

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**PRODUÇÃO DE VACINA CELULAR AUTÓLOGA IMUNOMODULADA  
PARA ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA**

**Jorge Luiz Horst**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre  
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**PRODUÇÃO DE VACINA CELULAR AUTÓLOGA IMUNOMODULADA  
PARA ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA**

**Jorge Luiz Horst**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia. Área de Concentração: Urologia.

Orientador: Prof. Dr. Walter José Koff

Porto Alegre

2003

**H819p** Horst, Jorge Luiz

Produção de vacina celular autóloga imunomodulada com BCG para adenocarcinoma de próstata / Jorge Luiz Horst ; orient. Walter José Koff. – 2003.  
98 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia, Porto Alegre, BR-RS, 2003.

1. Câncer de próstata. 2. Cultura primária. 3. Vacina celular autóloga. 4. Porto Alegre. I. Walter José Koff II. Título.

NLM: WJ 752

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

*“A procura da Verdade é, por um lado, difícil e, por outro, fácil, já que nenhum de nós poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza, e disto uma certa grandeza emergirá.”*

**ARISTÓTELES, 350 A.C.**

*Aos meus pais, Edgar e Lucena, pelo carinho, compreensão e dedicação.*

*Aos meus familiares, Sadi, Lúcia, Nilza, Rogério, Nelci, Gilberto, Neuza, Paulo, Ana, Henrique, Roger, Gustavo, Camila, Luisa, Pedro Arthur e Pedrinho, pelo apoio, compreensão e amizade.*

*A meu irmão Jair e a meu sobrinho André Luiz, que estão sempre vivos na minha memória.*

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao Prof. Dr. Walter José Koff, meu orientador, de notável conhecimento, pela grande contribuição na minha formação profissional e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.
- Ao Dr. Milton Berger, colega de grande conhecimento, pela atenção e auxílio neste projeto de pesquisa.
- À FK Biotecnologia, pelo financiamento deste projeto de pesquisa.
- A Carlos Eduardo Schio Fay e Fabricio Bergelt de Souza, pelo auxílio no projeto de pesquisa.
- Ao colega e amigo Leonardo Infantini Dini, pelo apoio, amizade e incentivo nas adversidades.
- Às secretárias e amigas Norma da Silva e Estela Maris Araripe, pela atenção, prontidão e eficiência no desempenho de suas atividades.

- 
- Ao Prof. Dr. Mário Wagner, à Prof<sup>a</sup> Clarice Bohn Knies e a Zuleica Santos, que auxiliaram, respectivamente, na análise estatística, na lapidação da linguagem e na estruturação técnica do texto final deste trabalho.
  - À bioquímica Aline Chies Baldi pelo trabalhos realizados no laboratório de cultura celular.
  - Aos professores e contratados do HCPA, Dr. Protásio Alves, Dr. Cláudio Lima, Dr. Renato Scalesky, Dr. Bernardo Moreira e Dra. Nancy Tamara Denicol, que auxiliaram e permitiam a realização deste trabalho.
  - Aos residentes do Serviço de Urologia do HCPA, pela cooperação sempre importante.
  - Ao Prof. Dr. Fernando T. Kreutz, pelas importantes sugestões e críticas.
  - Aos pacientes que, voluntariamente, participaram do presente estudo.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	- anticorpo(s)
ADCC	- citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo
Ag	- antígeno(s)
APC	- célula(s) apresentadora(s) de antígeno
AUA	- American Urological Association
BCG	- bacilo(s) de Calmette-Guérin
CaP	- câncer de próstata
DMEM	- meio de cultura (Dulbecco's/Vogt modified Eagle's Medium)
GM-CSF	- fator estimulador de colônias de macrófago-granulócitos
HLA	- antígeno leucocitário humano
IFN	- interferon(s)
IL	- interleucina(s)
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
LAK	- células <i>killer</i> ativas por linfocinas
LTc	- linfócito(s) T citotóxico(s)
LTh	- linfócito(s) T auxiliar(es)
MHC	- complexo de histocompatibilidade principal

---

ng/ml	-	nanogramas por mililitro
NK	-	<i>natural killer</i>
PSA	-	antígeno prostático específico
RPMI-1640	-	meio de cultura (Roswell Park Memorial Institute)
TIL	-	linfócitos infiltrados no tumor ativados
TNF	-	fator(es) de necrose tumoral

## SUMÁRIO

<b>1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PRÓSTATA.....	11
1.2 FATORES DE RISCO.....	14
1.3 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO .....	15
1.4 TRATAMENTO .....	17
1.5 CULTURA CELULAR DE CÂNCER DE PRÓSTATA .....	19
1.6 SISTEMA IMUNE .....	23
1.7 IMUNOLOGIA TUMORAL .....	25
1.8 IMUNOTERAPIA TUMORAL.....	29
1.8.1 Imunoterapia passiva.....	30
1.8.2 Imunoterapia ativa .....	31
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>3 ARTIGO - PRODUÇÃO DE VACINA CELULAR AUTÓLOGA IMUNOMODULADA PARA ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA.....</b>	<b>40</b>
RESUMO .....	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS .....	44
RESULTADOS .....	46
DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS .....	56
<b>4 PAPER – PRODUCTION OF IMMUNOMODULATED AUTOLOGOUS CELL VACCINE FOR PROSTATE ADENOCARCINOMA .....</b>	<b>60</b>
ABSTRACT .....	61
INTRODUCTION .....	62
MATERIAL AND METHODS .....	64
RESULTS .....	66
DISCUSSION .....	69
CONCLUSIONS .....	74
BIBLIOGRAPHY .....	75

---

<b>5 BIBLIOGRAFIA DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>89</b>
ANEXO A - CLASSIFICAÇÃO TNM PARA CÂNCER DE PRÓSTATA(2002).....	90
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE PARA COLETA DE MATERIAL PARA PRODUÇÃO DA VACINA .....	92
ANEXO C - SELEÇÃO DE PACIENTES.....	95
ANEXO D - TÉCNICA DE COLETA DO MATERIAL ATRAVÉS DE PROSTATECTOMIA RADICAL RETROPÚBICA (PRR) .....	96
ANEXO E - TÉCNICA DE COLETA DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DE RTUp E Bx.....	97

---

---

## **1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA**

---

---

# **1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA**

No Brasil, o câncer era a quinta causa de óbito em 1930. Hoje, ele é a segunda causa de morte, consome volumosos recursos financeiros, representa um grande ônus social e institucional e é muito prevalente. Tudo isso justifica priorizar ações de prevenção e tratamento nesta área. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que, em 2003, ocorrerão 402.190 casos novos da doença e 126.960 óbitos por câncer em todo Brasil, sendo 186.155 (46,3%) casos novos e 68.350 (53,8%) óbitos entre homens e 216.035 (53,7%) casos novos e 58.610 (46,2%) óbitos entre as mulheres. Apesar do número menor de casos novos em homens, a mortalidade por câncer é maior entre eles do que entre as mulheres.(1)

## **1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

A incidência e a taxa de mortalidade por câncer de próstata (CaP) variam muito de país para país, assim como entre grupos étnicos e raciais.(2) De um modo geral, tem havido um aumento gradual na sua incidência em todo mundo desde 1960.(3) As maiores taxas de incidência são observadas nos Estados Unidos da América e no Canadá. Nos EUA, foram diagnosticados 198.100 novos casos e

35.200 homens morreram em decorrência da doença em 2002; na Europa, foram 134.000 casos novos e 32.100 óbitos no mesmo ano.(4) O quadro 1 mostra diferenças de incidência no mundo. Também a mortalidade por CaP tem aumentado em muitos países, mas de forma menos intensa que a incidência.(3)

**Quadro 1 - Incidência mundial de câncer de próstata (3)**

EUA	142/100.000 habitantes (ALTA)
BRASIL	40/100.000 habitantes (INTERMEDIÁRIA)
JAPÃO	6/100.000 habitantes (BAIXA)

No Brasil, o CaP é o segundo mais freqüente e a segunda causa de óbito por câncer no sexo masculino, tendo-se verificado, nas últimas décadas, um aumento significativo e progressivo na sua incidência e mortalidade. Entre 1979 e 1999, a taxa de mortalidade por CaP no Brasil aumentou de 3,73/100.000 habitantes para 8,93/100.000 habitantes, o equivalente a uma variação percentual de 140%. Esse aumento reflete, pelo menos parcialmente, o envelhecimento da população brasileira.(1)

Na tabela 1, são apresentadas incidência, mortalidade e taxas brutas de incidência e mortalidade, conforme estimativas do INCA para o ano de 2003.(1)

**Tabela 1 – Câncer de próstata – incidência, mortalidade e taxas brutas de incidência e mortalidade por 100.000 homens, estimativas para 2003.**

	<b>Incidência</b>	<b>TBI</b>	<b>Mortalidade</b>	<b>TBM</b>
Brasil	35.240	40,49	8.230	9,47
Região Sul	4.980	38,74	1.610	12,58
Rio Grande do Sul	2.500	48,45	810	15,73
Porto Alegre	420	63,92	140	20,75

TBI: taxa bruta de incidência; TBM: taxa bruta de mortalidade. INCA 2003(1)

O aumento da incidência se deve, em parte, ao aumento da expectativa de vida, à melhoria das condições técnicas de ultra-sonografia e biópsia transretal de próstata e ao advento do antígeno prostático específico (PSA).(1)

O CaP é tipicamente uma doença do idoso: 80% dos casos diagnosticados são homens com 65 ou mais anos de idade.(4) A média de idade, por ocasião do diagnóstico, é de 69,2 anos para brancos e de 67,3 anos para negros.(5) Somente 3% dos acometidos pela doença são homens jovens com menos de 55 anos, mas a incidência está aumentando nessa faixa etária.(6)

Nos EUA, a incidência em negros é maior que em brancos, diferença que não foi observada no Brasil.(7)

A prevalência de CaP aumenta com o número de décadas vividas. A média geral de casos insuspeitos de CaP em autópsias é de 35%.(8) Campbell, usando o percentual de 30% como média geral de achados positivos em autópsias, estima que somente 1% a 2% da população potencialmente portadora desse tumor vai evoluir com expressão da doença em alguma fase da vida.(7)

## 1.2 FATORES DE RISCO

Os fatores de risco definidos para CaP são idade, história familiar, etnia e presença de neoplasia intra-epitelial.(9)

A idade, como se viu, é um fator de risco importante. Nenhum outro câncer aumenta tanto com a idade quanto o CaP.(1) A probabilidade de desenvolver CaP é menor que 1/10.000 em homens com menos de 39 anos, é de 1/103 entre homens de 40 a 59 anos e de 1/8 em homens de 60 a 79 anos.(10)

História familiar de pai ou irmão com CaP aumenta o risco de CaP em 2,8 vezes em relação à população em geral. Se um tio ou avô também mostrarem a doença, o risco sobe para 6,1 vezes.(7) Tal fato pode refletir não só os fatores genéticos, mas também os hábitos alimentares ou o estilo de vida de algumas famílias.(1)

Nos EUA, as populações afro-descendentes apresentam um risco 60% maior de desenvolver a doença e uma mortalidade duas vezes maior que a população caucasiana da mesma idade.(9)

A influência que a dieta pode exercer sobre a gênese do CaP ainda não está bem definida, não sendo conhecidos com precisão os componentes ou os mecanismos através dos quais ela influencia o desenvolvimento dessa neoplasia maligna. Estudos recentes encontraram uma associação apenas fraca entre a doença e o alto teor de gordura e calorias. Ao lado disso, alguns componentes naturais dos alimentos, como a vitamina E e o licopeno, e minerais, como o selênio, parecem desempenhar um papel protetor.(1,7,9)

Há evidências estabelecidas de que a testosterona tem papel importante na história natural do CaP, já que ela provoca proliferação celular tumoral. No entanto, é controverso o seu papel na indução do tumor. Estudos em hipotestosteronemia, agenesia testicular, castração cirúrgica e cirrose hepática relatam menor incidência de CaP nessas situações.(11)

### 1.3 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO

Apartir de certa idade, o exame urológico periódico deve ser realizado, para que o tumor possa ser detectado em suas fases iniciais, o que aumenta as chances de tratamento e cura. A AUA (*American Urological Association*) sugere realizar exame urológico e dosagem de PSA, anualmente, para homens de 50 anos ou mais e iniciar aos 40 anos para aqueles de descendência afro-americana ou com uma história familiar de CaP.(12)

A detecção do CaP é feita por exame digital retal, dosagem do antígeno prostático específico (PSA), e biópsia de próstata em casos suspeitos. O exame digital retal permite detectar nódulos pequenos e avaliar a extensão local da doença. Dosagens de PSA acima de 4 ng/ml, ou acima de 2,5 ng/ml em pacientes com menos de 50 anos de idade, devem levantar a suspeita de existência de CaP.(13)

O PSA representa isoladamente a melhor forma de identificar o CaP. A sua associação com toque retal aumenta bastante sua sensibilidade diagnóstica. Os pacientes assintomáticos submetidos a rastreamento com PSA de 4-10 ng/mL têm cerca de 25% de chance de biópsia positiva. Quando ele é superior a 10 ng/mL, a possibilidade de câncer situa-se ao redor de 70%, o que indica a necessidade

imediate de biópsia.(7)

O PSA não é um marcador preciso para estadiamento do CaP. Em geral, valores pouco elevados sugerem doença localizada. Pacientes com dosagens abaixo de 10 ng/ml não precisam realizar cintilografia óssea para pesquisa de metástases. No entanto, pacientes que apresentam níveis de PSA acima de 50 ng/ml têm grande possibilidade de doença metastática.(7)

Para o estadiamento clínico do CaP estão indicados o toque retal, a dosagem do PSA total, a ultra-sonografia transretal, a interpretação dos dados oferecidos pela biópsia prostática e o escore de Gleason. Em casos específicos, podem ser indicados a cintilografia óssea, o raio X ósseo e de pulmão, a fosfatase ácida e alcalina, a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a linfadenectomia pélvica.(7)

O estadiamento do CaP que classifica a doença em relação ao tumor local (T), aos linfonodos (N) e à presença de metástases (M) é o mais usado atualmente. Tal estadiamento, conhecido como TNM, é mostrado no anexo A.

