

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/07/2020.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Luciana Sanches Silva

**Pesquisa de células tumorais circulantes
em pacientes com câncer de próstata
por método de filtração celular**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em
Pesquisa Clínica.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Polachini do Valle

**Botucatu
2018**

Luciana Sanches Silva

**Pesquisa de células tumorais circulantes em
pacientes com câncer de próstata por
método de filtração celular**

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu,
para obtenção do título de
Mestra em Pesquisa Clínica**

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Polachini do Valle

**Botucatu
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Silva, Luciana Sanches.

Pesquisa de células tumorais circulantes em pacientes com câncer de próstata por método de filtração celular / Luciana Sanches Silva. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Adriana Polachini do Valle

Capes: 40000001

1. Biopsia. 2. Próstata. 3. Células cancerosas.

Palavras-chave: Biopsia líquida; Carcinoma de próstata; Células tumorais circulantes; ScreenCell.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus, por permitir que eu vivesse essa oportunidade na minha profissão. Minha família que sempre me apoiou amigos queridos sempre ao meu lado com palavras positivas, no meu trabalho, profissionais que ajudaram no projeto, para que ele acontecesse. Gratidão e muita admiração a minha orientadora que mostrou que somos capazes de superar nossas dificuldades, e que precisamos seguir em frente e acreditar na nossa capacidade com humildade, para sempre fazer o bem ao maior número de pessoas.

Em agradecimento aos profissionais, que contribuíram para realização deste trabalho. Maria Aparecida M. Rodrigues Professora titular de patologia da FMB, realizou a leitura das lâminas.

Ludmila T Dominguea Chinen Pesquisadora do Centro de pesquisa internacional do Hospital A. C. Camargo, expert em células tumorais circulantes identificou as lâminas.

Marcos Roberto Franchi, responsável técnico do laboratório de imunocitoquímica realizou o procedimento técnico e coloração das lâminas.

Dr. Fernando Ferreira Gomes Filho urologista, orientou na triagem dos pacientes na coleta ambulatorial.

Sumário

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	6
<u>LISTA DE TABELAS</u>	7
<u>RESUMO</u>	8
<u>ABSTRACT</u>	9
<u>INTRODUÇÃO</u>	10
<u>OBJETIVO</u>	14
<u>METODOLOGIA</u>	14
<u>Avaliação laboratorial</u>	14
<u>Metodologia de filtração celular pelo teste ScreenCell®</u>	15
<u>Coloração Imunohistoquímica</u>	16
<u>Microscopia</u>	18
<u>ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	19
<u>RESULTADOS</u>	20
<u>Deteção de Células Tumorais Circulantes</u>	20
<u>DISCUSSÃO</u>	24
<u>CONCLUSÃO</u>	27
<u>REFERÊNCIAS</u>	27
<u>PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</u>	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Procedimento do Kit <i>ScreenCell</i> ®	14
Figura 2 - Placa para acondicionar e corar as membranas	15
Figura 3 - Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo	20
Figura 4 - Fluxograma da detecção de Células tumorais circulantes.....	20
Figura 5e 6 - Células tumorais circulantes de pacientes.....	22
Figura 7 e 8 - Células tumorais circulantes de pacientes.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Características dos pacientes e resultados da detecção de CTCS.....21

RESUMO

Introdução: O câncer de próstata (CP) é o mais incidente entre os homens em todas as regiões do Brasil. A detecção e caracterização de células tumorais circulantes (CTCs) tem sido apontada como uma alternativa para melhor compreensão da biologia dos tumores, incluindo câncer de próstata.

Objetivo: Este estudo tem como objetivo avaliar a detecção de CTCs em pacientes com tumor de próstata localizado e metastático por teste rápido de filtração celular.

Metodologia: Foram incluídos pacientes com diagnóstico anatomopatológico de câncer de próstata ou neoplasia intraepitelial prostática. Os dados demográficos, laudos anatomopatológicos e de Cintilografia Óssea e valores do antígeno prostático específico (PSA) foram obtidos pelo estudo dos prontuários médicos dos pacientes.

Os pacientes foram classificados como portadores de tumor metastático quando apresentavam evidência de imagem metastática pela Cintilografia Óssea.

As CTCs foram isoladas por teste rápido de filtração celular com posterior imunocitoquímica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-PSA para caracterização câncer de próstata específica das células.

