 4 – Porcentagem de células A4⁺ EpCAM⁺



5.3. Análise de ploidia por quadrante

Inicialmente, foi feita uma análise de ploidia por quadrante duplo positivo dos gráficos FL2 X FL4, correspondente a análise de células EpCAM⁺ com aneuploidia, considerando a porcentagem de células dos quadrantes 2 (Q2) dos pacientes (Figura 5) e dos controles (Figura 6). Nos gráficos presentes nas figuras 5 e 6 é possível observar um padrão de células para pacientes e um padrão de células para controles. Em seguida, os valores de porcentagem de células dos quadrantes Q2 de pacientes e controles foram analisados estatisticamente e o resultado encontrado foi significativo, com valor de $p = 0,0286$ ($p < 0,05$), sendo que pacientes possuem 80,025% das células EpCAM⁺ apresentando ploidia e controles possuem 15,765% das células EpCAM⁺ apresentando aneuploidia (Figura 7), ou seja, foi encontrada uma porcentagem maior de células com alterações cromossômicas em pacientes do que no grupo controle.

Figura 5- Porcentagem de células duplo positivas para EpCAM e ploidia (Q2) em pacientes

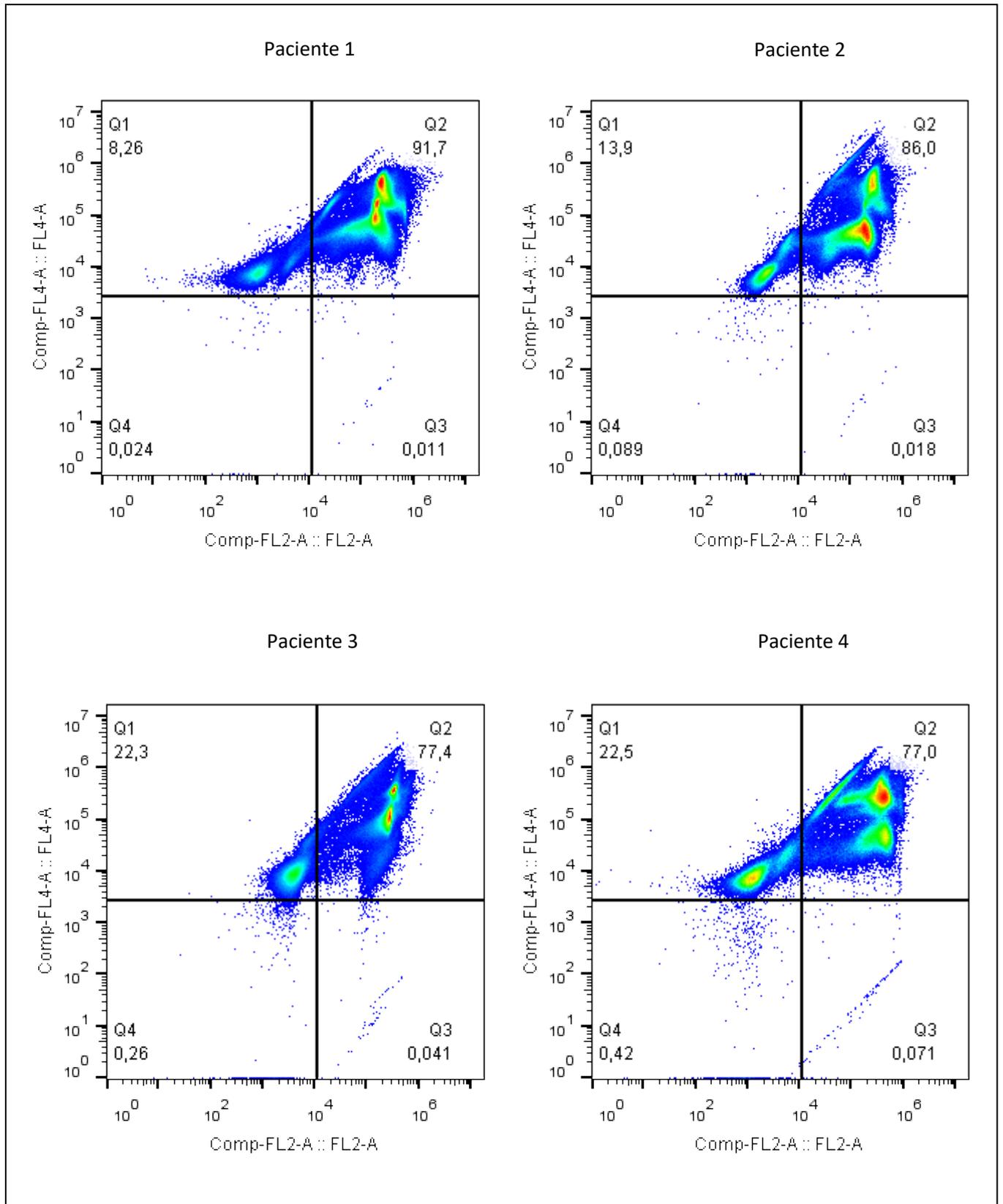


Figura 6- Porcentagem de células duplo positivas para EpCAM e ploidia (Q2) em amostras controles