Os avanços diagnósticos no CaP, que incluem o PSA, ultra-sonografia transretal e toque retal, associados a campanhas de rastreamento têm permitido que essa doença seja diagnosticada ainda em seus estágios iniciais. No entanto, atualmente, em 80% dos casos, o diagnóstico clínico é de doença local e, em 20%, de doença metastática.(14) Além disso, uma fração significativa desenvolverá doença sistêmica após tratamento local adequado devido à alta incidência de subestadiamento clínico com as técnicas diagnósticas atuais. Por ocasião da cirurgia, 50% dos pacientes sofrerão correção do estadiamento, constituindo casos de tumores localmente avançados ou metastáticos.(7) Após prostatectomia radical,

aproximadamente 20% dos pacientes apresentarão doença metastática durante um acompanhamento médio de 5 anos.(15)

#### 1.4 TRATAMENTO

O CaP pode apresentar-se confinado à glândula prostática (doença localizada), pode ultrapassar os limites da cápsula prostática, comprometendo tecidos periprostáticos ou vesículas seminais (doença localmente avançada), ou pode demonstrar acometimento ganglionar ou de estruturas, como ossos, pulmão e fígado (doença metastática).(7)

No estado atual do tratamento do CaP, proporciona-se cura ou significativo prolongamento de vida para a maioria dos pacientes com doença localizada. A cura da doença localmente avançada é mais rara, e a doença metastática é considerada incurável.(7)

O tratamento do CaP localizado é realizado por meio de cirurgia (prostatectomia radical) ou radioterapia (externa ou braquiterapia). Tais tratamentos apresentam certa morbidade, devido ao risco de disfunção erétil, incontinência urinária, sangramento transoperatório, estenose uretral, cistite actínica e retite actínica.(7)

A notável contribuição de Patrick Walsh para a anatomia cirúrgica da pelve e do períneo reduziu a incidência de complicações em prostatectomia radical para índices aceitáveis e fez com que esse procedimento passasse a ser empregado como opção terapêutica principal em praticamente todos os centros urológicos.(16)

O tratamento do CaP localmente avançado deve ser individualizado, levando-se em consideração o estado geral do paciente, sua idade, expectativa de vida, e comorbidades, além do desejo do paciente. Esses doentes podem ser tratados com radioterapia externa, com hormonioterapia neoadjuvante seguida de radioterapia ou cirurgia radical, com hormonioterapia primária ou com seguimento em casos selecionados.(17)

O CaP metastático é tratado por castração cirúrgica ou química. Esse tratamento proporciona significativa estabilização ou regressão da doença em 80% dos pacientes por um período médio de 20 meses. Após esse tempo, surgem clones celulares hormônio-refratários, e o paciente passa a não responder mais ao tratamento. Os pacientes com doença hormônio-refratária têm um péssimo prognóstico, sendo sua sobrevida estimada em 12 a 18 meses. O CaP metastático, principalmente o hormônio-refratário, é uma área onde novos avanços são necessários.(7)

Novas modalidade terapêuticas para o CaP, como a imunoterapia, têm sido ativamente estudadas. As investigações de novos tratamentos do CaP podem ser realizadas através de modelos desenvolvidos in vitro e in vivo. A cultura de células de CaP in vitro tem permitido estudar alterações citológicas, histológicas e genéticas, receptores e antígenos tumorais, mecanismos de carcinogênese e possíveis fatores etiológicos, bem como testar novos medicamentos e produzir vacinas.(18,19) Para o desenvolvimento de uma vacina celular autóloga, é necessário que se faça o isolamento e a expansão das células de CaP em cultura celular in vitro. Além disso, é preciso conhecer a imunologia e a imunoterapia tumoral.

## 1.5 CULTURA CELULAR DE CÂNCER DE PRÓSTATA

O processo de produção de culturas celulares a partir do tumor primário ou de metástases deve seguir as seguintes etapas: coleta de uma amostra de câncer, desagregação da amostra, cultura celular em meio seletivo, produção de cultura celular primária e isolamento das células tumorais.(20)

O câncer, geralmente muito heterogêneo, é composto de uma série de subclones celulares que apresentam considerável diversidade fenotípica. Por essa razão, fica difícil assegurar representatividade em culturas celulares, a menos que as amostras coletadas sejam totalmente representativas do tumor original e a sobrevivência celular de cada subclone seja de 100%. Já que isso é praticamente impossível, o objetivo viável é produzir uma cultura celular com representatividade semelhante à do tumor original.(19,20)

O problema da seletividade é ainda mais acentuado quando a amostra é coletada a partir de metástases, que geralmente crescem melhor, mas podem não ser típicas nem do tumor primário nem dos demais focos metastáticos.(20) É nesse fato que reside o problema da maioria das linhas celulares estabelecidas de CaP usadas para o desenvolvimento das vacinas celulares alogênicas, visto que a maioria delas foi desenvolvida a partir de metástases.(19)

A desagregação do tumor pode ser realizada por processos mecânicos, como fragmentação, pipetagem ou peneiração, ou pela digestão enzimática.(19,20)

A digestão enzimática pode ser usada em tumores que incorporam grandes quantidades de estroma fibroso. Na digestão, a tripsina pode ser usada, apesar da

sua toxicidade para algumas células tumorais de origem epitelial. Também a collagenase pode ser utilizada, embora a desagregação também libere algumas células estromais, cuja eliminação requer técnicas de cultura seletiva. Na cultura celular tumoral, é importante promover o crescimento de células neoplásicas e bloquear o crescimento dos outros tipos celulares. Para isso, é necessário adotar condições seletivas de cultura, como podem ser os meios de cultura seletivos.(20)

Meios de cultura seletivos foram desenvolvidos para cultura celular de câncer. O meio de Hites foi desenvolvido para câncer de pulmão de pequenas células. Ele foi modificado para RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) com a adição de hidrocortisona, insulina, transferrina, estradiol e selênio, dos quais a insulina, a transferrina e o selênio parecem ser os mais importantes. Além disso, esse meio contém uma grande quantidade de fosfato. Ao contrário de outros meios de cultura, como o DMEM (Dulbecco/Vogt modified Eagle's), as células em cultura no meio RPMI-1640 devem ser colocadas na incubadora sob pressão atmosférica a 5% de CO<sub>2</sub>, caso contrário, o meio se tornará muito ácido e ficará de cor amarela.(19,20)

Vários outros meios de cultura seletivos para células de câncer são descritos, mas o meio RPMI-1640 é o mais utilizado para cultura de CaP.

Vários tipos de células podem crescer nos meios de cultura seletivos para tumores. Além das células neoplásicas, podem crescer fibroblastos, células vasculares endoteliais, células musculares lisas, células de tecido normal, linfócitos infiltrativos, granulócitos e macrófagos. Os componentes hematopoéticos e as células musculares lisas raramente crescem nessas condições. Assim sendo, os principais contaminantes de culturas tumorais são os fibroblastos, as células endoteliais e as células do tecido normal.(20)

O principal problema são os fibroblastos; além de crescerem prontamente em cultura, eles também podem responder a fatores de crescimento derivados das células tumorais e, assim, crescer ainda mais rapidamente. As células endoteliais, particularmente na ausência de fibroblastos, podem responder a fatores de crescimento das células tumorais e acelerar seu crescimento.(20)

Os fibroblastos têm uma morfologia fusiforme característica, crescimento limitado pela densidade e tempo de vida finito de aproximadamente 50 gerações, produzem colágeno II e são rigidamente diplóides.(20)

As células do tecido normal são diplóides e ancoragem-dependentes e têm tempo de vida finito. Além do mais, elas não se desenvolvem em meios que não tenham fatores de crescimento adequados, diferentemente das células neoplásicas.(20)

Os experimentos realizados com culturas celulares permitiram observar grandes diferenças estruturais, bioquímicas e comportamentais entre as células normais e as cancerosas. As alterações são principalmente observadas dentro dos cromossomos das células cancerosas. As células normais mantêm seus cromossomos diplóides direcionados ao crescimento e à divisão celular, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em contraste, as células cancerosas freqüentemente têm aberrações cromossômicas, uma condição patológica conhecida por aneuploidia. (19,20)

Muitas diferenças de comportamento entre células normais e cancerosas são observadas em meio de cultura. As células normais deixam de se locomover e crescer quando estão cercadas pelas células vizinhas (inibição de contato). Já as células de câncer ignoram os sinais emitidos pelas células vizinhas e continuam

suas atividades de locomoção e crescimento (sem inibição de contato), crescendo de uma maneira independente da densidade. As células normais dependem de fatores de crescimento presentes no soro humano ou bovino adicionado ao meio de cultura, ao passo que as células cancerosas proliferam na ausência do soro ou com quantidades mínimas de soro, pois seu ciclo celular não depende dos sinais transmitidos aos receptores de superfície pelos fatores de crescimento. As células normais têm capacidade limitada para divisão celular; após um número finito de divisões mitóticas, elas sofrem o processo de decodificação, que as impede de crescer e de dividir-se. Já as células cancerosas podem ser imortais, pois se dividem indefinidamente.(19,20)

A cultura celular *in vitro* permite desenvolver vários tipos de culturas com características distintas, como são as culturas celulares primárias, as linhas celulares, as linhas celulares estabelecidas e as linhagens celulares.(18)

Cultura primária é a cultura iniciada a partir de células, tecidos ou órgãos obtidos diretamente do paciente. Essas células não permanecem em cultura por um período prolongado, o que impede a ocorrência de alterações *in vitro*. As células obtidas da cultura primária assemelham-se, portanto, às do tumor original.(18)

As subculturas da cultura primária dão origem às linhas celulares. Essas apresentam tempo de vida finito, são formadas por numerosas linhagens de células presentes na cultura primária e, geralmente, mantêm as propriedades da cultura primária. As linhas celulares são denominadas linhas celulares estabelecidas quando apresentam o potencial de crescer infinitamente em subculturas, sendo, então, consideradas imortais.(18)

As linhas celulares estabelecidas de CaP mais estudadas (PC3, DU145 e

LNCaP) foram coletadas de metástases e, portanto, não apresentam a mesma composição genética e o mesmo comportamento biológico do CaP primário.(18)

O uso de células de câncer em vacinas humanas requer a inativação das mesmas através de irradiação, que causa a cessação do crescimento celular. A irradiação das células de câncer com 200 Gy determina interrupção do processo de divisão celular, mas permite que elas permaneçam metabolicamente ativas.(21,22) Células tumorais irradiadas derivadas do próprio paciente (autólogas) ou de outros pacientes (alogênicas) têm sido utilizadas para inocular pacientes com câncer, com a esperança de se gerar uma reação terapêutica imune.(23)

## 1.6 SISTEMA IMUNE

A resposta imune pode ser dividida em dois tipos básicos: humoral e celular. A resposta humoral se refere à utilização de anticorpos (Ac) para mediar a resposta. Essas proteínas são geradas a partir da interação de antígenos (Ag) solúveis, presentes no meio extracelular, com os receptores de linfócitos B. Existindo afinidade entre o Ag solúvel e o receptor no linfócito B, ocorrerá a ativação do linfócito B, a qual, com o auxílio de citocinas produzidas pelos linfócitos T auxiliares (LTh), se transformará em célula produtora de Ac (plasmócito). Os Ac produzidos se distribuem pelo organismo através da circulação sangüínea e, interagindo com o Ag, ativam uma série de mecanismos efetores, como a ativação do sistema complemento e a opsonização por macrófagos. Esse mecanismo de defesa é extremamente eficaz para eliminar vírus, bactérias e outros agentes que permanecem no meio extracelular.(24)

Alterações intracelulares causadas por infecções virais ou alterações de proteínas intracelulares são, por sua vez, combatidas através do sistema de resposta celular.(24,25)

