



**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

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CP) é o mais incidente entre os homens em todas as regiões do Brasil¹. As principais medidas recomendadas para diminuir a morbidade e mortalidade associada ao CP são o rastreamento através da dosagem do antígeno prostático específico (PSA) associado ao toque retal e o diagnóstico precoce da neoplasia.

O nível de PSA elevado e o exame de toque retal anormal têm sido utilizados para indicar uma biópsia da próstata. No entanto, patologias não malignas como a hiperplasia benigna da próstata ou prostatite, podem aumentar o nível de PSA sendo que até 70% das biópsias são negativas para o câncer, e, portanto, potencialmente desnecessárias, causando ansiedade, testes clínicos caros e acompanhamento prolongado².

Evidências científicas e de boa qualidade^{3,4} indicam que o rastreamento câncer de próstata produz mais dano do que benefício.

No Brasil o Instituto Nacional de Câncer¹ recomenda que não se organizem programas de rastreamento para o câncer da próstata.

Existe um senso comum sobre a necessidade de mais estudos científicos para aprimorar a seleção dos candidatos ao rastreamento, bem como ferramentas mais precisas e menos invasivas para monitorar os estágios avançados desta neoplasia.

A presença de células tumorais circulantes (CTC) no sangue periférico é uma alternativa para melhor compreensão da biologia dos tumores, incluindo câncer de próstata⁵.

Embora a taxa de circulação de células tumorais em pacientes com tumores sólidos seja desconhecida, os modelos experimentais indicam que milhões de células tumorais estão continuamente dispersas através do corpo, embora apenas algumas dessas células possam atingir um órgão distante, sobreviver em estado latente, evadir o sistema imunológico e eventualmente se tornarem uma metástase⁶.

A motilidade das células tumorais pode ser adquirida por diferentes

processos dos quais a transição epitelial para mesenquima (EMT) e a amplificação dos centrosomas são atualmente consideradas as principais. EMT leva à perda (parcial) das características epiteliais das células cancerosas resultando em maior capacidade de migração, invasão e resistência a apoptose enquanto que a disseminação associada à amplificação do centrosoma pode reter a expressão de marcadores epiteliais. Devido a estes diferentes processos de disseminação, ainda não estão totalmente estabelecidas quais são as características verdadeiras das células iniciadoras de metástase e se essas células podem ser encontradas entre as CTCs que atualmente estão sendo detectadas no sangue de pacientes com câncer⁷.

Existem vários tipos de CTCs. As típicas foram identificadas utilizando-se teste de viabilidade, verificando-se a localização citoplasmática membranar de citoqueratinas e ausência de CD45, o que implica origens epiteliais e não hematopoiéticas, respectivamente⁸.

As CTCs são células maiores que as células hematopoiéticas com morfologia irregular. As CTCs de citoqueratina negativa (CK-) ou células-tronco de câncer sofrem transição epitelial-mesenquimatosa (EMT) e são consideradas como tendo perfil genômico ou expressão gênica específica para câncer e morfologia semelhantes a uma célula cancerosa e são propensas a resistência e metástase⁹.

Uma vez na corrente sanguínea as CTCs enfrentam vários obstáculos naturais que dificultam o processo metastático, tais como o stress físico da circulação e a resposta imune^{10,11}.

Assim sendo CTCs são raras e aparecem em um número estimado de 1 a cada 10^6 - 10^9 células sanguíneas circulantes¹².

A biópsia líquida usando CTC vem ganhando atenção como uma ferramenta minimamente invasiva na investigação, prognóstico e avaliação de resposta a terapias em pacientes com câncer de próstata. Devido à menor invasividade, ela pode ser realizada com mais frequência possibilitando monitoramento da evolução da doença de forma personalizada¹³.

Apesar das vantagens relacionadas à detecção de CTCs, algumas desvantagens tais como problemas técnicos, clínicos e biológicos devem ser

analisadas antes de adotá-la na prática clínica. Como o tumor é caracteristicamente heterogêneo, revelar a origem das CTCs é o mais importante para entender sua utilidade clínica¹⁴.