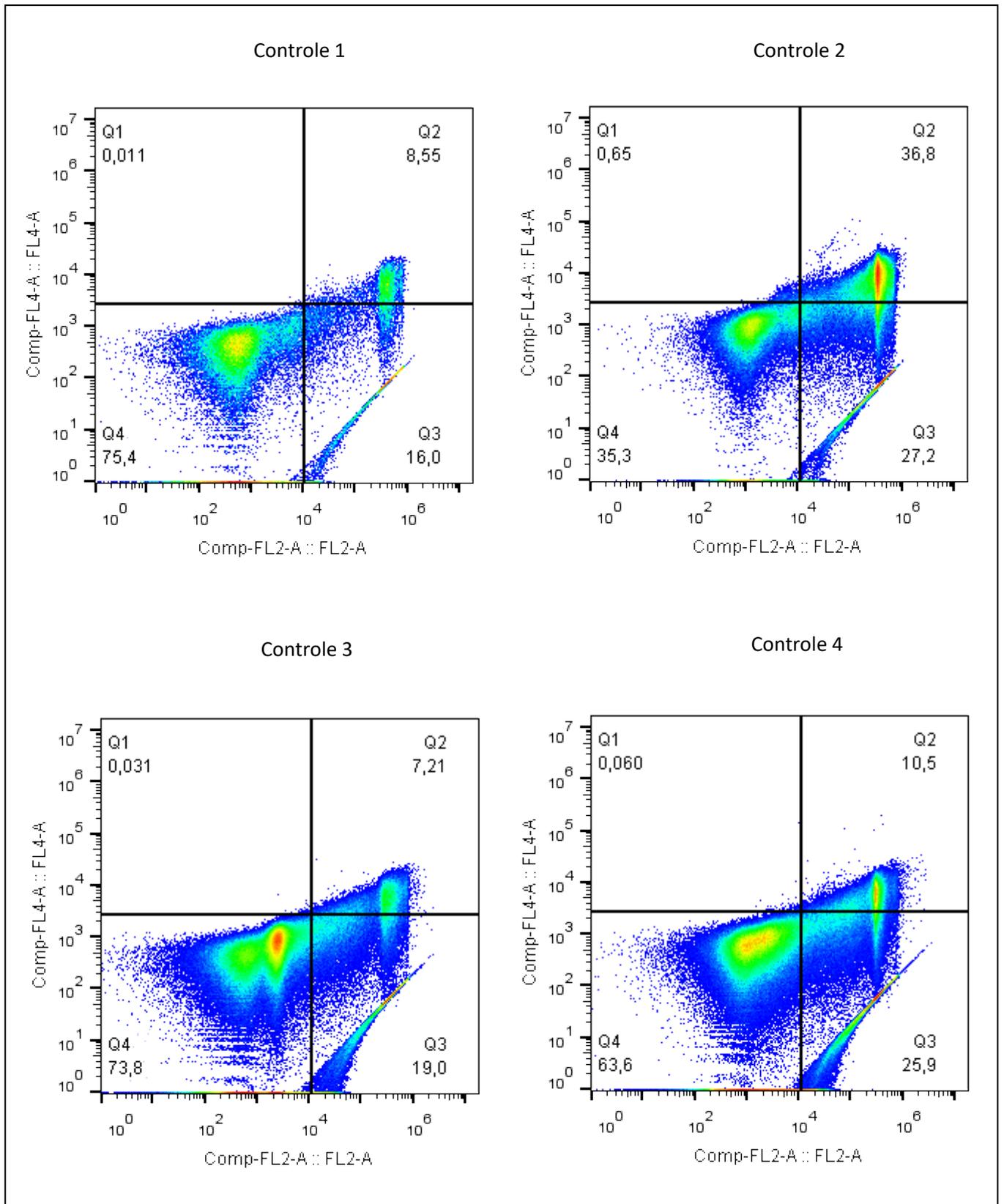
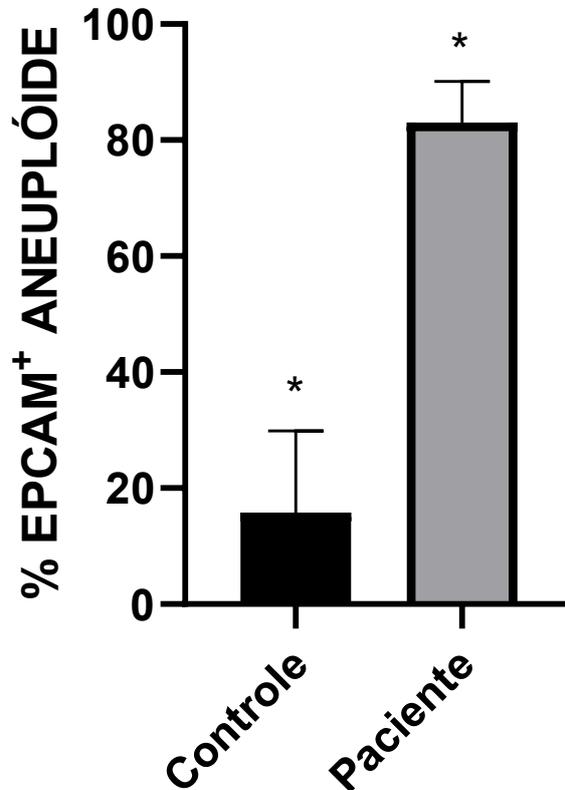