Todas as células nucleadas, com exceção dos espermatozóides e dos óvulos, possuem em sua superfície complexos moleculares chamados de complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Na espécie humana, o grupo de MHC presente na superfície celular também é denominado de antígeno leucocitário humano (HLA). As moléculas do MHC desempenham um papel no reconhecimento intercelular e na discriminação entre o próprio (do organismo) e o não próprio (não do organismo), determinando se um tecido é histocompatível ou histoincompatível.(24,25)

Existem dois tipos de complexos moleculares com funções distintas: MHC de tipo I e MHC de tipo II. As proteínas produzidas no meio intracelular pelas enzimas proteolíticas são apresentadas no MHC de tipo I e reconhecidas pelos linfócitos T citotóxicos (LTc). Já as proteínas produzidas nas células fagocitárias e lançadas no meio extracelular são apresentadas no MHC do tipo II e reconhecidas pelos LTh. As moléculas MHC de classe I estão presentes na superfície de quase todas as células nucleadas, enquanto as moléculas de classe II estão presentes principalmente nas células apresentadoras de antígenos (APC), como são as células dendríticas, os macrófagos e as células B.(24,25)

Para haver uma resposta imune efetiva, é necessário o estímulo dos LTc e LTh. Os LTc são os responsáveis diretos pela eliminação de células que apresentam peptídeos estranhos ao organismo, ao passo que os LTh são indispensáveis para a iniciação e manutenção da resposta imune, secretando uma gama variada de citocinas.(24,25)

As citocinas são proteínas reguladoras produzidas, principalmente, pelos LTh e pelos macrófagos. Elas atuam regulando o tipo, a intensidade e a duração da resposta imune através da estimulação, proliferação e/ou diferenciação de várias células e através da regulação da secreção dos Ac ou de outras citocinas. São as mensageiras do sistema imune.(25)

Muitas das citocinas são referidas como interleucinas (IL), indicando que elas são secretadas por alguns leucócitos e que agem sobre outros leucócitos. Outras são conhecidas por nomes comuns; neste grupo estão incluídos os interferons (IFN) e os fatores de necrose tumoral (TNF). Os principais produtores de citocinas são os LTh e os macrófagos.(25)

Já que os genes que codificam as várias citocinas foram clonados, quantidades suficientes de preparações purificadas tornaram-se disponíveis para estudos detalhados de sua estrutura e função.(24,25)

## **1.7 IMUNOLOGIA TUMORAL**

Para entender a imunidade tumoral e as estratégias para imunoterapia no câncer, é fundamental entender as diversas características dos Ag tumorais e das respostas imunológicas.(24,25)

A primeira demonstração experimental de que câncer pode determinar uma resposta imune protetora foi com estudos realizados com tumores transplantados na década de 1950. Foi induzido sarcoma de pele em ratos singênicos. Quando o tumor era excisado e transplantado para outro rato singênico, o tumor crescia. Por outro

lado, se o tumor era transplantado de volta para o rato original, havia a rejeição do tumor. Um rato que se tornou imune a seu próprio tumor mostrou-se incapaz de rejeitar o tumor induzido em outro rato. Além do mais, linfócitos T de um rato com tumor podiam transferir proteção imunológica para um rato livre de tumor. Desta forma, a resposta imune ao câncer tem as características de imunidade adaptativa, especificidade e memória imunológica, e é mediada por linfócitos.(24,25)

Em animais de experimentação, demonstrou-se que os Ag tumorais podem induzir tanto a resposta imune humoral como a resposta celular. Em geral, a resposta mediada por célula parece desempenhar o papel principal. Foi demonstrado que a própria célula tumoral pode ser uma APC. Os seus Ag intracelulares ligados às moléculas de classe I do MHC na superfície celular são apresentados e reconhecidos pelos LTc. No entanto, a expressão das moléculas do MHC de classe I é diminuída em vários tumores, entre eles o da próstata, limitando o papel dos LTc específicos na sua destruição.(24,25)

A outra forma de ativação do sistema imune é através das APC que possuem moléculas MHC de classe II e que ativam LTh. As APC apresentam o Ag ao LTh, e quando essa ligação está acompanhada da ligação de receptores co-estimulatórios, como B7 com CD28 ou CD40 com CD40L, uma cascata intracelular resulta na produção de várias citocinas e na ativação e proliferação de todos os tipos de linfócitos T. As citocinas liberadas são interleucinas (IL), interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) e o fator estimulador de colônias de macrófago-granulócitos (GM-CSF).(24,25)

O reconhecimento das células tumorais pelas células *natural killer* (NK) não é restrito ao MHC; portanto, ele não está prejudicado pela diminuição da expressão de MHC. Em alguns casos, os receptores de membrana para imunoglobulina nas

células NK podem ligar-se às células tumorais revestidas pelos Ac, levando à citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC).(24)

Numerosas observações indicam que os macrófagos ativados também desempenham papel significativo na resposta imune aos tumores. Muitas vezes, os macrófagos se agrupam ao redor dos tumores, e sua presença está, freqüentemente, correlacionada com regressão tumoral. À semelhança das células NK, os macrófagos não são restritos ao MHC e expressam os receptores de membrana para imunoglobulina, capacitando-os a se ligarem aos Ac nas células tumorais e a mediar a ADCC. A atividade antitumoral dos macrófagos ativados é mediada, provavelmente, pelas enzimas líticas, pelo oxigênio reativo e pelos intermediários do nitrogênio. Além disso, os macrófagos ativados secretam uma citocina denominada de fator de necrose tumoral (TNF), que tem potente atividade antitumoral. Quando injetado nos animais que possuem câncer, TNF- $\alpha$  induz hemorragia e necrose do tumor.(24,25)

O fato de tantos indivíduos morrerem a cada ano de câncer sugere que a resposta imune às células tumorais é muitas vezes ineficaz. Assim sendo, por que o sistema imune geralmente não é eficiente em prevenir ou destruir o câncer? Porque as células de câncer são derivadas da célula do hospedeiro e, por essa razão, assemelham-se muito à célula normal. Em outras palavras, tumores expressam somente poucos Ag reconhecidos como não próprios, sendo, assim, pouco imunogênicos. A maioria dos tumores espontâneos não apresentam Ag tumorais específicos, apenas Ag associados ao tumor que estão presentes também nas células normais. Esses Ag são moléculas que têm sua expressão ou sua quantidade alterada nas células tumorais e induzem apenas uma fraca ou

indetectável resposta imune.(24,25)

Os tumores que induzem uma forte resposta imune são aqueles que expressam Ag tumorais específicos presentes nas células do tumor e ausentes nas células normais. Esses Ag podem resultar de mutações, deleções, translocações cromossômicas e inserções de genes virais ou são induzidos por potentes carcinógenos que envolvem proto-oncogenes celulares ou genes de supressão tumoral.(24,25)

Outra forma de escapar do sistema imune é através do rápido crescimento e disseminação tumoral, que podem superar a capacidade do sistema imune de erradicar o tumor, uma vez que seu controle requer a eliminação de todas as células malignas.(24,25)

Além disso, existem diversos mecanismos especializados através dos quais as células tumorais parecem escapar do sistema imune. Os descritos até o momento são a redução nas moléculas MHC de classe I, a modulação dos Ag tumorais, a falta de sinal co-estimulatório, a tolerância imunológica induzida por Ag tumorais e a inibição da resposta imune pelos produtos das células de câncer.(24,25)

A expressão das moléculas de MHC de classe I pode estar reduzida nas células tumorais, impossibilitando, assim, o reconhecimento das mesmas pelos LTc (24). Nas células de CaP, quando comparadas às células do tecido prostático normal, pode ocorrer uma perda total na expressão das moléculas de MHC de classe I em 30% dos CaP primários e em 80% das metástases linfáticas. Também se verificou uma redução na expressão dessas moléculas em 80% dos CaP primários e em 100% dos focos metastáticos.(26) Outro trabalho relatou redução ou perda completa na expressão das glicoproteínas do HLA de classe I em 90% dos

CaP primários.(27)

Em experimentos animais, o tratamento das células tumorais com citocinas, como IFN- $\alpha$ , ou a transferência de genes de citocinas aumentou a expressão das moléculas de MHC de classe I nas células tumorais, aumentando, desta forma, sua susceptibilidade à lise pelos LTc *in vitro* e diminuindo o crescimento tumoral *in vivo*.(24,25)

A modulação antigênica é o processo através do qual determinados Ag tumorais específicos desaparecem da superfície das células tumorais na presença do Ac sérico e, depois, reaparecem quando o Ac não está mais presente.(24)

Qualquer resposta imune que se desenvolva a um tumor de ocorrência espontânea deve ser induzida através das diferenças quantitativas na expressão dos Ag das células normais e tumorais.(24)

## 1.8 IMUNOTERAPIA TUMORAL

O uso da imunoterapia em câncer tem criado um grande interesse na comunidade científica nas últimas décadas. A principal razão é o fato de as terapias atuais para o câncer avançado, em geral, basearem-se em medicamentos que bloqueiam ou matam células em divisão celular. Essas terapias têm também efeitos graves sobre as células normais em divisão, causando significativa morbidade e mortalidade. As respostas imunes ao câncer podem ser específicas para Ag tumorais e apresentam baixa toxicidade para células normais.(24,25)

O sistema imune pode ser estimulado para destruir células tumorais

eficientemente e erradicar o tumor. Essa forma de agir sobre o sistema imune tem permitido o surgimento de novas modalidades de imunoterapia para o câncer.(24,25)

Existem dois tipos de imunoterapia tumoral: a passiva e a ativa. A imunoterapia passiva consiste na administração do componente ativo do sistema imune em pacientes com câncer. A imunoterapia ativa consiste em gerar um aumento da resposta imune antitumoral no próprio paciente.(24,25)

### 1.8.1 Imunoterapia passiva

A infusão de células *killer* ativadas por linfocinas (LAK) ou a infusão de linfócitos infiltrados no tumor ativados (TIL) são exemplos de imunoterapia passiva.(24,25)

Estudo em modelo animal de CaP com LAK associado a IL-2 mostrou alguns benefícios terapêuticos, incluindo a prevenção e a regressão de metástases pulmonares, e prolongamento da sobrevivência.(28) Nos ensaios clínicos controlados em pacientes com câncer avançado, os resultados foram desanimadores, tanto com TIL quanto com LAK.(29) Além disso, foram observados numerosos efeitos colaterais indesejáveis, que estavam associados à necessidade do uso de níveis elevados de IL-2. Entre esses efeitos, está a síndrome do extravasamento vascular, na qual células linfóides e o plasma extravasam dos vasos sanguíneos para os tecidos, podendo levar ao choque.(24,25,29)

A administração de Ac monoclonais específicos para uma ampla variedade de Ag associados a tumores é outro exemplo de imunoterapia passiva. Vêm sendo

utilizados clinicamente Ac conjugados com toxinas e com radionuclídeos.(30)

### 1.8.2 Imunoterapia ativa

A imunoterapia ativa para câncer envolve a vacinação de pacientes para produzir a ativação de linfócitos T específicos para tumor.(24)

Trabalhos realizados *in vitro* expondo linhas celulares de CaP a citocinas, como interferon- $\alpha$  e  $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ou IL-2, resultaram na redução de algumas propriedades associadas à progressão tumoral. Contudo, os efeitos variaram entre as diferentes linhas celulares e citocinas usadas.(31)

Diversos ensaios clínicos avaliaram o tratamento de CaP metastático com IFN. Nesses estudos, baixos índices de reação foram observados (0% a 5%), com efeitos adversos significativos que necessitaram de redução da dose de IFN.(29)

A administração subcutânea de GM-CSF em pacientes com CaP hormônio-refratário determinou declínios do PSA somente durante o tratamento. Todos os pacientes acabaram com a progressão clínica e laboratorial (PSA) da doença. A observação de que o GM-CSF sozinho pode modular a expressão do PSA é importante, pois muitas estratégias de vacinação o usam como tratamento adjuvante.(32)

A inoculação de organismos bacterianos vivos diretamente em tumores para induzir uma resposta antitumoral do hospedeiro foi descrita pela primeira vez por William B. Coley em 1893. Nos anos 1970, Morton e colaboradores observaram que a inoculação de organismos viáveis do bacilo Calmette-Guérin (BCG) no melanoma

cutâneo metastático resultava na regressão não só dos nódulos inoculados, como também dos nódulos vizinhos não inoculados. O tratamento resultava na ampliação da imunidade, com produção de títulos crescentes de Ac antimelanômicos. A biópsia das lesões melanômicas não inoculadas que tiveram regressão clínica demonstrou intensa infiltração linfocítica. Isso levantou à noção de que a resposta imune associada ao tumor pode ser obtida pela reação inflamatória não específica induzida pela injeção de BCG nos locais de um tumor estabelecido.(33)