Uma vez que as CTCs são extremamente raras no sangue, a sensibilidade e a especificidade do teste não são suficientes para uma detecção precisa. Apesar da presença de vários métodos para a detecção de CTC, nenhum deles está estabelecido para ser clinicamente aplicável devido ao espectro de detecção restrito, baixa pureza e perda de CTCs¹⁵.

Além disso, os métodos para detecção de CTC geralmente são acompanhados por processos de difícil realização e custos significativos.

A análise de CTC inclui o isolamento e o enriquecimento, a detecção, a enumeração e pode incluir a caracterização molecular¹⁶.

Para o isolamento e enriquecimento das CTCs são utilizados dispositivos de filtração, considerando as características físicas como tamanho, carga elétrica e densidade¹⁷.

Um dos testes laboratoriais existentes no mercado para detecção e contagem de CTCs é o sistema *CellSearch*® (Veridex, Raritan, NJ, EUA). Este sistema foi aprovado pela *Food and Drug Administration (FDA)* para monitorar pacientes com CP metastático. Atualmente, este é o único teste para detectar CTCs que recebeu aprovação do *FDA*.

O sangue periférico é coletado em tubo EDTA, com volume de 7,5 mLs, centrifugado e enriquecido imunomagneticamente com nanopartículas magnéticas e ferrofluídicas. As CTCs de origem epitelial podem ser detectadas por coloração nuclear e um conjugado de anticorpo fluorescente contra o antígeno *EpCAM* (*EpCAM* +); CD45- (para excluir células hematopoiéticas); e Anticorpos anticitoqueratinas 8, 18+, e / ou 19+ (citoqueratinas específicas das células epiteliais)^{18, 19}.

O ensaio enumera apenas as células que expressam a molécula de adesão de células epiteliais (*EpCAM*) e citoqueratinas (CK) 8, 18 e/ou 19. Se cinco ou mais CTCs forem encontradas, o resultado será considerado positivo. Este teste tem um limite de detecção de 1 CTC / 7,5 mL de sangue total com 93% de

capacidade de recuperação.

Embora seja o único método aprovado pelo *FDA*, existem várias limitações. Equipamentos específicos - o *CellTracksAutoPrep* e a unidade *CellTracksAnalyzer II* (Veridex LLC, Raritan, NJ, *EUA*) - são necessários para realizar o teste. O uso de anticorpos que podem reconhecer o marcador tumoral pode apresentar algum viés devido a necessidade de expressão suficiente de proteína na superfície celular. Alguns tumores não expressam *EpCAM* e *CKs*, devido *downregulated* (número de receptores ou afinidade desses receptores está diminuída) durante a transição epitelial-mesenquimatoso²⁰.

Além disso, as células *EpCAM* + podem ser detectadas no sangue periférico quando ocorrem doenças inflamatórias ou queimaduras na pele. Assim, o diagnóstico de câncer por células *EpCAM* + não é apropriado²¹.

Métodos baseados em filtragem considerando o tamanho da célula também têm sido utilizados para capturar CTCs no sangue periférico²².

O método *ScreenCell* captura CTCs a partir de dispositivos de uso único e de baixo custo que usam um filtro para isolar as células tumorais por tamanho. Para a identificação câncer específica pode-se utilizar imunocitoquímica diretamente no filtro. O dispositivo *ScreenCell*® permite também o isolamento de células vivas capazes de crescer em cultura²³.

Vários estudos avaliaram CTCs em pacientes com câncer de próstata e o método mais utilizado foi o *CellSearch* com marcadores CD45- e CK+ e *EpCAM* + e foram incluídos na maioria destes estudos pacientes com câncer de próstata resistente a castração^{24,25, 26}.

Diante das evidências da literatura levantamos a hipótese que investigar o desempenho de método de detecção de CTCs com menor custo pode facilitar sua introdução na prática clínica e contribuir para esclarecer sua utilidade.

OBJETIVO

Avaliar a detecção de células tumorais circulantes do carcinoma de próstata em pacientes com carcinoma de próstata localizado e metastático por teste rápido de filtração celular.

METODOLOGIA

Este estudo prospectivo longitudinal foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição pelo parecer nº 1.950.098/2017.

Os sujeitos convidados a participar do estudo foram pacientes com diagnóstico anatomopatológico de câncer de próstata ou neoplasia intraepitelial prostática que foram recrutados nos Ambulatórios de Urologia, Quimioterapia e Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Todos os pacientes concordaram em participar neste estudo após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

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.