Figura 7- Porcentagem de células EpCAM⁺ que apresentam ploidia



Posteriormente, foi feita outra análise de ploidia por quadrante duplo positivo para os gráficos FL2 X FL1, correspondentes a análise das células A4⁺ com aneuploidia, considerando a porcentagem de células dos quadrantes Q2 dos pacientes (Figura 8) e dos controles (Figura 9). Nesse caso, também, é possível observar um padrão de células semelhantes nos gráficos dos pacientes, diferenciando dos gráficos dos controles. Os valores de porcentagem de células dos quadrantes Q2 de pacientes e controles foram analisados estatisticamente e o resultado encontrado, também, foi significativo, com valor de $p < 0,0001$ ($p < 0,05$), sendo que pacientes possuem 84,95% das células A4⁺ apresentando ploidia e controles possuem 14,79% das células A4⁺ apresentando aneuploidia (Figura 10), ou seja, foi encontrada uma porcentagem maior de células com alterações cromossômicas em pacientes quando comparado com o grupo controle.

Figura 8- Porcentagem de células duplo positivas para Aptâmero A4 e ploidia (Q2) em pacientes

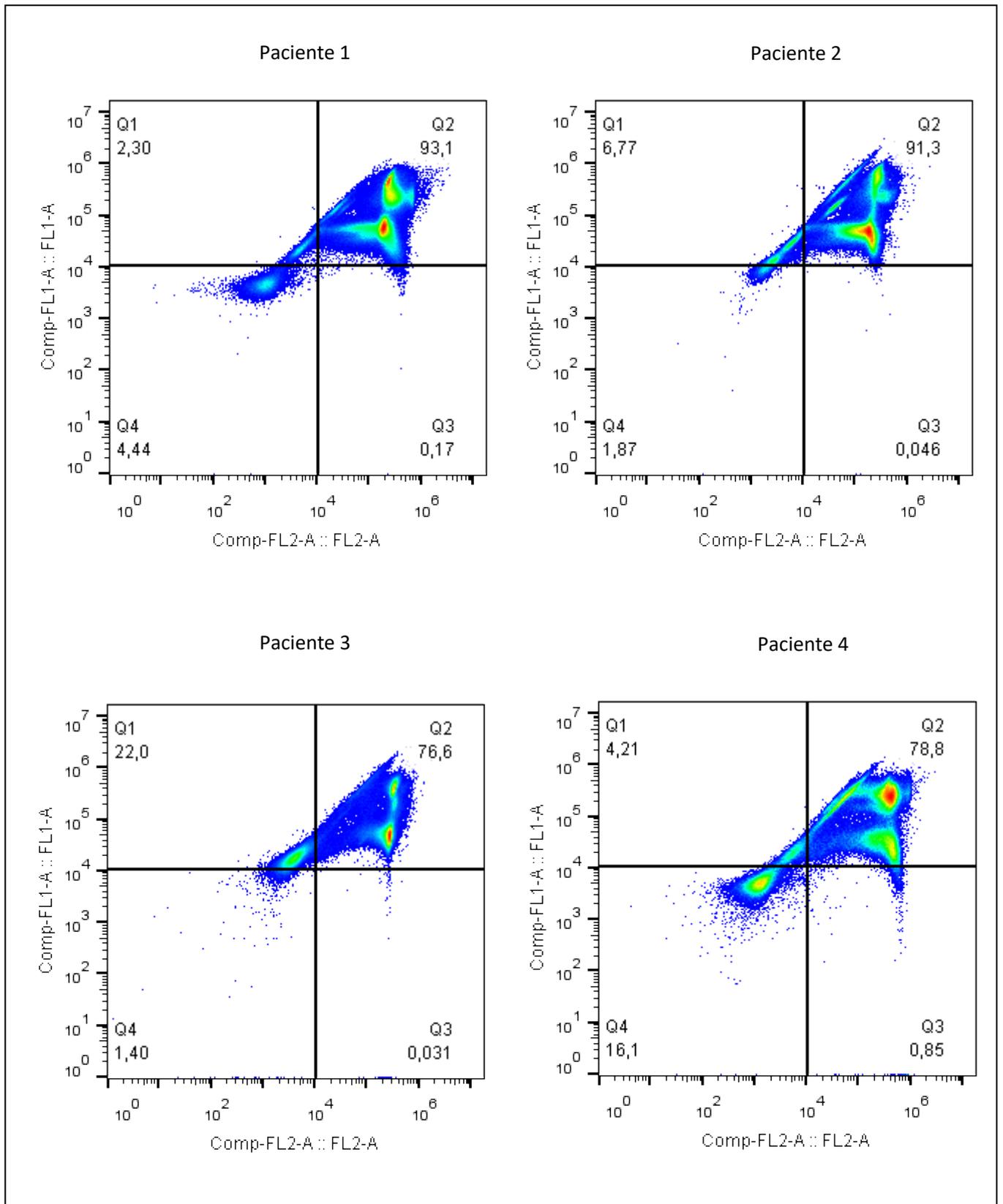


Figura 9- Porcentagem de células duplo positivas para Aptâmero A4 e ploidia (Q2) em amostras controles