Ensaio clínicos randomizados e prospectivos avaliaram o BCG isoladamente como tratamento adjuvante em melanoma. Infelizmente, não houve melhora da sobrevida. (34) No entanto, ensaios randomizados prospectivos confirmaram que a injeção intravesical é tratamento eficaz na prevenção de recorrências e progressão de tumores superficiais e no tratamento de carcinoma *in situ* de bexiga.(35,36) Modelos animais confirmaram que as atividades antitumorais do BCG intravesical são mediadas por células T.(33)

O BCG vem sendo investigado no tratamento do CaP há trinta anos. Em 1973, um primeiro trabalho mostrou que BCG é uma forma segura de imunomodulação.(37) Vantagens na sobrevida foram relatadas com o uso isolado do BCG em pacientes com doença metastática em 1982.(38) No entanto, estes resultados não foram confirmados posteriormente.(39)

A imunoterapia para câncer ultrapassou a era da imunoterapia inespecífica. Novos esforços têm se concentrado numa abordagem que use o tumor do próprio paciente para provocar uma resposta imune. Essa abordagem é conhecida como imunoterapia ativa específica.(29)

Além de sua aplicação como imunoterapia não específica para câncer, o BCG

também tem sido empregado como adjuvante imunológico para imunoterapia ativa específica em vacinas tumorais.(33)

O impulso para a imunoterapia ativa específica foi o desenvolvimento e a caracterização biológica de um modelo experimental que determinou os requisitos para uma imunoterapia efetiva para o tumor. Uma série de estudos experimentais em hepatocarcinoma demonstrou que BCG adicionado a células tumorais singênicas pode induzir a imunidade sistêmica e eliminar um volume limitado de carga tumoral disseminada. No entanto, isso só é possível quando a vacina é cuidadosamente controlada em relação a variáveis como número de células tumorais, relação entre organismos BCG-viáveis e células tumorais, viabilidade das células tumorais e regime de vacinação.(39,40,41,42,43,44)

O modelo experimental do hepatocarcinoma demonstrou que a imunoterapia específica ativa com vacina de células tumorais e BCG pode ser bem sucedida quando determinadas condições são cumpridas. As células tumorais na vacina devem ser singênicas, e no mínimo  $10^7$  células tumorais metabolicamente ativas devem estar presentes na vacina. A quantidade mínima de adjuvante são  $10^7$  organismos BCG-viáveis, e a máxima exigida é de não mais que  $10^8$ . O esquema de vacinação deve ser de no mínimo duas doses, em intervalos semanais, devendo somente as duas primeiras conter BCG. É fundamental a presença de linfonodos regionais drenando o sítio de vacinação intradérmica. Se os linfonodos forem removidos antes de 21 dias após a vacinação, a vacina não é efetiva.(39,40,41,42,43,44)

Além disso, verificou-se que o sucesso da terapia é inversamente proporcional ao número, ao tamanho e à localização das metástases presentes no momento do

tratamento. É pouco provável a eliminação de grandes cargas tumorais, mesmo com o melhor regime de vacinação.(39,40,41,42,43,44)

Em estudos clínicos com células tumorais autólogas irradiadas misturadas com BCG e inoculadas intradermicamente, verificou-se a indução de resposta imune tumor-específica nos linfonodos mais próximos da inoculação, chamados de linfonodos primovacinados. Essas células imunes manifestaram reatividade tumor-específica *in vitro* e regressão do tumor por transferência adotiva em um subgrupo de pacientes.(32)

Na literatura não há publicações sobre uso de uma vacina celular autóloga associada com BCG em pacientes com CaP. No entanto, vários ensaios clínicos avaliaram o uso de imunoterapia ativa específica com vacina celular autóloga associada com BCG em pacientes com melanoma, câncer de rim, de cólon e de reto.

Vários estudos foram realizados para avaliar a vacina celular autóloga com BCG no tratamento adjuvante do câncer de cólon e reto. Ensaio clínico fase II e III sugeriu diminuição da recorrência e aumento da sobrevida no grupo tratado em relação ao grupo controle.(45,46) Com base nesses achados, foi realizado um ensaio clínico randomizado fase III para avaliar essa vacina como tratamento adjuvante em pacientes com câncer de cólon em estágios II e III ressecado cirurgicamente. Não houve benefício clínico significativo com o tratamento. No entanto, os pacientes que receberam o tratamento e que tinham uma resposta de hipersensibilidade cutânea tardia maior ou igual a 5 mm apresentaram evidência de maior sobrevida e sobrevida livre de doença, apesar de a diferença não ter atingido significância estatística.(47) Ainda assim, outro ensaio clínico avaliou pacientes de

câncer de cólon em estágios II e III. Após um seguimento médio de 5,3 anos, verificou-se não haver benefício clínico significativo em pacientes com doença em estágio III. Em pacientes com doença em estágio II, verificou-se um maior período livre de recorrência ( $p=0,011$ ) e redução do risco de recorrência em 61%. Além disso, houve tendência para uma melhora da sobrevida.(22) Uma metanálise reafirmou benefícios clínicos do tratamento adjuvante em pacientes com câncer de cólon estágio II.(48)

Estudos com vacinas celulares autólogas e alogênicas associadas a BCG em pacientes com melanoma sugerem um possível benefício terapêutico; no entanto, faltam estudos randomizados para confirmar tal resposta terapêutica.(49,50,51,52)

Em ensaio clínico controlado, a aplicação de vacina celular autóloga associada a BCG em pacientes de carcinoma renal induziu um aumento da imunidade celular contra as células de câncer, mas não aumentou a sobrevida livre de doença nem aumentou a expectativa de vida.(53) Em estudo mais recente, a aplicação dessa vacina evidenciou sua boa tolerância, além de aumento da atividade antitumoral e da sobrevida em pacientes vacinados com doença local. Contudo, não se verificou resposta clínica em pacientes vacinados com doença residual local ou metastática quando do início do tratamento.(54)

Na imunoterapia do CaP, várias modalidades de tratamento estão sob investigação, entre as quais as vacinas celulares alogênicas, as vacinas celulares geneticamente modificadas, as vacinas com Ag associados ao CaP e as vacinas com células dendríticas.(29,32)

A maioria das vacinas autólogas para CaP são geneticamente modificadas. Há introdução de genes de citocina nas células tumorais, resultando em células de CaP

secretoras de citocinas recombinantes. Estudos testaram a vacina celular autóloga transfectada com o gene do GM-CSF no tratamento de CaP localmente avançado e metastático. Células de CaP autólogas foram coletadas e cultivadas a partir de espécimes de prostatectomia. Esses estudos mostraram uma resposta celular específica contra o tumor, mas nenhuma resposta clínica.(55,56)

A aplicação de uma vacina celular alogênica com o imunestimulante *Mycobacterium vaccae* em pacientes com CaP hormônio-refratário não obteve resposta clínica; no entanto, em muitos pacientes houve aumento da produção de citocinas, aumento de Ac específicos e evidências de proliferação de células T específicas.(57)

Descobertas de Ag de câncer têm permitido identificar alvos bem definidos para o ataque das células T. A presença de Ag específicos em neoplasias malignas espontâneas é rara e, até o momento, não foi identificado nenhum Ag específico para CaP. No entanto, vários antígenos associados ao CaP foram identificados, tais como PSA, antígeno próstatico específico de membrana (PSMA) e fosfatase ácida prostática. Além disso, pesquisas vêm revelando um número cada vez maior de Ag alvos para imunoterapia específica no CaP. Estudos realizados com alguns desses Ag evidenciaram respostas discretas ou inexistentes.(28,58,59)

Ensaio clínico fase I com células dendríticas pulsadas com PSMA mostrou nenhuma toxicidade. No ensaio clínico fase II, obteve-se resposta clínica em alguns pacientes, mas os resultados são questionáveis, visto que o estudo incluiu pacientes com doença estável como resposta ao tratamento.(32,59)

Várias outras vacinas também foram estudadas, como imunoterapia para CaP, mas as respostas clínicas, até o momento, são pobres.(29,32,58,59,60)

O uso de Ac conjugados a porções radioativas, radioimunoterapia, também tem sido objeto de pesquisa em pacientes com CaP hormônio-refratário. De um modo geral, além de essa terapia ainda não ter demonstrado benefício clínico significativo, há relatos de efeitos adversos, como mielossupressão e trombocitopenia.(61)

---

---

## **2 OBJETIVOS**

---

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Produzir uma vacina celular autóloga imunomodulada para câncer de próstata.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Correlacionar idade, estadiamento clínico, estadiamento patológico, escore de Gleason da biópsia, escore de Gleason da peça, PSA pré-operatório e método de coleta do material com a viabilidade em estabelecer cultura celular primária e, conseqüentemente, a vacina celular proposta.

Avaliar os vários passos envolvidos na preparação da referida vacina: a coleta do material, o processamento do material, o estabelecimento de culturas celulares primárias, a manutenção das culturas e a produção da vacina.

---

---

**3 ARTIGO - PRODUÇÃO DE VACINA CELULAR AUTÓLOGA  
IMUNOMODULADA PARA ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA**

---

---

### **3 ARTIGO - PRODUÇÃO DE VACINA CELULAR AUTÓLOGA IMUNOMODULADA PARA ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA**

#### **RESUMO**

**OBJETIVOS:** Coletar amostras de câncer de próstata para produzir células de câncer em cultura celular primária para serem usadas em vacina celular autóloga imunomodulada para adenocarcinoma de próstata.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Trinta e nove amostras, coletadas em 33 prostatectomias radicais retropúbicas (PRR), em 5 ressecções endoscópicas de próstata (RTUp) e em uma biópsia a seu aberto (Bx), foram processadas por dissociação mecânica, colocadas em meio de cultura RPMI-1640 associado a 10% de soro fetal bovino e antibióticos e colocadas em cultura a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As variáveis idade, PSA total, estágio clínico e patológico, escores de Gleason da biópsia e da peça cirúrgica foram correlacionadas com o sucesso ou não da cultura primária.

**RESULTADOS:** Nas coletas através de PRR, obteve-se sucesso de 78% para cultura celular primária e em 69% dos casos conseguiu-se elaborar a vacina. Neste grupo, as variáveis idade, PSA total, estágio clínico e patológico, escores de Gleason da biópsia e da peça cirúrgica não se correlacionaram independentemente com o sucesso ou não da cultura primária. A contaminação bacteriana ou fúngica impossibilitou a obtenção de cultura celular primária em 15,6% dos casos e impediu a produção da vacina em 25% dos casos. Nas coletas realizadas por RTUp e Bx não houve sucesso em estabelecer culturas celulares primárias e elaborar a vacina.

**CONCLUSÕES:** No grupo PRR, foi possível produzir vacina celular autóloga imunomodulada, mas não no grupo RTUp e Bx. A viabilidade da produção de cultura celular primária e vacina não mostrou associação com fatores clínicos e patológicos.

**Palavras-chave:** câncer de próstata, cultura celular primária, vacina celular autóloga, imunoterapia.

## INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é o câncer não cutâneo mais freqüente no sexo masculino no Brasil. É também a segunda causa de óbito por câncer no sexo masculino, superado apenas pelo câncer de pulmão.(1)

Atualmente, 80% dos casos de CaP são diagnosticados como doença clinicamente localizada e 20% já se apresentam com doença metastática.(2) O tratamento para doença clinicamente localizada através de prostatectomia radical, radioterapia e braquiterapia, geralmente, tem bons resultados. No entanto, 20% dos pacientes submetidos a prostatectomia radical desenvolvem metástases durante um acompanhamento médio de 5 anos.(3)

No momento, não há tratamento curativo para a doença metastática. Com bloqueio androgênico obtém-se resposta objetiva ou estabilização da doença em 80% dos doentes por um período de aproximadamente 20 meses. Após esse tempo, surgem clones celulares hormônio-refratários e não há mais tratamento eficaz. Nessa fase, o prognóstico é reservado e a sobrevida estimada é de 12 a 18 meses.(4)

A radioterapia é paliativa e a quimioterapia é ineficaz na doença hormônio-refratária.(4)

Novas estratégias de tratamento estão sendo investigadas, entre elas a imunoterapia, que se baseia na estimulação do sistema imune do próprio paciente para combater células de câncer. No CaP, vários tipos de imunoterapia estão em investigação, entre eles vacinas celulares autólogas, vacinas celulares geneticamente modificadas, vacinas celulares alogênicas, vacinas com antígenos

associados ao CaP e vacinas com células dendríticas. Para aumentar a antigenicidade dessas vacinas, várias substâncias, como o IFN e o BCG, e diferentes técnicas são usadas.(5,6,7,8,9)

O interferon- $\alpha$  apresenta diversas propriedades importantes para desencadear uma resposta imune. Seu efeito principal é aumentar a expressão de moléculas de MHC de tipo I e de tipo II. Além desse efeito, o IFN pode induzir a expressão de outros antígenos de superfície.(10) O câncer de próstata apresenta uma diminuição acentuada na expressão das moléculas de classe I.(11,12)

O BCG é usado há mais de 50 anos como imunoestimulador não específico. Além de suas propriedades como imunógeno poderoso, apresenta características bioquímicas que favorecem o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo celular. É incluído em diversos protocolos clínicos com células autólogas e mesmo em outras vacinas, contendo epítopos peptídicos ou carboidratos.(5,6,7,8,9)

Para desenvolver as vacinas celulares, é necessário o cultivo de células do câncer em meios de cultura. Para as vacinas alogênicas, são usadas as linhas celulares estabelecidas, geralmente desenvolvidas a partir de metástases de CaP. Como exemplos, há as linhas celulares hormônio-independentes denominadas DU-145 e PC-3 e a linha celular hormônio-dependente denominada LNCaP. (13,14,15,16) Para as vacinas celulares autólogas, fazem-se necessários a expansão e isolamento de células de CaP do próprio paciente em meio de cultura.(5,6,7)

As culturas de células coletadas de metástases crescem melhor, mas não apresentam a mesma composição genética e comportamento biológico das células do tumor primário.(17) As culturas celulares de CaP primário sobrevivem em cultura

por um período curto, e raramente é possível desenvolver espontaneamente linhas celulares estabelecidas.(13,18) O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma vacina celular autóloga com BCG e interferon para ser aplicada em pacientes selecionados com CaP.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este projeto integra um ensaio clínico fase I da vacina celular autóloga imunomodulada aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e patrocinado pela FK Biotecnologia S.A.