Avaliação laboratorial

A pesquisa de células tumorais circulantes no sangue periférico dos pacientes com câncer de próstata foi realizada no máximo 4 horas após a coleta de 4mls de sangue, em tubo contendo EDTA K2, com homogeneização da amostra de acordo com as recomendações do fabricante do Kit de filtração celular *ScrennCell*®.

A amostra biológica foi mantida entre 2 e 8°C quando a análise não foi realizada imediatamente após a coleta, respeitando-se o intervalo de 4 horas.

O sangue periférico foi submetido a um processo de filtração celular pelo Kit denominado *ScrennCell*® que isola as células devido filtração do sangue de

acordo com o tamanho celular, através de uma membrana com microporos (8 micrômetros). As células tumorais são maiores e retidas na membrana.

Metodologia de filtração celular pelo teste *ScreenCell*®

Após a coleta e homogeneização da amostra, 3mLs de sangue foram transferidos para tubo plástico com tampa de rosca de 15ml e adicionado 4mLs do tampão. O tubo plástico foi fechado e homogeneizado por inversão 5 (cinco) vezes e incubado por 8 (oito) minutos em temperatura ambiente na bancada. O pH do tampão foi ajustado para atingir valores entre 6,7 e 7.

De acordo com a figura 1, após ação do tampão, 7mLs do sangue diluído foi transferido para tubo próprio do Kit *ScreenCell* (letra a na figura 1).

Em seguida o lacre amarelo do tubo foi removido, conforme ilustrado na figura abaixo, e foi inserido um tubo à vácuo com EDTA que permite a passagem do sangue diluído pelo filtro. Quando o sangue filtrado atinge a porção final do tubo indicado com a letra c na figura 1, foi introduzido 1,6 mLs de tampão PBS. Ao final da filtração, foi retirado o módulo c e descartado o suporte azul com o tubo à vácuo. A membrana foi ejetada em papel de filtro limpo e seco sendo o módulo e descartado. Aguardou-se 15 minutos em temperatura ambiente para secagem da membrana de filtração.

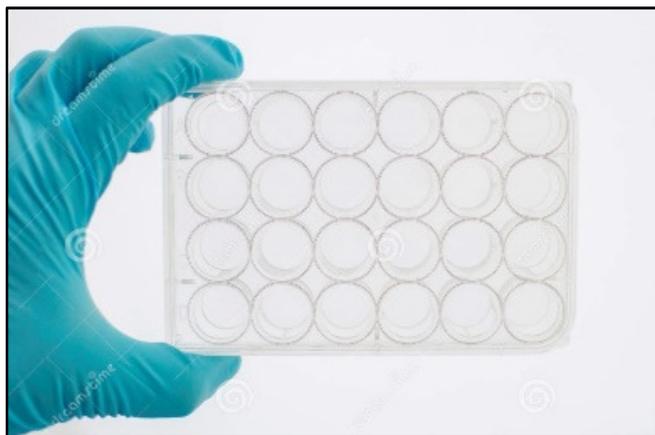


Figura 2 - Placa para acondicionar e corar as membranas no processo da imunocitoquímica

As membranas de filtração foram acondicionadas na placa e foi adicionado 2 a 3 gotas de peroxidase ate que toda a membrana estivesse coberta. Aguardou-se 5 minutos e foi feita a lavagem com solução salina tamponada e posterior aspiração do conteúdo. Foi introduzido 2 a 3 gotas do anticorpo primário (PSA) ate cobrir toda a membrana e aguardou-se 1 hora sendo então realizada a lavagem com solução salina tamponada e posterior aspiração do conteúdo.

O anticorpo secundário foi acrescentado com 4 a 5 gotas ate cobrir a membrana e aguardado 20 minutos para lavagem e aspiração

Foi introduzido o substrato com 4 a 5 gotas recobrimdo a membrana e aguardou-se 5 minutos. A lavagem foi feito com água destilada por 2 vezes e o conteúdo foi aspirado. A ultima etapa foi a introdução de 5 gotas do corante hematoxilina recobrimdo a membrana e posterior lavagem com água destilada e aspiração.

A secagem foi realizada em estufa a 37⁰ C por 3 horas.