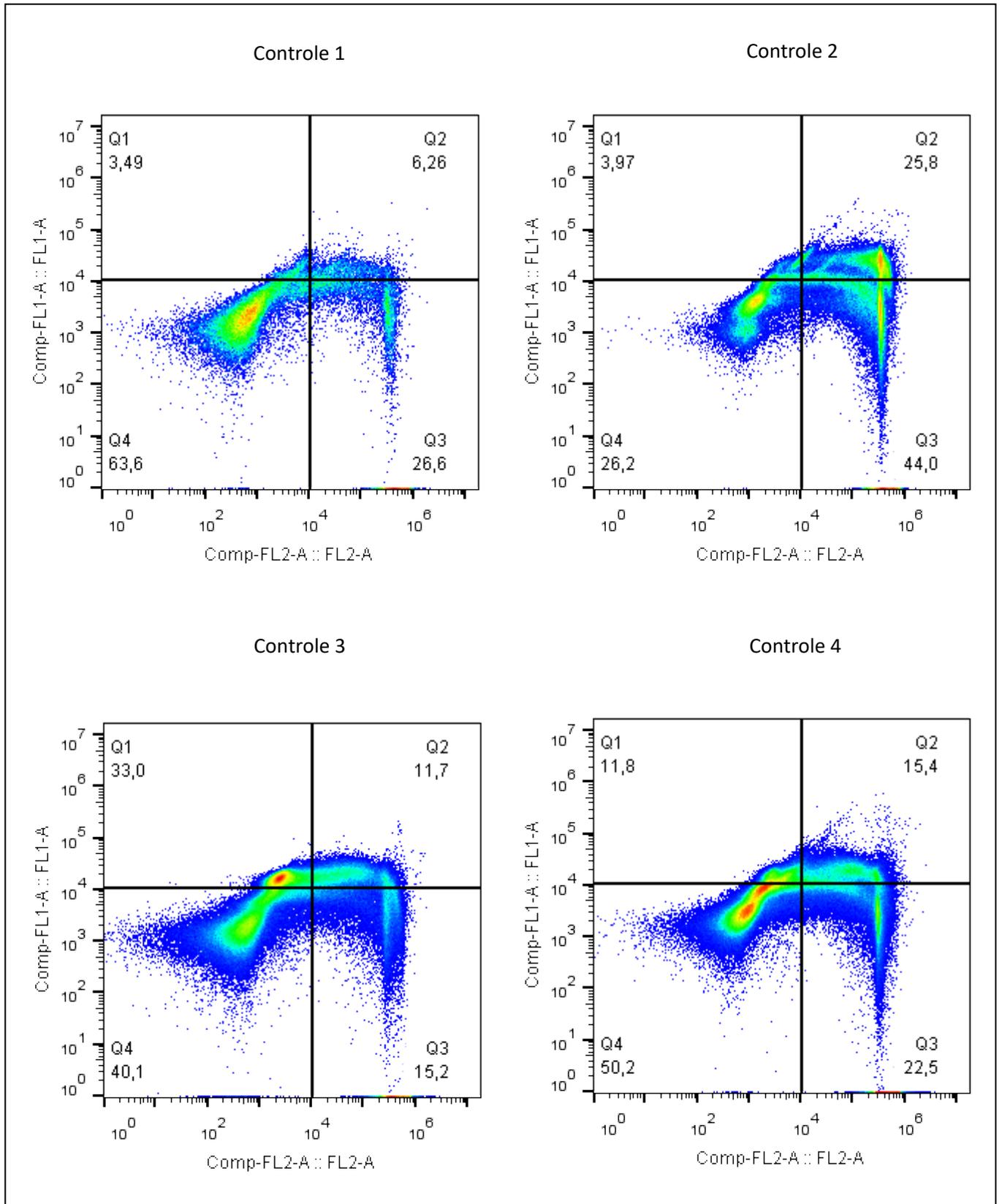
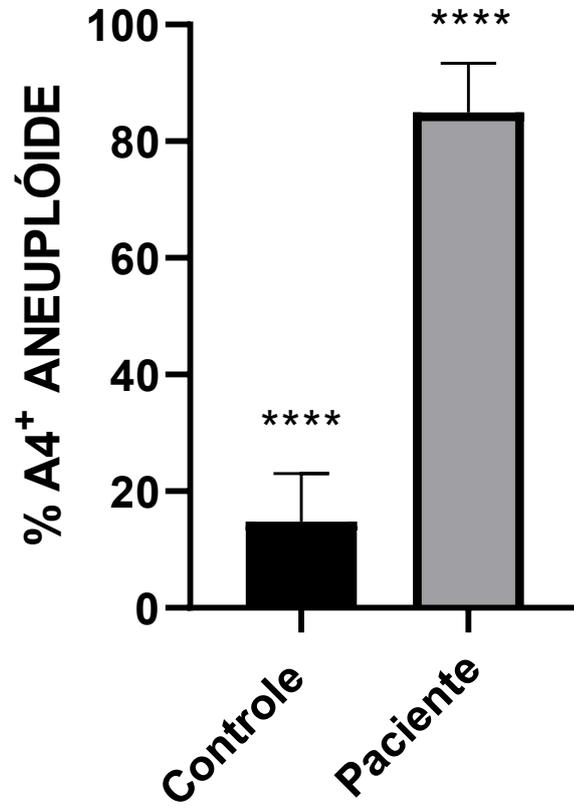