O método usado para dosagem do antígeno prostático específico (PSA) foi eletroquimioluminescência (Elecsys- Roche). Os valores de referência variam de 0,0 a 4,0 ng/ml. O estadiamento clínico e cirúrgico foi realizado pelo TNM 2002. Todos os pacientes autorizaram a coleta de material para cultura celular através da assinatura do termo de consentimento informado.

### **Amostras de Câncer de Próstata**

De dezembro de 2001 até maio de 2003, foram coletadas 39 amostras de câncer em pacientes com adenocarcinoma de próstata submetidos a prostatectomia radical, ressecção endoscópica de próstata ou biópsia a céu aberto. As amostras coletadas foram colocadas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, NY, USA) com 20% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina, estreptomicina e gentamicina), armazenadas a 4°C e transportadas para o laboratório de biologia tumoral da FK

Biotecnologia, de Porto Alegre. No laboratório, foram realizados o processamento do material, a cultura celular e a produção da vacina. Uma pequena fração de cada amostra coletada para cultura celular (biópsia da amostra) foi enviada para exame anatomopatológico.

### **Preparação das culturas**

As amostras para cultura celular foram reduzidas a pequenos fragmentos de 1 mm a 2 mm nas primeiras 24 horas, exceto quatro amostras obtidas por PRR que foram processadas 72 horas após a coleta. O material foi cultivado em meio RPMI-1640 (Gibco) contendo antibióticos (penicilina, estreptomicina e gentamicina) e 10% de soro fetal bovino. Os frascos de cultura celular são de plástico, específicos para cultura celular de células aderidas. A cultura celular foi mantida em estufa a 37°C com controle de CO<sub>2</sub> a 5%.

As culturas foram inspecionadas diariamente. A troca do meio de cultura foi realizado, inicialmente, semanalmente. Após, foi realizada conforme o crescimento celular. Sempre de forma asséptica, em câmara de fluxo laminado. O crescimento celular e a eventual presença de contaminação nos frascos de cultura foram observados em microscópio invertido com aumento de 400x. A quantificação das células foi realizada em câmara Neubauer (hemocitômetro de Neubauer). Quando o crescimento celular era adequado para preparar as sete doses da vacina, isto é  $7 \times 10^7$  células, foi adicionado às células interferon- $\alpha$ 2b (Blauferon B -Blaufigel) por 72 horas. As células foram retiradas do meio de cultura através da técnica de tripsina associada a soro fetal bovino ou através da espátula celular.

### **Preparação da vacina**

Todas as células foram irradiadas com uma dose letal de radiação de 200 Gy. Nas duas primeiras doses foram adicionadas, no mínimo,  $10^7$  células viáveis de BCG (Fundação Atauilpho de Paiva). Cada dose da vacina deve conter  $10^7$  células tumorais. Todas as vacinas foram criopreservadas para futuras injeções.

### **Análise Estatística**

Para comparar médias de amostras independentes, foi usado o teste t de Student. O teste de Mann-Witney foi utilizado para comparar variáveis quantitativas de distribuição assimétrica. Para variáveis categóricas, fez-se uso do teste de Qui-quadrado, ou do teste exato de Fischer, quando necessário. A comparação dos escores de Gleason da biópsia com seus correspondentes da peça foi realizada pelo teste Wilcoxon. O nível de significância adotado foi  $p \leq 0,05$ . Os dados foram analisados e processados no SPSS versão 10.

## **RESULTADOS**

No período de dezembro de 2001 a julho de 2003 foram coletadas 39 amostras de CaP. Entre os pacientes, 33 (85%) tinham o diagnóstico clínico de doença intraprostática e foram submetidos a prostatectomia radical retropúbica (PRR), 5 (12,5%) apresentavam doença metastática e obstrução urinária e foram submetidos a ressecção endoscópica da próstata (RTUp) e 1 (2,5%) tinha doença metastática e retenção urinária, e foi submetido a coleta por cirurgia aberta (Bx).

Para avaliar os resultados, a amostra foi dividida em dois grupos, *grupo PRR*, e *grupo RTUp e biópsia (Bx)*, grupos muito distintos em todos os aspectos (forma de coleta, estadiamento clínico e resultados).

No grupo PRR, a idade média foi 65 anos (43-77 anos) e o PSA total médio 17,5 ng/mL (10,0-52,5 ng/mL). No grupo RTUp e Bx, a idade média foi 70 anos (61-73 anos) e o PSA total médio 363 ng/mL.

O estadiamento clínico e patológico do grupo PRR pode ser visto na tabela 1. Verifica-se que a maioria dos pacientes (63,6%) é dos estágios clínicos T1cN0M0 e T2aN0M0 e que houve uma mudança significativa do estadiamento após a cirurgia, uma vez que 22 pacientes foram classificados num estágio superior ou igual a T3aN0M0.

**Tabela 1 – Estadiamento clínico e patológico dos pacientes submetidos a prostatectomia radical retropúbica (PRR)**

Estágio	cTNM	pTNM
	n = 33	n= 33
T0N0M0	0 (0)	1 (3)
T1cN0M0	14 (42,4)	0 (0)
T2aN0M0	7 (21,2)	6 (18,2)
T2bN0M0	2 (6,1)	0 (0)
T2cN0M0	10 (30,3)	4 (12,1)
T3aN0M0	0 (0)	13 (39,4)
T3bN0M0	0 (0)	5 (15,2)
T4aN0M0	0 (0)	1 (3,0)
T1-4N1M0	0 (0)	3 (9,1)

Os dados são apresentados como frequência: f (%). cTNM e pTNM: estadiamento clínico e patológico, respectivamente.

Todas as amostras coletadas foram submetidas de forma igualitária a todos os processos envolvidos na produção da cultura celular e na produção da vacina. Não foi identificada associação entre contaminação precoce e as variáveis avaliadas (tabela 2).

**Tabela 2 – Grupo PRR- associação da cultura celular primária com as variáveis clínicas**

Variável	Cultura primária estabelecida n = 25	Cultura primária não estabelecida n = 7	p
Idade (anos)	65,4 ± 7,2	65,7 ± 4,2	0,91
PSA total	17,5 ± 10,3	18,5 ± 6,5	0,82
Gleason b	7 (6 – 7)	6 (6 – 7)	0,32
Gleason p	7 (6 – 8)	7 (6 – 9)	0,32
cTNM > T1c	14 (56%)	5 (71%)	0,67
pTNM ≥ T3a	16 (64%)	6 (86%)	0,387

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão(dp), frequência: f (%) e mediana e amplitude interquartil (P25–P75); p: significância estatística; PSA total: antígeno prostático específico total pré-operatório; Gleason b e Gleason p: escores de Gleason da biópsia e escores de Gleason da peça, respectivamente; cTNM e pTNM: estadiamento TNM clínico e patológico, respectivamente.

No grupo PRR, um paciente não apresentou câncer nos exames anatomopatológicos da peça cirúrgica e da biópsia da amostra coletada para cultura celular, razão pela qual ele foi excluído da análise estatística. Além desse caso, o exame anatomopatológico da amostra coletada para cultura celular foi negativo para células de CaP em um caso pT3aN0M0.

A comparação dos escores de Gleason da peça e da biópsia demonstrou que eles são diferentes ( $p=0,04$ ) e que a biópsia, geralmente, subestima o escore de Gleason da peça.

A tabela 2 apresenta os resultados da associação realizada entre cultura celular primária e as variáveis idade, PSA total, estágio clínico, estágio cirúrgico, escore de Gleason da biópsia e da peça. Verificou-se que nenhuma das variáveis, isoladamente, teve associação com o sucesso em estabelecer cultura celular primária.

Na tabela 3 pode-se verificar o resultado da cultura celular no grupo PRR e no grupo RTUp e Bx. No grupo PRR, foi possível estabelecer cultura celular primária em 25 casos (78%), tendo sido produzida a vacina celular em 22 (69%). No grupo RTUp e Bx, não foi possível cultura celular primária nem vacina.

**Tabela 3 – Resultado da cultura celular primária nos grupos PRR e RTUp+Bx**

Cultura celular de CaP	PRR	RTUp +Bx
	n = 32	n = 6
Cultura primária estabelecida	25 (78,2)	0 (0)
Contaminação tardia	3 (9,4)	0 (0)
Vacina disponível	22 (68,8)	0 (0)
Cultura primária não estabelecida	7 (21,8)	6 (100)
Contaminação precoce	5 (15,6)	0 (0)
Fibroblastos	1 (3,1)	2 (33,3)
Ausência de crescimento	1 (3,1)	3 (50)
Linfócitos	0 (0)	1 (16,7)

Os dados são apresentados como freqüência: f (%). PRR: prostatactomia radical retropúbica; RTUp+Bx: ressecção endoscópica de próstata e biópsia.

## DISCUSSÃO

O conceito de usar vacinas para induzir imunidade específica contra o câncer tem sido ativamente investigado nas últimas décadas.(5-9)

Para o desenvolvimento de uma vacina celular autóloga para CaP, vários desafios devem ser vencidos: (a) as amostras coletadas devem incluir células de câncer; (b) as amostras devem ser coletadas e processadas de forma asséptica; (c) a cultura celular deve ser manipulada de forma asséptica; (d) células de câncer precisam crescer adequadamente no meio de cultura para que uma cultura celular primária se desenvolva; (e) no meio de cultura, não devem crescer células do tecido normal, como fibroblastos, células endoteliais, células do epitélio prostático e células linfáticas; e (f) o crescimento celular precisa ser adequado para produzir células suficientes para as sete doses da vacina.

As células tumorais autólogas parecem ser mais apropriadas do que células tumorais alogênicas como fonte de antígenos tumorais para uso na imunoterapia ativa específica, sendo, portanto, a cultura celular primária a forma mais adequada para a obtenção desses antígenos.(13,18,19) Uma das limitações dessa cultura é a incapacidade de obter crescimento de células de CaP em, aproximadamente, 30% dos casos.

Estudos realizados pelo Centro de Oncologia do Hospital Johns Hopkins em Baltimore (EUA) mostraram que foi possível estabelecer culturas celulares primárias a partir de amostras coletadas por PRR em 73% dos casos.(19) Outros trabalhos têm mostrado sucesso entre 32% e 86% dos casos.(20,21,22) No presente trabalho, conseguiu-se estabelecer cultura celular primária de CaP em 78% dos casos, e em 69% dos casos produzir a vacina, nas coletas através de PRR.

O escore de Gleason é um importante fator prognóstico, relacionando-se com o comportamento biológico do CaP e com a sobrevida dos pacientes. No entanto, o escore da biópsia é freqüentemente diferente do da peça cirúrgica.(4) Na amostra

PRR estudada, constatou-se que os escores de Gleason são significativamente diferentes e que o escore de Gleason da biópsia geralmente subestima o escore da peça cirúrgica. No entanto, deve-se lembrar que a amostra foi pequena e selecionada, somente com PSA acima de 10 ng/mL.

Estudos não demonstraram correlação do escore de Gleason com a capacidade do crescimento celular de CaP em cultura primária. Esses achados são diferentes dos achados de cultura celular primária de carcinoma de bexiga.(21) Na presente amostra coletada por PRR, as variáveis idade, estágio clínico, PSA total pré-operatório, estágio cirúrgico e escores de Gleason da biópsia e da peça não se correlacionaram, isoladamente, com o sucesso em estabelecer culturas primárias de CaP. No entanto, a amostra ainda é por demasiado pequena para conclusões definitivas a respeito. Os resultados sugerem que a metodologia usada para coleta, processamento e cultura da amostra de câncer é mais importante do que os fatores associados ao câncer.