Foi então acrescentado 1 gota de resina e uma lamínula (fornecida pelo Kit) e aguardou-se por 2 dias a secagem em temperatura ambiente.

Microscopia

A leitura microscópica para identificação e contagem das células tumorais circulantes foi realizada em microscópio comum no aumento de 100 vezes por um médico patologista, um médico patologista clínico e conferido por pesquisador expert em células tumorais circulantes. Todas as lâminas foram avaliadas de forma cega, ou seja, sem o conhecimento do estadiamento da doença. Todas as células tumorais circulantes encontradas foram fotografadas.

As características celulares avaliadas foram a presença de irregularidade do contorno nuclear, alta relação nuclear/citoplasmática, nucléolos proeminentes, e citoplasma corado pela imunocitoquímica com anti-PSA.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As correlações entre a contagem de células tumorais circulantes e os valores de PSA e tratamento instituído foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

O fluxograma dos pacientes incluídos no estudo encontra-se na figura 3

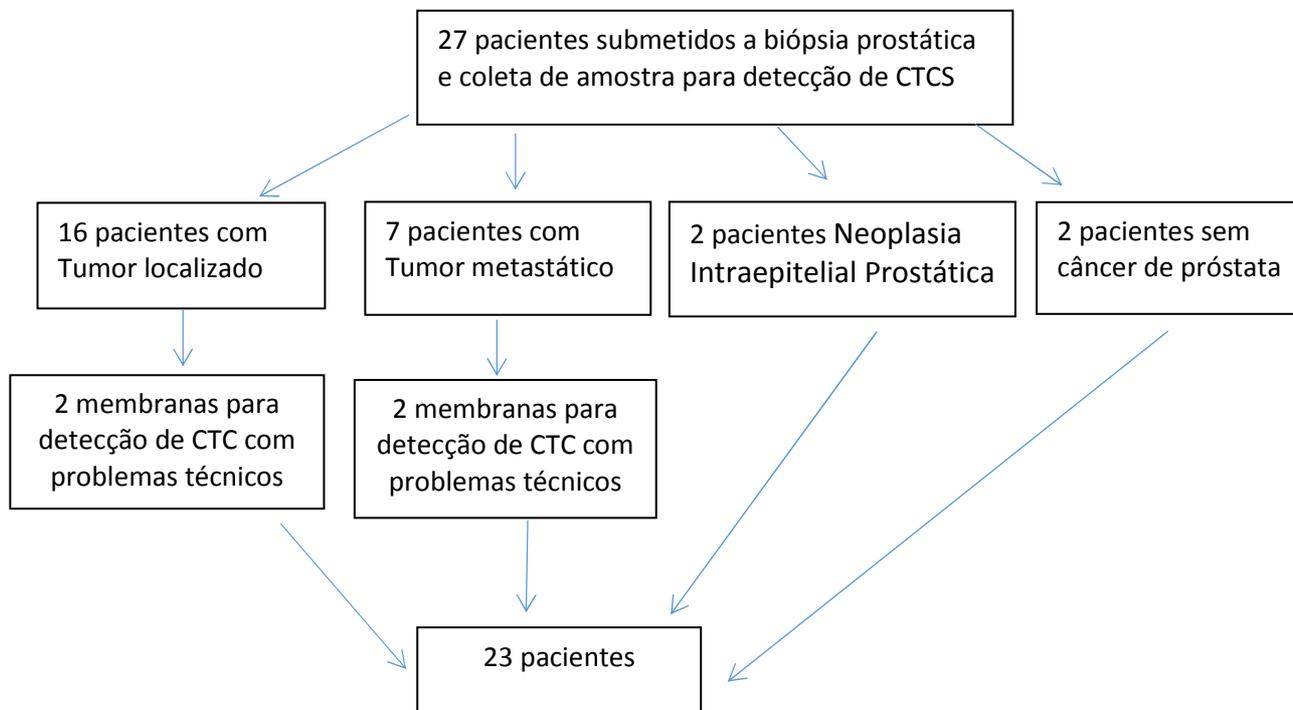


Figura 3 - Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo

Detecção de Células Tumorais Circulantes

A detecção das células tumorais circulantes encontra-se na figura 4

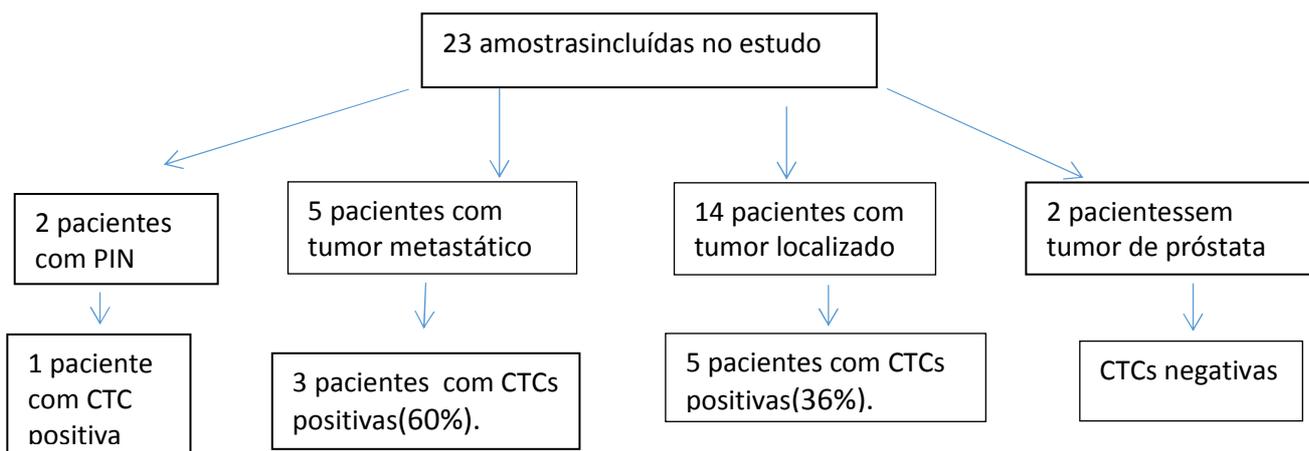


Figura 4 - Fluxograma da detecção das células tumorais circulantes