Figura 10- Porcentagem de Células A4⁺ que apresentam ploidia



6. DISCUSSÃO

Essa pesquisa teve como objetivo analisar Células Tumorais Circulantes presentes na corrente sanguínea de pacientes diagnosticados com câncer de próstata através da técnica de citometria de fluxo, a partir de marcadores EpCAM e Aptâmero A4, e identificar as possíveis ploídias de DNA no núcleo dessas células. A população de células escolhida para identificação e detecção das CTCs no citômetro de fluxo foram os leucócitos, tendo em vista que as CTCs possuem características morfológicas, como tamanho e granulosidade semelhantes aos leucócitos (Reis *et al.*, 2019). Em seguida, foi feita uma relação entre os resultados encontrados e as variáveis clínicas e laboratoriais, como idade, PSA total, estadiamento, cirurgia e tratamento.

A detecção de células tumorais circulantes, atualmente, aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA), é feita através da expressão do marcador de superfície conhecido como molécula de adesão de células epiteliais (EpCAM), que consiste em uma glicoproteína transmembrana, expressa em células epiteliais normais, mas principalmente em tumores de origem epitelial, como o de próstata (Huang *et al.*, 2018; Rushton *et al.*, 2021). Na maioria dos casos, a expressão de EpCAM em CTCs está correlacionada com uma pior sobrevida e um prognóstico ruim, o que torna o EpCAM um bom marcador prognóstico (Rushton *et al.*, 2021).

Um estudo realizado por Oliveira *et al* (2017) demonstrou que o aptâmero A4 é um oligonucleotídeo que apresentou precisão de 98% para identificação de CTCs por citometria de fluxo, apesar do pequeno número amostral, o que indica que esse oligonucleotídeo pode ser utilizado com marcador para biopsia líquida (Oliveira *et al.*, 2017). Portanto, a análise dos dados dessa pesquisa permitiu observar uma diferença significativa entre pacientes e controles nas porcentagens de células EpCAM⁺ A4⁺, o que indica que a combinação desses dois marcadores demonstra ser promissora na detecção de CTCs.

A prostatectomia radical foi, originalmente, desenvolvida como tratamento do câncer de próstata localizado, para garantir um controle local da doença e aumentar a sobrevida dos pacientes. Mas, atualmente, essa cirurgia, também, é realizada em pacientes com doença metastática, com *Escore de Gleason* comprovadamente alto, a fim de aumentar a sobrevida e eliminar o sítio primário de disseminação de células

tumorais, reduzindo assim o número de CTCs (Culp *et al.*, 2014; Costello, 2020). Além disso, alguns pacientes passam pela orquiectomia, uma cirurgia de retirada dos testículos, método eficaz de castração cirúrgica para tratamento de pacientes com CaP que visa diminuir a produção de testosterona (Singh *et al.*, 2021).

A recidiva bioquímica ocorre em pacientes após a realização da cirurgia de prostatectomia radical, sendo que 20 a 40% dos homens apresentam um aumento de PSA em algum momento após a cirurgia. Atualmente, as diretrizes da Associação Americana de Urologia e da Associação Europeia de Urologia definem que a recidiva bioquímica é caracterizada por valores de PSA $\geq 0,2$ ng/mL, confirmados em 2 exames após 6 semanas da cirurgia de prostatectomia radical.

A identificação da recidiva é importante para se atentar a falha na terapia e fazer o tratamento resgate o quanto antes, a fim de garantir uma qualidade de vida para o paciente (McCormick *et al.*, 2019). Um estudo de Pukl *et al.* (2023) indica que o *Escore de Gleason* é um forte indicador de recorrência bioquímica e a ploidia de DNA se correlaciona com a análise de sobrevida e, também, é um preditor de recidiva bioquímica, especialmente em pacientes com *Escore de Gleason 7*.

Os pacientes 1 e 3 que participaram do estudo foram submetidos a prostatectomia radical como forma de tratamento para reduzir o avanço da doença e o paciente 2 foi submetido a orquiectomia bilateral. Diante disso, é possível observar que, no caso do paciente 1 ocorreu um provável caso de recidiva bioquímica, visto que mesmo após a prostatectomia radical o PSA voltou a aumentar e evoluiu para um câncer metastático resistente a castração.

O crescimento de células da próstata depende de andrógenos e, a partir disso, a terapia de privação de androgênica (ADT) é o tratamento base para o CaP, a fim de bloquear a produção desses hormônios e, conseqüentemente, diminuir o desenvolvimento das células tumorais da próstata. Os pacientes com CaP metastático são tratados com castração química que envolve os ADT, como agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) de ação prolongada (histrelina, leuprorrelina e triptorelina) (Desai *et al.*, 2021).

Fisiologicamente, no hipotálamo ocorre a secreção de GnRh que ativa receptores de GnRH na hipófise anterior, o que leva a secreção de dois hormônios: o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH). Nos homens, o

LH atua nos testículos estimulando a produção de um hormônio androgênico testosterona, que estimula o desenvolvimento das células da próstata.

Diante disso, existe uma linha de fármacos conhecidos como agonistas do hormônio liberador do hormônio luteinizante (anLHRH), que bloqueiam a liberação de LH nos testículos. Dessa forma, diminuem a liberação de testosterona, a fim de impedir o crescimento das células tumorais da próstata, sendo o tipo de castração química de preferência como primeira opção para tratamento de câncer de próstata metastático (Desai *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021).