A coleta adequada das células do câncer é o passo inicial para o sucesso da cultura celular. Para avaliar o processo de coleta da amostra de CaP, um pequeno fragmento de cada amostra foi encaminhado para exame anatomopatológico. Das 32 amostras coletadas por PRR, apenas em um caso o exame anatomopatológico foi negativo para células de câncer. Neste caso, não houve crescimento de células de câncer no meio de cultura. Este caso foi o de um paciente com CaP estágio T1c (PSA elevado e toque retal insuspeito) e próstata volumosa (70 g). Tais aspectos dificultaram a localização exata do câncer na peça cirúrgica.

O processamento do material é a etapa seguinte a ser avaliada. Utilizou-se o processo de fragmentação da amostra coletada. Na maioria dos trabalhos

publicados, foi utilizado o processo de fragmentação mecânica associado a degradação enzimática com colagenase.(21,22,23)

O processamento do material coletado por PRR obteve bons resultados, uma vez que as amostras que tinham células de câncer cresceram adequadamente em meio de cultura, exceto um caso em que houve sobrecrescimento de fibroblastos e os casos em que houve contaminação.

O efeito do tempo decorrido entre a coleta e o processamento do material sobre a viabilidade do tumor e a proliferação celular em meio de cultura tem sido investigado. Estudos recomendam o processamento do material no período de 24 horas. No entanto, alguns trabalhos verificaram que o índice de crescimento celular não se altera quando o processamento do material é realizado de 24 a 48 horas após a coleta.(20,21) As amostras de tumor do presente estudo foram processadas no período de 24 horas, exceto quatro amostras coletadas por PRR, que foram processadas 72 horas após a coleta. Nesses quatro casos, foi possível desenvolver cultura celular primária e a vacina em três casos. Esse fato corrobora os achados da literatura. Como os efeitos do processamento tardio do material sobre a composição genética e o comportamento biológico das células em cultura ainda não estão estabelecidos, recomenda-se que o processamento seja realizado nas primeiras 24 horas.

A contaminação das amostras de câncer no processo de coleta e processamento do material foi um problema importante que precisou ser superado no início do presente trabalho. Das 33 amostras coletadas por PRR, 5 (15,2%) foram contaminadas no processamento inicial. Destas, as quatro primeiras contaminações foram exatamente as quatro primeiras coletas realizadas, que foram feitas

juntamente com um patologista. O objetivo era fazer a coleta do material com alguém que já tivesse alguma experiência na localização do tumor na peça. Havia a preocupação de coletar o material sem alterar muito a anatomia e facilitar o exame anatomopatológico da peça. Tais dados permitem concluir que, das últimas 29 coletas realizadas, houve apenas 1 (3,5%) caso de contaminação precoce. Recomenda-se que a coleta do material seja efetuada pela equipe cirúrgica, o que pode ajudar a minimizar a contaminação das culturas celulares.

A única amostra coletada por Bx tinha células de CaP, mas não houve crescimento de células de câncer na cultura celular. Observou-se, nesse caso, crescimento de linfócitos.

No grupo RTUp, em dois dos cinco casos não se constatou câncer nos exames anatomopatológicos dos fragmentos e da biópsia da amostra enviados para cultura celular. A coleta nestes casos foi inadequada. Nos outros três casos, apesar da coleta ter sido adequada, não foi possível estabelecer uma cultura celular primária: houve crescimento de células de CaP inicialmente, que foi seguido de morte celular após sete a dez dias. Vários são os possíveis fatores responsáveis por esse fato.

A RTUp com corrente elétrica pode fornecer grande quantidade de material para cultura celular. No entanto, esse procedimento pode limitar a cultura celular. A corrente elétrica pode danificar os fragmentos ressecados em toda sua extensão, impossibilitando a cultura celular. Além disso, a maioria dos fragmentos ressecados pode conter somente estroma fibromuscular e ou tecido de hiperplasia benigna, que coexistem com o câncer.(24)

A RTUp é realizada usando-se sistema de irrigação contínua com soluções não-iônicas ou água destilada. O uso de soluções não-iônicas que apresentam

osmolaridade próxima à do plasma, como glicose a 4%, glicina a 1,5%, sorbitol a 2,7% e manitol a 0,5%, pode ter efeitos menos deletérios sobre os fragmentos ressecados do que a água destilada.(23,24)

As dificuldades encontradas na coleta do material através de RTUp podem ser superadas realizando a ressecção com intensidade de corrente a mais baixa possível, corrente de corte puro e com menor tempo de contato possível, minimizando, assim, os danos sobre os fragmentos.(23,24) O tecido danificado que fica no fragmento pode ser removido no laboratório no momento do processamento do material.(24) Além disso, a maioria dos trabalhos preconiza o uso da solução de glicina a 1,5%.(23,24,25) O uso de eletrocoagulação bipolar, provavelmente, poderá minimizar ainda mais os efeitos deletérios sobre os fragmentos de câncer ressecados.

No presente estudo, coletou-se material por RTUp usando intensidade de corrente elétrica usual e água destilada como solução de irrigação. Esses devem ser os motivos principais por que não se conseguiu estabelecer cultura celular em três amostras de câncer coletadas. Sugere-se, assim, avaliar novos casos dentro desses padrões de coleta.

## CONCLUSÕES

É factível a produção de uma vacina celular autóloga imunomodulada em pacientes com CaP que são submetidos a PRR em nosso meio.

A coleta de material através de RTUp e Bx não permitiu, até o momento, desenvolver uma vacina celular nos moldes propostos por este trabalho. Alterações

na coleta e processamento do material fazem-se necessárias para viabilizar uma vacina nesses pacientes.

Na amostra PRR, as variáveis estágio clínico, PSA pré-operatório, estágio patológico e escores de Gleason da biópsia e da peça cirúrgica não se correlacionaram, isoladamente, com a efetividade de se estabelecer cultura celular primária e desenvolver a vacina celular de CaP. Portanto, essa viabilidade relaciona-se mais com as técnicas de coleta, processamento do material, meios de cultura usados e a adequada manipulação dos meios de cultura no laboratório de cultura celular, do que com aquelas variáveis. No entanto, a amostra ainda é pequena para afirmações definitivas a esse respeito.

Há evidências de que o processamento do material no período das primeiras 72 horas não altera o crescimento celular e a viabilidade de se desenvolver a vacina celular; no entanto, recomenda-se o processamento nas primeiras 24 horas.

A coleta do material deve ser realizada pela equipe cirúrgica, para minimizar os riscos de contaminação.

## REFERÊNCIAS

1. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. [Sem data] Câncer de próstata, 2003. [Online] [Acesso em outubro de 2003]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/cancer/prostata>.
2. Jacobsen SJ, Katusic SK, Bergstralh EJ, Oesterling JE, Ohrt D, Klee GG, et al. Incidence of prostate cancer diagnosis in the eras before and after serum prostate-specific antigen testing. *Jama* 1995 Nov;274(8):1445-9.
3. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999 May;281(17):1591-7.
4. Sociedade Brasileira de Urologia (SBU). Tumores prostáticos: I Consenso Brasileiro. São Paulo (SP): Ed. BG Cultural; 1998.
5. Tjoa BA, Murphy GP. Progress in active specific immunotherapy of prostate cancer. *Semin Surg Oncol* 2000 Jan-Feb;18(1):80-7.
6. Rini BI, Small EJ. Immunotherapy for prostate cancer [Review]. *Curr Oncol Rep* 2001; 3(5):418-23.
7. Perry MJ, Hrouda D, Dalgleish AG. Prospects for vaccination in prostate cancer. *Drugs Aging* 2000 May;16(5):321-7.
8. Slovin SF. Vaccines as treatment strategies for relapsed prostate cancer: approaches for induction of immunity. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001 Jun;15(3):477-96.

9. Palapattu GS, Naitoh J, Belldegrun AS. Gene therapy for prostate cancer: new perspectives on an old problem. *Urol Clin North Am* 1999 May;26(2):353-63.
10. Gastl G, Edbert T, Finstad CL, Sheinfeld J, Gomarhr A, Aulitzky W, et al. Major histocompatibility complex class I and II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma. *J Urol* 1996 Jan;155(1):361-7.
11. Blades RA, Keating PJ, McWilliam LJ, George NJR, Stern PL. Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implications for immunotherapy. *Urology* 1995; 46(5):681-7.
12. Lu QL, Abel P, Mitchell S, Foster C, Lalani EN. Decreased HLA-A expression in prostate cancer is associated with normal allele dosage in the majority of cases. *J Pathol* 2000;190(2):169-76.
13. Webber MM. In vitro models for prostatic cancer: summary. *Prog Clin Biol Res* 1980;37:133-47.
14. Kaign ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 1979 Jul;17(1):16-23.
15. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 1978 Mar; 21(3):274-81.
16. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983 Apr;43(4):1809-18.

17. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Liss (NY): John Wiley & Sons, publishers; 1990.
18. Schwab TS, Stewart T, Lehr J, Pienta KJ, Rhim JS, Macoska JA. Phenotypic characterization of immortalized normal and primary tumor-derived human prostate epithelial cell cultures. *Prostate* 2000;44(2):164-71.
19. Simons JW, Milkhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, et al. Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res* 1999 Oct;59:5160-8.
20. Dillmann RO, Nayak SK, Beutel L. Establishing in vitro cultures of autologous tumor cells for use in active specific immunotherapy. *J Immunother* 1993 Jul;14(1):65-9.
21. Wientjes MG, Pretlow TG, Badalament RA, Burgers JK, Au JLS. Histocultures of human prostate tissues for pharmacologic evaluation. *J Urol* 1995 Apr;153(4):1299-302.
22. Szücs S, Zitzelsberger H, Breul J, Bauchinger M, Höfler H. Two-phase short-term culture method for cytogenetic investigations from human prostate carcinoma. *Prostate* 1994;25(5):225-35.
23. Martin FL, Cole KJ, Muir GH, Kooiman GG, Williams JA, Sherwood RA, et al. Primary cultures of prostate cells and their ability to active carcinogens. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002;5(2):96-104.

- 
24. Clarke SM, Merchant DJ. Primary cultures of human prostatic epithelial cells from transurethral resection specimens. *Prostate* 1980;1(1):87-94.
  25. König JJ, Teubel W, Kamst E, Romijn JC, Schröder FH, Hagemeyer A. Cytogenetic analysis of 39 prostate carcinomas and evaluation of short term tissue culture techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;101(2):116-22.

---

---

**4 PAPER – PRODUCTION OF IMMUNOMODULATED  
AUTOLOGOUS CELL VACCINE FOR PROSTATE  
ADENOCARCINOMA**

---

---

## **4 PAPER - PRODUCTION OF IMMUNOMODULATED AUTOLOGOUS CELL VACCINE FOR PROSTATE ADENOCARCINOMA**

### **ABSTRACT**

**OBJECTIVES:** Collecting prostate cancer samples to produce cancer cells in primary cell culture to be used in an immunomodulated autologous cell vaccine for prostate adenocarcinoma.

**MATERIALS AND METHODS:** Thirty nine samples collected in 33 radical retropubic prostatectomies (RRP) and in 5 transurethral resections of the prostate (TURP) and one open biopsy (Bx) were processed by mechanical separation, placed in RPMI-1640 culture medium with 10% bovine fetal serum and antibiotics and placed in culture at 37°C and 5% of CO<sub>2</sub>. The variables age, total PSA, clinical and pathological stage, Gleason scores of the biopsy and the surgical specimen were correlated either with the success or failure of the primary culture.

**RESULTS:** The success rate of the primary cell culture was 78% in the samples collected by RRP and in 69% of the cases a vaccine could be produced. In this group, the variables age, total PSA, clinical and pathological stage, Gleason scores of the biopsy and the surgical specimen were not correlated either with the success or failure of the primary culture. Bacterial and fungal contamination prevented a successful primary cell culture in 15.6% of the cases and prevented vaccine production in 25% of the cases. No primary cell cultures could be established and no vaccine produced in samples collected either by TURP or Bx.

**CONCLUSIONS:** An immunomodulated autologous cell vaccine could be produced in the RRP group, which was not achieved in the TURP and BX group. The feasibility of producing a primary cell culture and vaccine is not linked to either clinical or pathological factors.