A amostras foram positivas para CTCs em 9 dos 21 pacientes com câncer de próstata incluídos no estudo(43%). No grupo dos pacientes com tumor localizado a positividade das CTCs foi de 36%, no grupo metastático foi de 60% e um dos pacientes com PIN apresentou CTCs positivas.

A idade dos pacientes, as características do tumor, os níveis de PSA, o tipo de tratamento instituído e os resultados da detecção de CTCs estão descritos na tabela 1.

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

Paciente	Idade	Tumor Metastático	Número de CTCs	Tratamento instituído	PSA (ng/mL)
1	82	Não	Negativa	RT e QT	2,51
2	71	Sim	Negativa	Prostatectomia/ Orquiectomia	305
3	74	Não	Negativa	Acompanhamento	9,7
4	75	PIN	Negativa	Acompanhamento	3,9
5	77	Sim	Negativa	Acompanhamento	1.000
6	73	Não	Negativa	RT e Hormônio	2
7	61	Não	Negativa	RT e Hormônio	0,03
8	66	Não	Negativa	RT	4,5
9	65	Não	Negativa	RT e Hormonioterapia	100
10	64	Não	Negativa	Prostatectomia	
11	61	Não	Negativa	Acompanhamento	
12	79	Não	Negativa	Acompanhamento	13,8
13	63	Sim	1	Hormonioterapia	100
14	63	Não	2	Não	16
15	86	Sim	2	QT	256
16	67	Não	1	Acompanhamento	14
17	57	PIN	1	Vigilância ativa	6,4
18	76	Não	1	RT	11,7
19	57	Não	2	Prostatectomia	0,03
20	70	Sim	4	Orquiectomia	780
21	77	Não	4	Acompanhamento	101,2

RT: Radioterapia; QT: quimioterapia, PIN: Neoplasia Intraepitelial Prostática

Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a contagem de CTCs com o tratamento instituído ou com os valores do PSA.

As imagens das CTCs estão descritas nas figuras abaixo.