Portanto, a leuprorrelina é um fármaco que inibe a secreção de gonadotrofina e que diminui os níveis de LH, o que consequentemente diminui a produção de testosterona. Um estudo feito na Ásia demonstrou que a leuprorrelina é eficaz na redução dos níveis de PSA e testosterona em pacientes com CaP (Chung *et al.*, 2020).

Os pacientes com câncer de próstata metastático sensível a castração são, normalmente, tratados com docetaxel, abiraterona e enzalutamida. No entanto, o tratamento atual para mCSPC inclui docetaxel, abiraterona + prednisona ou os antagonistas do Receptor de Andrógeno (AR): bicalutamida ou Enzalutamida, que age inibindo a ligação da testosterona ao AR (Desai *et al.*, 2021).

O paciente 1 era tratado com abiraterona + prednisona, porém, evoluiu para um quadro de câncer de próstata metastático resistente a castração e, atualmente, está sendo tratado com leuprorrelina, apesar de não ter diminuição nos níveis de PSA, devido a recidiva bioquímica. O paciente 2 está sendo tratado com Bicalutamida, pois é considerado um paciente sensível a castração. Porém, devido ao nível elevado de PSA ele pode ter evoluído para um tipo de câncer metastático resistente a castração, o que indica a necessidade de uma nova avaliação do tratamento.

Além disso, o paciente 3 apresentou uma importante resposta da metástase óssea ao bloqueio androgênico com anLHRH e, possivelmente, isso contribuiu para redução dos níveis de PSA total. O paciente 4, apesar de ser considerado sensível a castração, é tratado com leuprorrelina e AnLHRH, apresentando uma boa resposta ao tratamento com bloqueio androgênico, visto que o nível de PSA total, também, se manteve baixo.

Ao analisar a porcentagem de células de pacientes EpCAM⁺ aneuplóides (80,025%) e A4⁺ aneuplóides (84,95%), observa-se que essa porcentagem foi muito semelhante, o que indica um bom resultado de ploidia e de identificação das CTCs

pelos marcadores EpCAM e A4. Embora as análises tenham sido feitas separadas, as células presentes no mesmo tubo foram marcadas com os dois marcadores e o iodeto de propídeo, o que implica ser a mesma população de células.

O ciclo celular normal é composto pelas fases de interfase e mitose e, nesse caso, durante a mitose ocorre a citocinese, ou seja, a divisão da parede celular do núcleo e durante a interfase ocorre a síntese de DNA. A interfase é composta por 3 fases, sendo fase G1, fase S, na qual inicia a replicação do DNA e fase G2, quando finaliza a replicação. Diante disso, o ciclo celular regula, a partir de vários pontos de verificação, o crescimento e a proliferação de células diploides (2n). Porém, quando a atividade das proteínas de verificação é interrompida ocorre a divisão celular de forma desregulada, com uma quantidade alterada de DNA, dando origem a células triploides ou aneuplóides, o que, conseqüentemente, gera a tumorigênese (Koladiya *et al.*, 2016).

A aneuploidia de DNA é um bom indicador diagnóstico de neoplasias e pode sinalizar um prognóstico ruim em vários tipos de tumores, inclusive em câncer de próstata (Danielsen *et al.*, 2016). A aneuploidia, também, está correlacionada com a diminuição da sobrevida dos pacientes, visto que está ligada a um fenótipo mais agressivo da doença e está associada a um potencial de proliferação celular aumentado (Wang *et al.*, 2004; Lennartz *et al.*, 2016; Stopsack *et al.*, 2019).

Além disso, a aneuploidia está relacionada com as características clínicas desfavoráveis do câncer, como alto valor de Escore de Gleason, estágio tumoral avançado e recorrência de PSA (Lennartz *et al.*, 2016). Os tumores com valor baixo de *Escore de Gleason* raramente desenvolvem metástase e um estudo indicou que 58% dos tumores com *Escore de Gleason* 6 possuem aneuploidia (Stopsack *et al.*, 2019). Dessa forma, todos os 4 pacientes participantes da pesquisa possuem *Escore de Gleason* maior que 7, o que justifica a presença de uma alta porcentagem de CTCs aneuplóides quando comparado com os controles.

Além disso, observa-se que os voluntários do grupo controle possuem 9,065% das CTCs EpCAM⁺ A4⁺; 15,765% das células EpCAM⁺ apresentando ploidia e 14,79% das células A4⁺ apresentando ploidia. As CTCs são células raras no sangue de pessoas saudáveis, mas em alguns casos pode existir uma quantidade dessas células não hematológicas circulantes na corrente sanguínea de pessoas sem o diagnóstico de câncer. Um estudo feito por Castro *et al* (2018) analisou amostras de 3388 pessoas

sem diagnóstico de câncer e encontrou células não hematológicas circulantes no sangue de 107 (3,2%) dos voluntários da pesquisa.

Um outro estudo realizado por Ilie *et al* (2014) mostrou que a presença de CTCs pode estar associada a um risco de desenvolver a doença, tendo em vista que avaliaram pacientes sem câncer com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e encontraram CTCs em 3% desses pacientes que, posteriormente, desenvolveram câncer de pulmão, o que indica que as CTCs podem ser detectadas mesmo em fases iniciais do tumor.