**Key words:** prostate cancer, primary cell culture, autologous cell vaccine, immunotherapy

## INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the most frequent non-cutaneous cancer in males in Brazil. Additionally, it is the second cause of death by cancer in males, being second only to lung cancer. (1)

Currently, 80% of the PCa cases are diagnosed with clinically localized disease and 20% present as metastatic disease (2). The treatment of the clinically localized disease by radical prostatectomy, radiation therapy and brachytherapy usually has good results. However, 20% of the patients that undergo radical prostatectomy develop metastases during an average follow-up of 5 years (3)

Currently, there is no curative treatment for metastatic disease. An objective response or disease stabilization can be achieved with androgenic blockade in 80% of the patients for around 20 months. After this time, hormone-refractory cell clones emerge and no other treatment is effective. In this phase, prognosis is poor and estimated survival is 12 to 18 months. (4)

Radiation therapy is palliative and chemotherapy is ineffective in hormone-refractory disease.(4)

New treatment strategies are being investigated, among them immunotherapy, which is based on the stimulation of the immune system of the patient to fight cancer cells. In PCa, several types of immunotherapy are currently being investigated, among them autologous cell vaccines, genetically modified cell vaccines, allogenic cell vaccines, vaccines with antigens associated with PCa and dendritic cell vaccines. In order to increase the antigenicity of these vaccines, several substances such as IFN and BCG and different techniques are being used. (5,6,7,8,9)

Interferon- $\alpha$  has several important properties to trigger an immune response. Its main effect is to increase type I and type II MHC cell expression. In addition to this effect, IFN can induce the expression of other surface antigens. (10) Prostate cancer presents with a marked decrease in the expression of class I molecules.(11,12)

BCG has been used for over 50 years as a non-specific immunostimulator. In addition to its properties as a powerful immunogen, it has biochemical characteristics that favor the development of a cell-like immune response. It has been included in many clinical protocols with autologous cells and even in other vaccines containing peptidic epitopes or carbohydrates.(5,6,7,8,9)

In order to develop cell vaccines, it is necessary to grow cancer cells in culture media. Established cell lines are used for allogenic vaccines, usually developed from PCa metastases. As examples, there are hormone-independent cell lines called DU-145 and PC-3 and the hormone-dependent cell line called LNCap. (13,14,15,16) For the autologous cell vaccines, PCa cells from the patient have to be expanded and isolated in culture medium.(5,6,7)

Cultures with cells collected from metastases grow better, but do not have the same genetic makeup and biological behavior of primary tumor cells. (17) Cell cultures from primary PCa survive in culture for a short time and it is rarely possible to spontaneously develop established cell lines. (13, 18) The objective of this study was to develop an autologous cell vaccine with BCG and interferon to be used in selected PCa patients.

---

## **MATERIAL AND METHODS**

This project included a phase I clinical trial of the immunomodulated autologous cell vaccine approved by the Ethics Commission of the Clínicas Hospital in Porto Alegre and sponsored by FK Biotecnologia S.A.

The method used to determine PSA levels was electrochemi-luminescence (Elecsys - Roche). Reference values varied from 0.0 to 4.0 ng/ml. Clinical and surgical staging was performed according to TNM 2002. All patients authorized the collection of material for cell culture by signing an informed consent.

### **Prostate Cancer Samples**

From December 2001 to May 2003, 39 cancer samples were collected in patients with prostate adenocarcinoma who underwent radical prostatectomy, transurethral resection or open biopsy. The collected samples were placed in a RPMI-1640 culture medium (Gibco, NY, USA) with 20% bovine fetal serum and antibiotics (penicillin, streptomycin and gentamycin), stored at 4° C and transported to the tumor biology laboratory at FK Biotecnologia in Porto Alegre. In the laboratory, material processing, cell culture and vaccine production were carried out. A small fraction of each sample collected for cell culture (fragment biopsy) was submitted for anatomic pathological examination.

### **Culture preparation**

The samples for cell culture were reduced to small 1 mm to 2 mm fragments

within the first 24 hours, except for the four samples collected by RRP, which were processed 72 hours after collection. The material was grown in RPMI-1640 medium (Gibco), containing antibiotics (penicillin, streptomycin and gentamycin) and 10% fetal bovine serum. Cell culture flasks made of plastic, specific for cell adhesion culture were used. The cell cultures were kept in a stove at 37% with CO<sub>2</sub> levels kept at 5%.

Cultures were checked daily. The culture medium was changed, at first, weekly. Afterwards, this was done according to cell growth. The change was always aseptically made in a laminar flow chamber. Cell growth and the presence of contamination in the culture flasks were analyzed by a 400x magnification reverse microscope. Cell count was made in a Neubauer chamber (Neubauer hemocytometer). When cell growth was adequate to prepare the seven doses of the vaccine, i.e.,  $7 \times 10^7$  cells, interferon- $\alpha$ 2b (Blauferon B -Blaufiegel) was added to the cells for 72 hours. Cells were removed from the culture medium by the trypsin technique in conjunction with fetal bovine serum or by cell spatula.

### **Vaccine preparation**

All cells were irradiated with a lethal radiation dose of 200 Gy. In the first doses at least  $10^7$  feasible BCG cells (Fundação Ataulpho de Paiva) were added. Every vaccine dose should contain  $10^7$  tumor cells. All vaccines were cryopreserved for future injections.

## Statistical Analysis

In order to compare the averages of independent samples, Student's t-Test was used. The Mann-Witney test was used to compare quantitative variables of asymmetric distribution. For the categorical variables, the Chi-square test or the exact Fisher test, when necessary, were used. The comparison of the biopsy Gleason scores with those found in the specimen was performed using the Wilcoxon test. The significance level adopted was  $p \leq 0,05$ . Data were analyzed and processed in SPSS version 10.

## RESULTS

From December 2001 to May 2003, 39 cancer samples were collected. Thirty-three (85%) out of the 39 patients had clinical diagnosis of intraprostatic disease and underwent radical retropubic prostatectomy (RRP), five (12.5%) presented with metastatic disease and urinary obstruction and underwent transurethral resection of the prostate (TURP) and one patient (2.5%) had metastatic disease and urinary retention and was subjected to sample collection by open surgery (Bx).

In order to assess results, the sample was divided into two groups, the *RRP group* and the *TURP and biopsy (Bx) group*, groups that are very different in all aspects (collection mode, clinical staging and results).

In the RRP group, average age was 65 years (43-77 years) and total average PSA was 17.5 ng/mL (10.0-52.5 ng/mL). In the TURP and Bx group, average age was 70 years (61-73) and total average PSA was 363 ng/mL.

Clinical and pathological staging of the RRP group is shown in table 1. As can be seen, most patients (63.6%) are in clinical stages T1cNxM0 and T2aNxM0 and there was a significant change in staging after surgery, since 22 patients were classified in a stage equal to or greater than T3aN0M0.

**Table 1 – Clinical and pathological staging of patients who underwent retropubic radical prostatectomy (PRR)**

Stage	cTNM n = 33	pTNM n= 33
T0N0M0	0 (0)	1 (3)
T1cN0M0	14 (42.4)	0 (0)
T2aN0M0	7 (21.2)	6 (18.2)
T2bN0M0	2 (6.1)	0 (0)
T2cNxM0	10 (30.3)	4 (12.1)
T3aN0M0	0 (0)	13 (39.4)
T3bN0M0	0 (0)	5 (15.2)
T4aN0M0	0 (0)	1 (3.0)
T1-4N1M0	0 (0)	3 (9.1)

Data are presented as frequency: f (%). cTNM and pTNM: clinical and pathological staging, respectively.

All collected samples were equally subjected to all processes involved in cell culture production and vaccine production. No relationship was found between early contamination and the assessed variables (table 2).

**Table 2 – RRP Group- relationship between primary cell culture and clinical variables**

<b>Variable</b>	<b>Established primary culture n = 25</b>	<b>Primary culture not established n = 7</b>	<b>p</b>
Age (years)	65.4 ± 7.2	65.7 ± 4.2	0.91
Total PSA	17.5 ± 10.3	18.5 ± 6.5	0.82
Gleason b	7 (6 – 7)	6 (6 – 7)	0.32
Gleason p	7 (6 – 8)	7 (6 – 9)	0.32
cTNM > T1c	14 (56%)	5 (71%)	0.67
pPTNM ≥ T3a	16 (64%)	6 (86%)	0.387

Data are presented as average ± standard deviation (sd), frequency: f (%) and interquartile median and range (P25–P75); p: statistical significance; PSA: preoperative total prostate specific antigen; Gleason b and Gleason p: Gleason scores of the biopsy and Gleason scores of the specimen, respectively; cTNM and pTNM: clinical and pathological TNM staging, respectively.

In the RRP group, one patient did not show the presence of cancer either in the anatomic pathological examinations of the surgical specimen or in the sample biopsy collected for cell culture, being therefore removed from the statistical analysis. In addition to this case, the anatomic pathological examination of the sample collected for cell culture was negative for PCa cells in one pT3aN0M0 case.

The comparison of the Gleason scores of the specimen and the biopsy showed that they are different ( $p=0.04$ ) and that the biopsy usually underestimated the Gleason score of the specimen.

Table 2 shows the results of the relationship between primary cell culture and the variables age, total PSA, clinical stage, surgical stage, Gleason score of the biopsy and the specimen. None of the variables alone was found to be related to the success in establishing a primary cell culture.

Table 3 shows the result of the cell culture in the RRP group and in the TURP and Bx group. In the RRP group, the primary cell culture could be established in 25 cases (78%), with cell vaccine being produced in 22 (69%). In the TURP and Bx group, neither a primary cell culture, nor vaccine could be produced.

**Table 3 – Result of the primary cell culture in the RRP and TURP+Bx groups**

PCa cell culture	RRP n = 32	TURP +Bx n = 6
Established primary culture	25 (78.2)	0 (0)
Late contamination	3 (9.4)	0 (0)
Vaccine available	22 (68.8)	0 (0)
Primary culture not established	7 (21.8)	6 (100)
Early contamination	5 (15.6)	0 (0)
Fibroblast	1 (3.1)	2 (33.3)
Absence of growth	1 (3.1)	3 (50)
Lymphocytes	0 (0)	1 (16.7)

Data are presented as frequency: f (%). RRP: radical retropubic prostatectomy; TURP+Bx: transurethral resection of the prostate and biopsy.

## DISCUSSION

The concept of using vaccines to induce specific immunity against cancer has been actively investigated in the last decades.(5-9)

Several challenges have to be overcome to develop an autologous cell vaccine for PCa: (a) collected samples should contain cancer cells, (b) samples should be aseptically collected and processed; (c) cell culture has to be aseptically handled; (d) cancer cells have to grow properly in the culture medium for a primary cell culture to develop; (e) no normal tissue cells should grow in the culture medium, like

fibroblasts, endothelial cells, cells from the prostate epithelium and lymphatic cells; and (f) cell growth should be adequate to produce enough cells for the seven vaccine doses.

Autologous tumor cells seem to be more appropriate than allogenic tumor cells as a source of tumor antigens to be used in specific active immunotherapy and therefore the most adequate way of obtaining these antigens is the primary cell culture.(13,18,19) One of the limitations of this culture is the inability to achieve PCa cell growth in approximately 30% of the cases.

Studies performed at the Oncology Center of the John Hopkins Hospital in Baltimore (USA) have shown that it was possible to establish primary cell cultures from samples collected by RRP in 73% of the cases. (19) Other studies have shown a success rate varying between 32% and 86%. (20,21,22) In this study, a PCa primary cell culture could be established in 78% of the cases and in 69% of the cases the vaccine could be produced with material collected by RRP.

The Gleason score is an important prognosis factor, being related to the biological behavior of the PCa and to patients' survival. However, the biopsy score is frequently different from the score found in the surgical specimen. (4) In the studied sample, Gleason scores were found to be significantly different and the Gleason score of the biopsy usually underestimates the surgical specimen score. However, it should be pointed out that the sample was small and selected, only with PSA above 10 ng/mL.

Studies have not shown any correlation between the Gleason score and the ability to achieve PCa cell growth in primary culture. These findings are different from the primary cell culture findings for bladder carcinoma (21). In this sample collected

by RRP, the variables age, clinical stage, total pre-operative PSA, surgical stage and Gleason scores of the biopsy and the surgical specimen alone are not correlated with the success in establishing PCa primary cell cultures. However, the sample is still too small to come to definite conclusions. Results suggest that the methods used for collection, processing and culture of the cancer sample are more important than the factors associated with the cancer.

Proper cancer cell collection is the initial step for a successful cell culture. In order to assess the process of PCa sample collection, a small fragment of every sample was submitted for anatomic pathological examination. Out of the 32 samples collected by RRP, only one was negative for cancer cells at the anatomic pathological examination. In this case, there was no growth of cancer cells in the culture medium. This case was of a patient with PCa stage T1c (high PSA and unsuspected digital rectal examination) and bulky prostate (70 g). These factors made it difficult to accurately locate the cancer site in the surgical specimen.

Material processing is the next step to be assessed. The process used was the fragmentation of the collected sample. In most studies published in the literature, the mechanical fragmentation process was used in conjunction with enzymatic degradation with collagenase. (21,22,23)

Good results were achieved with the processing of the material collected by RRP, since samples that contained cancer cells grew properly in the culture medium, except for one case with overgrowth of fibroblasts and the cases where there was contamination.

The effect of the time between sample collection and processing on the feasibility of the tumor and cell proliferation in culture medium has been investigated.

Studies recommend processing of the material within 24 hours. However, some studies found that there is no change in cell growth rate when the material is processed between 24 and 48 hours after collection. (20, 21). Tumor samples in this study were processed within 24 hours, except for four RRP samples, which were processed 72 hours after collection. A primary cell culture and vaccine could be obtained in three out of these four cases. This fact confirms literature findings. As the effects of the late sample material processing on genetic makeup and the biological behavior of culture cells have not been established yet, it is recommended to carry out processing within the first 24 hours.