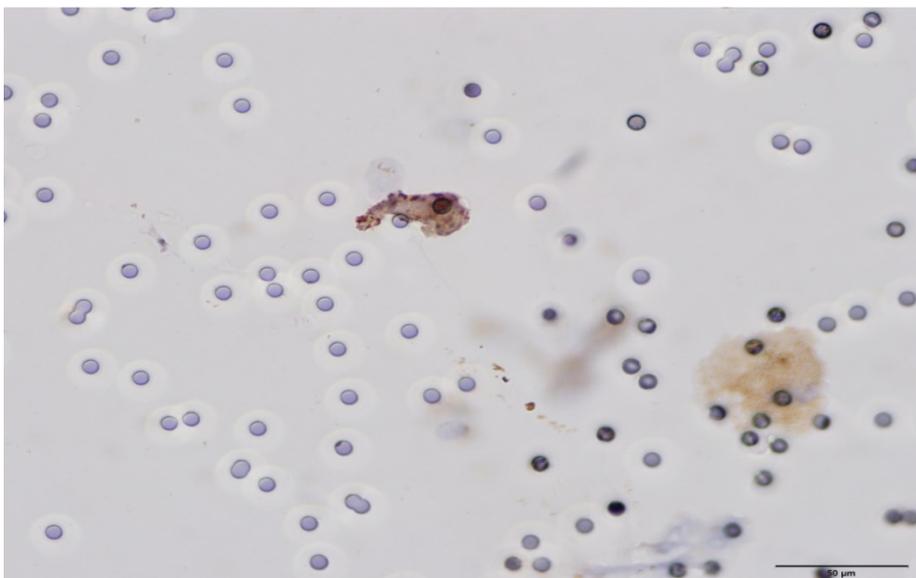


Figura 5: CTC de paciente de 57 anos, Neoplasia Intraepitelial prostática, PSA de 6,36 ng/mL em vigilância ativa. Contagem de CTCs: 1 célula.

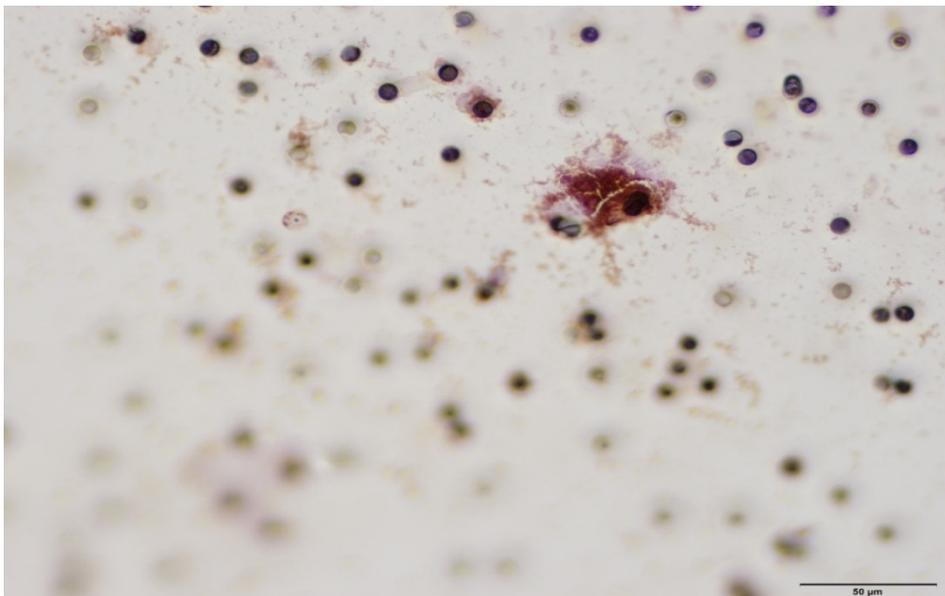


Figura 6: CTC de paciente de 67 anos, tumor localizado, *Gleason*7, PSA de 14

ng/mL em vigência de acompanhamento clínico. Contagem de CTCs: 2 células.