Porém, como a presença de CTCs pode estar associada ao risco de desenvolver a doença, não é confirmado que realmente vai contribuir para o surgimento do câncer, pois o desenvolvimento dessa doença envolve diversos fatores, como mutações e outras alterações genéticas. Portanto, isso indica que apesar do grupo controle possuir um porcentagem de CTCs não é indicativo de desenvolvimento do câncer.

7. CONCLUSÃO

A metodologia aplicada nesse estudo, utilizando a combinação de dois marcadores se mostrou promissora para identificação e detecção de células tumorais circulantes por biópsia líquida. Além disso, foi possível identificar uma porcentagem significativa de células apresentando aneuploidia marcadas com EpCAM e Aptâmero A4, ou seja, os resultados indicaram uma porcentagem maior de alterações cromossômicas em células de pacientes quando comparado com controles. Portanto, isso mostra que as alterações na ploidia podem ser utilizadas como um biomarcador prognóstico de câncer de próstata. Porém, o estudo teve algumas limitações como o pequeno número de pacientes e não foi possível atingir o objetivo de avaliar amostras de pacientes em diferentes estádios da doença, visto que as amostras liberadas para coleta foram de pacientes com câncer de próstata metastático. Por isso, as perspectivas futuras envolvem um aumento do número amostral e a coleta de amostras de pacientes em diversos estádios do CaP.

8. REFERÊNCIAS

ARMAKOLAS, Athanasios; KOTSARI, Maria; KOSKINAS, John. Liquid Biopsies, Novel Approaches and Future Directions. **Cancers**, v. 15, n. 5, p. 1579, 2023.

BAI, W. *et al.* The correlation between the Gleason score of the biopsy and that of the prostatectomy patch. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 63, p. 102169, 2021.

BLACKWELDER, Russ; CHESSMAN, Alexandre. Prostate cancer screening: shared decision-making for screening and treatment. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 46, n. 1, p. 149-155, 2019.

BUYOUNOUSKI, Mark 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**, [s.l.], v. 67, n. 3, p. 245-253, 2017.

CAI, Maoping *et al.* Current therapy and drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. **Drug Resistance Updates**, p. 100962, 2023.

CAMPOS-FERNÁNDEZ, E., Barcelos, LS, de Souza, AG, Goulart, LR, & Alonso-Goulart, V. Research landscape of liquid biopsies in prostate cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 1309, 2019.

CAMPOS-FERNANDEZ, E., Barcelos, LS, Souza, AG, Goulart, LR, & Alonso-Goulart, V. (2020). 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.; Alqualo, NO; Garcia, LCM; Alves, CCH; Vieira, TDFA; Moreira, DC, & Alonso-Goulart, V. The use of aptamers in prostate cancer: A systematic review of theranostic applications. **Clinical Biochemistry**, v. 93, p. 9-25, 2021.

CASTRO J., Sanches L., Nunes MT, Lu M, Castro T., Sharifi RH, Ericsson C.: Screening circulating tumor cells as a noninvasive cancer test in 3388 individuals from high-risk groups (ICELLATE2). **Dis Markers**, 2018.

CHEN, Ming; ZHAO, Hongyu. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. **Human genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2019.

CHUNG, Byung Ha; HORIE, Shigeo; CHIONG, Edmund. Clinical studies investigating the use of leuprorelin for prostate cancer in Asia. **Prostate International**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2020.

COSTELLO, Anthony J. Considering the role of radical prostatectomy in 21st century prostate cancer care. **Nature Reviews Urology**, v. 17, n. 3, p. 177-188, 2020.

CROCETTO, Felice *et al.* Liquid biopsy in prostate cancer management—Current challenges and future perspectives. **Cancers**, v. 14, n. 13, p. 3272, 2022.

CULP, Stephen H.; SCHELLHAMMER, Paul F.; WILLIAMS, Michael B. Might men diagnosed with metastatic prostate cancer benefit from definitive treatment of the primary tumor? A SEER-based study. **European urology**, v. 65, n. 6, p. 1058-1066, 2014.

DANIELSEN, Håvard E.; PRADHAN, Manohar; NOVELLI, Marco. Revisiting tumour aneuploidy—the place of ploidy assessment in the molecular era. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 5, p. 291-304, 2016.

DE OLIVEIRA-JÚNIOR, R. J.; Ueira-Vieira, C.; Sena, A. A. S.; Reis, C. F.; Mineo, J. R.; Goulart, Luiz R; Morelli, S. Chromosomal disruption and rearrangements during murine sarcoma development converge to stable karyotypic formation kept by telomerase overexpression. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p. 1-14, 2016.

DHAR, Manjima *et al.* Functional profiling of circulating tumor cells with an integrated vortex capture and single-cell protease activity assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 40, p. 9986-9991, 2018.

DESAI, Kunal; MCMANUS, Jeffrey M.; SHARIFI, Nima. Hormonal therapy for prostate cancer. **Endocrine reviews**, v. 42, n. 3, p. 354-373, 2021.

ESLAMI-S, Zahra; CORTÉS-HERNÁNDEZ, Luis Enrique; ALIX-PANABIÈRES, Catherine. The metastatic cascade as the basis for liquid biopsy development. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 1055, 2020.