Resultados: As CTCs foram detectadas em 9 dos 21 pacientes (43%) com positividade de 60% no grupo metastático e 36% no grupo de tumor localizado. Não foram observadas associações entre os valores de PSA e tratamento instituído com a detecção de CTCs.

Discussão: A positividade das CTCs no presente estudo mostrou-se semelhante aos dados da literatura, embora possam ser citadas algumas limitações do estudo tais como pequeno número de pacientes incluídos, dificuldades encontradas pelos pesquisadores em realizar a imunocitoquímica sem danificar a membrana de filtração, além do uso de um único marcador próstata específico.

Conclusão: Concluímos que as CTCs parecem ser uma ferramenta promissora com potencial para auxiliar a prática clínica.

Palavras-chave: Biopsia Líquida; Carcinoma de Próstata; Células Tumorais Circulantes; *ScreenCell*

ABSTRACT

Introduction: Prostate cancer (PC) is the most frequent among men in all regions of Brazil. The detection and characterization of circulating tumor cells (CTCs) has been pointed out as an alternative for a better understanding of the biology of tumors, including prostate cancer.

Objective: This study aims to evaluate the detection of CTCs in patients with localized and metastatic prostate tumor by rapid cell filtration test.

Methodology: Patients with anatomopathological diagnosis of prostate cancer or prostatic intraepithelial neoplasia were included. Demographic data, anatomopathological and bone scintigraphy reports and prostate specific antigen (PSA) values were obtained by the study of patients' medical records. Patients were classified as having metastatic tumor when they presented evidence of metastatic image by Bone Scintigraphy.

The CTCs were isolated by rapid cell filtration test with subsequent immunocytochemistry using anti-PSA monoclonal antibodies for cell-specific prostate cancer characterization.

Results: CTCs were detected in 9 of the 21 patients (43%) with 60% positivity in the metastatic group and 36% in the localized tumor group. No associations were observed between PSA values and treatment established with CTCs detection.

Discussion: The positivity of the CTCs in the present study was similar to the data in the literature, although some limitations of the study may be cited, such as a small number of patients included, difficulties encountered by researchers in performing immunocytochemistry without damaging the filtration membrane, besides of the use of a single prostate specific marker. **Conclusion:** We conclude that CTCs appear to be a promising tool with the potential to aid clinical practice.

Keywords: Carcinoma of Prostate; Circulating Tumor Cells; Liquid Biopsy; ScreenCell

CONCLUSÃO

A detecção de células tumorais circulantes do carcinoma de próstata pode ser usada como uma biópsia líquida na tentativa de compreender o retrato biológico da doença, possibilitar análise molecular em cada indivíduo além de auxiliar no acompanhamento da resposta terapêutica.

Este estudo buscou testar uma metodologia reprodutível e de fácil manuseio para quantificação de CTCs em amostras de pacientes com câncer de próstata.

Pelo método de filtração celular *ScreenCell* e imunocitoquímica foram detectadas células tumorais em 60% dos pacientes com tumor metastático e 36% com tumor localizado e um entre os dois pacientes com neoplasia intra-epitelial prostática.

O teste apresentou desempenho semelhante aos equipamentos de automação existentes no mercado, porém houve limitações neste estudo tanto no manuseio do teste como na marcação câncer específica, mas ainda assim mostrou-se viável, menos onerosa e pouco invasiva para acompanhamento de pacientes com a doença.

No entanto, devido à escassez de CTCs nas amostras clínicas, os testes apresentam limitações e grandes desafios analíticos.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Cancer - Inca. Estimativa de Cancer no Brasil - 2018. (2018).
2. Mettlin, C. et al. The results of a five-year early prostate cancer detection intervention. Investigators of the American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project. *Cancer* 77, 150–159 (1996).
3. Moyer, V. A. & U.S. Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann. Intern. Med.* 157, 120–134 (2012).
4. Ilic, D., Neuberger, M. M., Djulbegovic, M. & Dahm, P. Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004720 (2013). doi:10.1002/14651858.CD004720.pub3
5. Lianidou, E. S., Strati, A. & Markou, A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 51, 160–171 (2014).
6. Kang, Y. & Pantel, K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell* 23, 573–581 (2013).
7. Joosse, S. A., Gorges, T. M. & Pantel, K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol. Med.* 7, 1–11 (2015).
8. Racila, E. et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4589–4594 (1998).