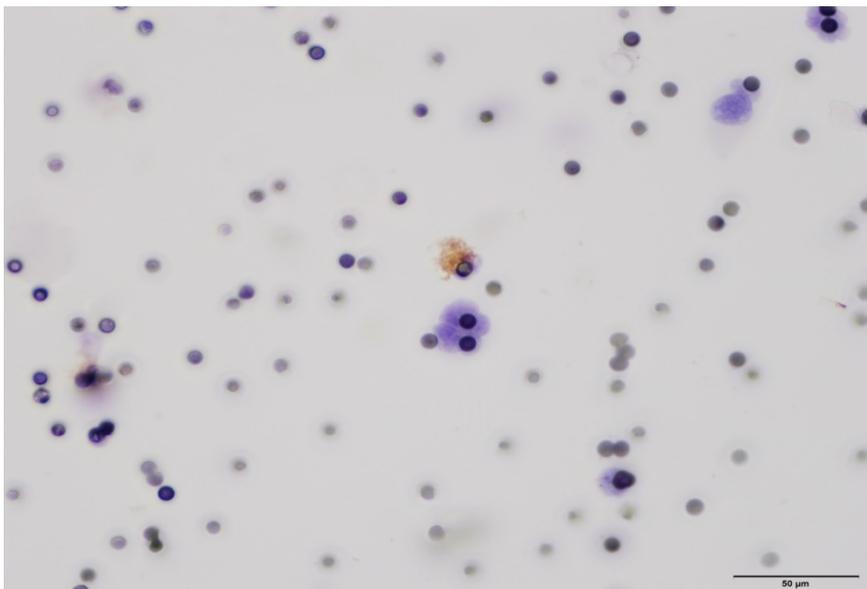


Figura 7 : CTC de paciente de 70 anos, tumor metastático, *Gleason 9*, PSA de 780 ng/mL e pós operatório de orquiectomia . Contagem de CTCs: 4 células.

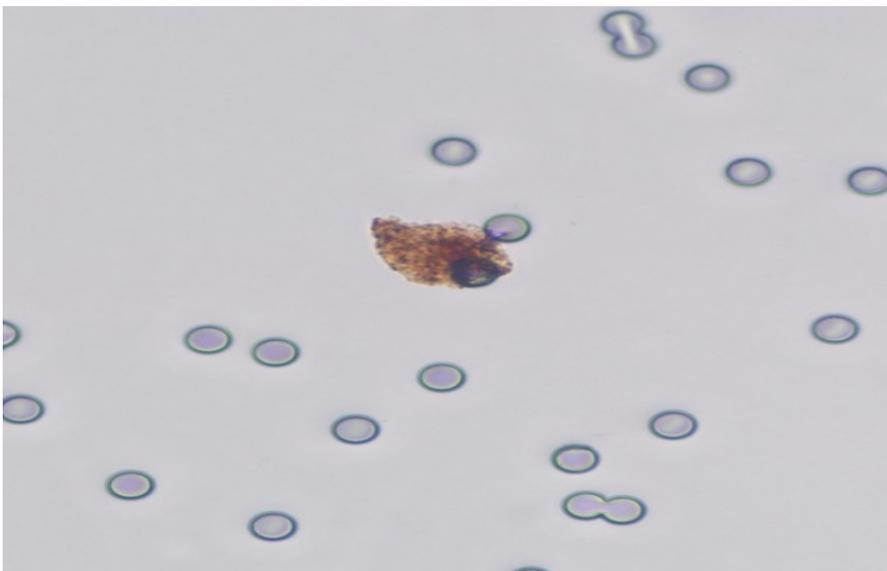


Figura 8 : CTC de paciente de 66 anos, tumor localizado, *Gleason 6*, PSA de 16 ng/mL em vigência de quimioterapia para doença hematológica. Contagem de CTCs: 2 células.

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a detecção de células tumorais circulantes do carcinoma de próstata em pacientes com doença localizada e metastática por método de filtração celular e marcador câncer específico Anti-PSA.

A idade média dos pacientes incluídos neste estudo foi de 69 anos, corroborando os dados de literatura que indicam a idade como um fator de risco importante para o câncer de próstata, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam significativamente após os 50 anos²⁷.

A positividade da detecção de CTCs em câncer de próstata depende do estadiamento da doença e da vigência de tratamento.

Neste estudo as CTCs foram detectadas em 43 % da casuística, com maior positividade entre o grupo de pacientes metastáticos (60%) que naqueles com tumor localizado (36%).