FENTON, Joshua J. *et al.* Prostate-specific antigen–based screening for prostate cancer: evidence report and systematic review for the US Preventive Services Task Force. **Jama**, v. 319, n. 18, p. 1914-1931, 2018.

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.

ILIE M, Hofman V, Long-Mira E, *et al.* “Sentinel” circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **PLoS One**. 2014.

IMODOYE, Sikiru O. *et al.* Understanding the complex milieu of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: new insight into the roles of transcription factors. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 762817, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 02 out. 2023.

ITTMANN, Michael. Anatomy and histology of the human and murine prostate. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 5, 2018.

KILDAL, Wanja; Pradhan, Manohar; Cyll, Karolina; Jacobsen, Jørn E.; Kristensen, Gunnar B.; Danielsen, Håvard E. Properties of cancer cell DNA affects the prognosis. **Journal of the Norwegian Medical Association: Journal of Practical Medicine, new series**, v. 137, n. 19, 2017.

KOJIMA, Shihoko; CIMINI, Daniela. Aneuploidy and gene expression: is there dosage compensation?. **Epigenomics**, v. 11, n. 16, p. 1827-1837, 2019.

KOLADIYA, Abhishek *et al.* Flow cytometric analysis of bladder carcinoma. **Master thesis - Vytautas Magnus University**, Molecular Biology and Biotechnology Study program Biological Sciences (Biology), Kaunas, 2016.

LENNARTZ, Maximilian *et al.* The combination of DNA ploidy status and PTEN/6q15 deletions provides strong and independent prognostic information in prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 11, p. 2802-2811, 2016.

LONE, Saife N. *et al.* Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1-22, 2022.

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.

MERRIEL, Samuel WD; FUNSTON, Garth; HAMILTON, Willie. Prostate cancer in primary care. **Advances in therapy**, v. 35, p. 1285-1294, 2018.

MICHELA, Battistelli. Liquid Biopsy: A Family of Possible Diagnostic Tools. **Diagnostics (Basel)**, v. 11, n. 8, p. 1391, 2021.

MILLER, Kurt *et al.* The phase 3 COU-AA-302 study of abiraterone acetate plus prednisone in men with chemotherapy-naïve metastatic castration-resistant prostate cancer: stratified analysis based on pain, prostate-specific antigen, and Gleason score. **European urology**, v. 74, n. 1, p. 17-23, 2018.

OLIVEIRA, L. A. d. *et al.* Implicações translacionais de uma nova ferramenta de detecção de célula: tumorais circulantes no monitoramento do câncer de próstata. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia**, Pós-graduação em Ciências da Saúde, Uberlândia, 2017.

PUKL, Miha *et al.* DNA Ploidy as a Potential Adjunct Prognostic Marker of Low-Risk Prostate Cancer Progression after Radical Prostatectomy. **Urology Journal**, v. 20, 2023.

PEREIRA, Juliana. Conjugação de controle isotópico para citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 342-343, 2007.

REBELLO, Richard J. *et al.* Prostate cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 0-0, 4 fev. 2021.

REIS, Matheus *et al.* 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 (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia**, Pós-graduação em Ciências da Saúde, Uberlândia, 2019.

RUSHTON, Amelia J. *et al.* A review of circulating tumour cell enrichment technologies. **Cancers**, v. 13, n. 5, p. 970, 2021.

SAINI, Sharanjot. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular Oncology**, v. 39, n. 2, p. 97-106, 2016.

SAUER, Ann Katrin *et al.* Zinc deficiency in men over 50 and its implications in prostate disorders. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 553161, 2020.

SCHEEL, Christina; WEINBERG, Robert A. Cancer stem cells and epithelial mesenchymal transition: concepts and molecular links. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2012. p. 396-403.

SIEGEL RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 70 :7-30, 2020.

SIERRA, Jéssica *et al.* Sensor-Integrated Microfluidic Approaches for Liquid Biopsies Applications in Early Detection of Cancer. **Sensors**, v. 20, no. 5, p. 1317, 2020.

SINGH, Onkar *et al.* Satisfaction and genital perception after orchiectomy for prostate cancer: does the technique matter? A randomized trial. **International Urology and Nephrology**, v. 53, p. 1583-1589, 2021.

SOUZA A. G.; Marangoni, K.; Fujimura, P.; Alves, P. T.; Goulart, Luiz R.; Alonso-Goulart, V. 3D CellSELEX: development of RNA aptamers as molecular probes for PC-3 tumor cell line. **Experimental Cell Research**, v. 341, n. 2, p. 147–156, 2016.

STOPSACK, Konrad H. *et al.* Aneuploidy drives lethal progression in prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 23, p. 11390-11395, 2019.

WANG, Sa *et al.* Flow cytometric DNA ploidy analysis of peripheral blood from patients with sezary syndrome: detection of aneuploid neoplastic T cells in the blood is associated with large cell transformation in tissue. *American journal of clinical pathology*, v. 122, n. 5, p. 774-782, 2004.

YANG, Jing *et al.* Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 6, p. 341-352, 2020.

ZANG, Shiming *et al.* Development and validation of ⁶⁸Ga-PSMA-11 PET/CT-based radiomics model to detect primary prostate cancer. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (EJNMMI) Research**, v. 12, no. 1, p. 1-8, 2022.