9. Marrinucci, D. et al. Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Phys. Biol.* 9, 016003 (2012).
10. Mitchell, M. J. & King, M. R. Computational and experimental models of cancer cell response to fluid shear stress. *Front. Oncol.* 3, 44 (2013).
11. Steinert, G. et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res.* 74, 1694–1704 (2014).
12. Alix-Panabières, C., Schwarzenbach, H. & Pantel, K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu. Rev. Med.* 63, 199–215 (2012).
13. Marrinucci, D. et al. Circulating tumor cells from well-differentiated lung adenocarcinoma retain cytomorphologic features of primary tumor type. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 133, 1468–1471 (2009).
14. Suh, Y. S. et al. Establishment and Application of Prostate Cancer Circulating Tumor Cells in the Era of Precision Medicine. *BioMed Res. Int.* 2017, 7206307 (2017).
15. Viswanath, B. & Kim, S. Recent insights into the development of nanotechnology to detect circulating tumor cells. *TrAC Trends Anal. Chem.* 82, 191–198 (2016).
16. Nagrath, S. et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 450, 1235–1239 (2007).
17. Lianidou, E. S. & Markou, A. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin. Chem.* 57, 1242–1255 (2011).

18. Cima, I. et al. Tumor-derived circulating endothelial cell clusters in colorectal cancer. *Sci. Transl. Med.* 8, 345ra89 (2016).
19. Markou, A. et al. Direct Comparison of Metastasis-Related miRNAs Expression Levels in Circulating Tumor Cells, Corresponding Plasma, and Primary Tumors of Breast Cancer Patients. *Clin.Chem.* 62, 1002–1011 (2016).
20. Mikolajczyk, S. D. et al. Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *J. Oncol.* 2011, 252361 (2011).
21. Camara, O. et al. Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: the fate of malignant and benign mobilized cells. *World J. Surg. Oncol.* 4, 67 (2006).
22. Awe, J. A., Saranchuk, J., Drachenberg, D. & Mai, S. Filtration-based enrichment of circulating tumor cells from all prostate cancer risk groups. *Urol. Oncol.* 35, 300–309 (2017).
23. Desitter, I. et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res.* 31, 427–441 (2011).
24. Danila, D. C. et al. Circulating Tumor Cell Number and Prognosis in Progressive Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin.Cancer Res.* 13, 7053–7058 (2007).
25. de Bono, J. S. et al. Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin.Cancer Res.* 14, 6302–6309 (2008).

26. Goodman, O. B. et al. Circulating tumor cells in patients with castration-resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 18, 1904–1913 (2009).
27. Wanner M, Richard A, Matthes K, Ortelli L, Lorez M, Korol D, Bordoni A, Rohrman S. Trends in prostate cancer incidence between 1996 and 2013 in two Swiss regions by age, grade, and T-stage. *Cancer Causes Control.* 2017 Dec 4.
28. Kolostova K, Broul M, Schraml J, Cegan M, Matkowski R, Fiutowski M, Bobek V. Circulating tumor cells in localized prostate cancer: isolation, cultivation in vitro and relationship to T-stage and Gleason score. *Anticancer Res.* 2014 Jul;34(7):3641-6
29. Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(23):7053–7058
- 30- Thalgott M, Rack B, Maurer T, Souvatzoglou M, Eiber M, Kreß V, Heck MM, et al. Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer. *J Cancer Res ClinOncol.* 2013 ;139(5):755-63.
- 31- Kuske A, Gorges TM, Tennstedt P, Tiebel AK, Pompe R, Preiber F, Prues S, Mazel M et al. Improved detection of circulating tumor cells in non-metastatic high-risk prostate cancer patients. *Sci. Rep.* 2016; 6, 39736.
32. Sasaki T, Ishii K, Iwamoto Y, Kato M, Miki M, Kanda H, Arima K, Shiraishi T, Sugimura Y. Fibroblasts prolong serum prostate-specific antigen decline after androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Lab Invest.* 2016

Mar;96(3):338-49.

33. Qin J, Liu X, Laffin B, Chen X, Choy G, Jeter CR, Calhoun-Davis T, Li H, Palapattu GS, Pang S, Lin K, Huang J, Ivanov I, Li W, Suraneni MV, Tang DG. The PSA(-/lo) prostate cancer cell population harbors self-renewing long-term tumor-propagating cells that resist castration. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):556-69.

34- Goldkorn A, Ely B, Quinn D I, Tangen CM, Fink LM, Xu T, Peter PT, et al. Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: A phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2014;32(11):1136–1142.