Kolostova et al realizou estudo com detecção e cultivo de CTCs em CP localizado utilizando sistema de filtração (*MetaCell*®). As CTCs foram detectadas nas amostras de sangue de 28 (52%) dos 55 pacientes sendo que foram capturadas células com capacidade proliferativa em 18 (64,3%) dos 28 pacientes com CTC positivas²⁸.

Usando um corte de 5CTCs / 7,5 ml de sangue e método de enriquecimento do *CellSearch*, Danila et al identificou CTCs em 57% dos 120 pacientes metastáticos de PC avaliados²⁹.

Thalgotte e colaboradores avaliaram a detecção de CTCs em pacientes com diferentes estágios do câncer de próstata: localmente avançado, metastático resistente á castração e refratário aos taxanos. As CTCs foram detectadas utilizando-se o sistema *CellSearch*. A detecção de CTCs no grupo de tumor localmente avançado foi de 7%, porem nos pacientes com metástases ósseas e viscerais simultaneamente apresentavam ate 90% de positividade³⁰.

A detecção de CTCs em pacientes com tumor de próstata não metastático é ainda um desafio, mas combinação de vários ensaios aumenta a chance de

positividade. *Kuske* e colaboradores avaliaram a detecção de CTCs em pacientes com tumor de próstata localmente avançado combinando três ensaios independentes: o Sistema *CellSerach*, o *CellCollector* e o *EPISPOT*. As CTCs foram detectadas em 37%, 54,9 % e 58,7 % usando *CellSerach*, *Cellcollector* e *EPISPOT* respectivamente ³¹.

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 imunohistoquímica sem danificar a membrana de filtração, além do uso de um único marcador câncer específico.

O cenário ideal seria utilizar ao menos mais um marcador(Receptor Androgênico ou Antígeno Próstata-Específico da Membrana) pois durante a evolução da doença tumoral prostática e também devido uso de terapia androgênica pode ocorrer *down-regulates* da expressão do PSA diminuindo assim a positividade de CTCs com apenas este marcador^{32, 33}.

Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre a contagem de células tumorais circulantes e tratamento instituído e os níveis de PSA circulantes, porém o pequeno número de pacientes incluídos no estudo pode ser um fator limitante.

Foi surpreendente o encontro de CTCs em paciente com Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). Não havia informação no laudo anatomopatológico se a neoplasia era de alto ou baixo grau, porém o encontro de CTCs indica a possibilidade de câncer de próstata em localizações diferentes das amostras obtidas pela punção.

A biópsia líquida usando CTCs pode auxiliar na seleção de um candidato apropriado para vigilância ativa e monitoramento da resposta à vigilância ativa ou a terapias e recorrência.

A investigação de CTCs na tentativa de identificação de novos biomarcadores, mais eficazes e menos invasivos deverá contribuir para reduzir a morbidade e os custos associados ao CP, cuja prevalência está aumentando.

A utilidade de CTCs em pacientes com câncer de próstata resistente á

castração e CP localizado após prostatectomia radical tem sido relatada³⁴.

Devido ao longo tempo de evolução da doença prostática não foi possível, neste estudo, avaliar os desfechos clínicos dos pacientes.

A investigação de CTCs em candidatos à vigilância ativa ainda não está bem estabelecida, porém, o desenvolvimento de um marcador CTC específico para pacientes elegíveis aos atuais critérios de vigilância ativa seria muito importante.

Pesquisas futuras sobre CTCs devem ser focadas no desenvolvimento de um marcador para CTCs com melhor sensibilidade e especificidade, antes de sua aplicação na detecção de PC.

O marcador ideal para PC deve ser expresso na maioria das CTCs, mas não em outras células no sangue, e sua expressão deve ser mantida durante todo o curso da doença.

Finalmente, a técnica usada para análise de CTC deve ser melhorada para obter alta seletividade e sensibilidade para a aplicação de CTCs em PC.

Portanto, cumpre reforçar que as CTCs parecem ser uma ferramenta promissora com potencial para auxiliar a prática clínica. Varias tecnologias têm sido utilizadas para isolar e analisar as CTCs de pacientes com câncer de próstata, mas cada uma dessas abordagens apresentam limitações.

Além disso, a detecção das CTCs ainda não está disponível na maioria dos laboratórios e muitas vezes a etapa da imunocitoquímica encarece e dificulta o processo.

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, Rohrmann 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.