Contamination of cancer samples in the process of collecting and processing the material was a significant problem that had to be overcome in the beginning of this study. Out of the 33 samples collected by RRP, 5 (15.2%) were contaminated in initial processing. Out of those, the first four contaminations were precisely the first four collections that were performed together with a pathologist. The goal was to collect the material with someone who already had some experience in locating the tumor in the specimen. The concern was to collect the material without changing the anatomy too much and facilitate the anatomic pathological examination of the specimen. These data enable to conclude that out of the last 29 collections performed, in only one (3.5%) there was initial contamination. It is recommended that the material collection is performed by the surgical team, which may help minimize contamination of cell cultures.

The only sample collected by Bx had PCa cells, but there was no growth of cancer cells in the cell culture. In this case there was growth of lymphocytes.

In the TURP group, in two out of the five cases no cancer was found in the

anatomic pathological examinations of the fragments and the biopsy of the sample submitted to cell culture. Collection in these cases was inadequate. In the other rare cases, a primary cell culture could not be established: initially there was PCa cell growth, which was followed by cell death after seven to ten days. There are several factors that could account for this fact.

TURP with electric current can supply a large amount of material for cell culture. However, this procedure can limit cell culture. The electric current can damage resected fragments, preventing cell culture. Additionally, most resected fragments may contain some fibromuscular stroma and/or benign hyperplasia tissue, conditions that coexist with cancer.(24)

TURP é performed using a continuous irrigation system with non-ionic solutions or distilled water. The use of non-ionic solutions with osmolarity close to serum, like glucose at 4%, glycine at 1.5%, sorbitol at 2.7% and manitol at 0.5% can have less deleterious effects on resected fragments than distilled water. (23,24)

The difficulties found in collecting material with TURP can be overcome by making the resection with the lowest possible current intensity and for the shortest contact time possible, thus minimizing damage to the fragments.(23,24) The damaged tissue that remain in the fragment can be removed in the laboratory when the material is processed. (24) Additionally, most studies recommend the use of the glycine solution at 1.5%. (23,24,25). The use of bipolar electrocoagulation could probably further minimize the deleterious effects on the resected cancer fragments.

In this study, material was collected by TURP using the usual electric current intensity and distilled water as irrigation solution. These are probably the main reasons that account for the failure in establishing a cell culture in three collected

cancer samples. Therefore, the suggestion is to assess new cases following these collection standards.

## **CONCLUSIONS**

An immunomodulated autologous cell vaccine can be produced for PCa patients that undergo RRP in our setting.

Material collection by TURP and Bx did not enable yet to develop a cell vaccine according to the procedures proposed in this study. Changes in material collection and processing are required to enable the production of a vaccine for these patients.

In the RRP sample, the variables clinical stage, preoperative PSA, pathological stage and Gleason scores of the biopsy and the surgical specimen alone had no correlation with the success in establishing a primary cell culture and in developing the PCa cell vaccine. Therefore, this feasibility is more related to the collection techniques, material processing, culture media used and the proper handling of the culture media in the cell culture laboratory than to the above mentioned variables. However, the sample is still small to make definite statements regarding this issue.

There is evidence that the processing of the material within the first 72 hours does not change either cell growth or the feasibility to develop the cell vaccine; however, the recommendation is to perform processing within the first 24 hours.

Material collection should be performed by the surgical team in order to minimize contamination risks.

---

**BIBLIOGRAPHY**

1. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. [Sem data] Câncer de próstata, 2003. [Online] [Acesso em outubro de 2003]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/cancer/prostata>.
2. Jacobsen SJ, Katusic SK, Bergstralh EJ, Oesterling JE, Ohrt D, Klee GG, et al. Incidence of prostate cancer diagnosis in the eras before and after serum prostate-specific antigen testing. *Jama* 1995 Nov;274(8):1445-9.
3. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999 May;281(17):1591-7.
4. Sociedade Brasileira de Urologia (SBU). Tumores prostáticos: I Consenso Brasileiro. São Paulo (SP): Ed. BG Cultural; 1998.
5. Tjoa BA, Murphy GP. Progress in active specific immunotherapy of prostate cancer. *Semin Surg Oncol* 2000 Jan-Feb;18(1):80-7.
6. Rini BI, Small EJ. Immunotherapy for prostate cancer [Review]. *Curr Oncol Rep* 2001; 3(5):418-23.
7. Perry MJ, Hrouda D, Dalglish AG. Prospects for vaccination in prostate cancer. *Drugs Aging* 2000 May;16(5):321-7.
8. Slovin SF. Vaccines as treatment strategies for relapsed prostate cancer: approaches for induction of immunity. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001 Jun;15(3):477-96.

9. Palapattu GS, Naitoh J, Belldegrun AS. Gene therapy for prostate cancer: new perspectives on an old problem. *Urol Clin North Am* 1999 May;26(2):353-63.
10. Gastl G, Edbert T, Finstad CL, Sheinfeld J, Gomarhr A, Aulitzky W, et al. Major histocompatibility complex class I and II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma. *J Urol* 1996 Jan;155(1):361-7.
11. Blades RA, Keating PJ, McWilliam LJ, George NJR, Stern PL. Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implications for immunotherapy. *Urology* 1995; 46(5):681-7.
12. Lu QL, Abel P, Mitchell S, Foster C, Lalani EN. Decreased HLA-A expression in prostate cancer is associated with normal allele dosage in the majority of cases. *J Pathol* 2000;190(2):169-76.
13. Webber MM. In vitro models for prostatic cancer: summary. *Prog Clin Biol Res* 1980;37:133-47.
14. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 1979 Jul;17(1):16-23.
15. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 1978 Mar; 21(3):274-81.
16. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983 Apr;43(4):1809-18.

17. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Liss (NY): John Wiley & Sons, publishers; 1990.
18. Schwab TS, Stewart T, Lehr J, Pienta KJ, Rhim JS, Macoska JA. Phenotypic characterization of immortalized normal and primary tumor-derived human prostate epithelial cell cultures. *Prostate* 2000;44(2):164-71.
19. Simons JW, Milkhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, et al. Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res* 1999 Oct;59:5160-8.
20. Dillmann RO, Nayak SK, Beutel L. Establishing in vitro cultures of autologous tumor cells for use in active specific immunotherapy. *J Immunother* 1993 Jul;14(1):65-9.
21. Wientjes MG, Pretlow TG, Badalament RA, Burgers JK, Au JLS. Histocultures of human prostate tissues for pharmacologic evaluation. *J Urol* 1995 Apr;153(4):1299-302.
22. Szücs S, Zitzelsberger H, Breul J, Bauchinger M, Höfler H. Two-phase short-term culture method for cytogenetic investigations from human prostate carcinoma. *Prostate* 1994;25(5):225-35.
23. Martin FL, Cole KJ, Muir GH, Kooiman GG, Williams JA, Sherwood RA, et al. Primary cultures of prostate cells and their ability to active carcinogens. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002;5(2):96-104.

- 
24. Clarke SM, Merchant DJ. Primary cultures of human prostatic epithelial cells from transurethral resection specimens. *Prostate* 1980;1(1):87-94.
  25. König JJ, Teubel W, Kamst E, Romijn JC, Schröder FH, Hagemeyer A. Cytogenetic analysis of 39 prostate carcinomas and evaluation of short term tissue culture techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;101(2):116-22.

---

---

## **5 BIBLIOGRAFIA DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

---

## 5 BIBLIOGRAFIA DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. [Sem data] Câncer de prostata, 2003. [Online] [Acesso em outubro de 2003]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/cancer/prostata>.
2. Taylor JD, Holmes TM, Swanson GM. Descriptive epidemiology of prostate cancer in metropolitan Detroit. *Cancer* 1994 Mar;73(6):1704-7.
3. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: International comparisons. *BJU Int* 2002;90(2):162-73.
4. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003 Jan-Feb;53(1):5-26.
5. Farkas A, Schneider D, Perrotti M, Cummings KB, Ward WS. National trends in the epidemiology of prostate cancer, 1973 to 1994: evidence for the effectiveness of prostate-specific antigen screening. *Urology* 1998 Sep;52(3):444-9.
6. Post PN, Stockton D, Davies TW, Coebergh JW. Striking increase in

- incidence of prostate cancer in men aged < 60 years without improvement in prognosis. *Br J Cancer* 1999 Jan;79(1):13-7.
7. Sociedade Brasileira de Urologia (SBU). Tumores prostáticos: I Consenso Brasileiro. São Paulo (SP): Ed. BG Cultural; 1998.
  8. Billis A, Souza CAF, Piovesan H. Histologic carcinoma of prostate in autopsies: frequency, origin, extension, grading and terminology. *BJU* 2002;28(3):197-206.
  9. Machado MT, Cintra CC. Prevenção do câncer de próstata. In: Wroclawski ER, editores. Guia prático de urologia. São Paulo: Ed. Segmento; 2003. p.425-7.
  10. Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin* 1995 Jan-Feb;45(1):8-30.
  11. Montie JE, Pienta KJ. Review of the role of androgenic hormones in the epidemiology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology* 1994 Jun;43(6):892-9.
  12. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery - what we have learned and where we are going. *J Urol* 1999 Aug;162(2):293-306.
  13. Ellis WJ, Chetner MP, Preston SD, Brawer MK. Diagnosis of prostatic carcinoma: the yield of serum prostate specific antigen, digital rectal examination and transrectal ultrasonography. *J Urol* 1994 Nov;152(5 Pt 1):1520-5.

14. Jacobsen SJ, Katusic SK, Bergstralh EJ, Oesterling JE, Ohrt D, Klee GG, et al. Incidence of prostate cancer diagnosis in the eras before and after serum prostate-specific antigen testing. *Jama* 1995 Nov;274(8):1445-9.
15. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999 May;281(17):1591-7.
16. Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol* 1994 Nov;152(5 Pt 2):1831-6.
17. Damião R, Carrerette FB. Câncer de próstata: doença localmente avançada. In: Wroclawski ER, editores. *Guia prático de urologia*. São Paulo: Ed. Segmento; 2003. p.507-9.
18. Webber MM. In vitro models for prostatic cancer: summary. *Prog Clin Biol Res* 1980;37:133-47.
19. Szücs S, Zitzelsberger H, Breul J, Bauchinger M, Höfler H. Two-phase short-term culture method for cytogenetic investigations from human prostate carcinoma. *Prostate* 1994;25(5):225-35.
20. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Liss (NY): John Wiley & Sons, publishers; 1990.
21. Berd D, Kairys J, Dunton C, Mastrangelo MJ, Sato T, Magguire HC. Autologous, hapten-modified vaccine as a treatment for human cancers. *Sem*

- Oncol 1998 Dec; 25(6):646-53.
22. Vermorken JB, Claessen AME, van Tinteren H, Gall HE, Ezinga R, Meijer S, et al. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 1999 Jan; 353(9150):345-50.
  23. Sedlacek HH. Vaccination for treatment of tumors: a critical comment [Review]. *Crit Rev Oncog* 1994;5(6):555-87.
  24. Abbas AK, Lichtmann AH, Pober JS, editors. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000.
  25. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, editors. Kubi imunologia. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.
  26. Blades RA, Keating PJ, McWilliam LJ, George NJR, Stern PL. Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implications for immunotherapy. *Urology* 1995; 46(5):681-7.
  27. Lu QL, Abel P, Mitchell S, Foster C, Lalani EN. Decreased HLA-A expression in prostate cancer is associated with normal allele dosage in the majority of cases. *J Pathol* 2000;190(2):169-76.
  28. Tjota A, Zhang YQ, Piedmonte MR, Lee CL. Adoptive immunotherapy using lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in preventing and treating spontaneous pulmonary metastases of syngeneic Dunning rat prostate tumor. *J Urol* 1991 Jul;146(1):177-83.
  29. Tjoa BA, Murphy GP. Progress in active specific immunotherapy of prostate

- cancer. *Semin Surg Oncol* 2000 Jan-Feb;18(1):80-7.
30. Siegall CB. Targeted toxins as anticancer agents [Review]. *Cancer* 1994 Aug;74(3 Suppl):1006-12.
  31. Sokoloff MH, Tso CL, Kaboo R, Taneja S, Pang S, deKernion JB, et al. In vitro modulation of tumor progression-associated properties of hormone refractory prostate carcinoma cell lines by cytokines. *Cancer* 1996 May;77(9):1862-72.
  32. Rini BI, Small EJ. Immunotherapy for prostate cancer [Review]. *Curr Oncol Rep* 2001; 3(5):418-23.
  33. Li Q, Normolle DP, Sayre DM, Zeng X, Sun R, Jiang G, et al. Immunological effects of BCG as an adjuvant in autologous tumor vaccines. *Clin Immunol* 2000 Jan;94(1):64-72.
  34. Sondak VK, Wolfe JA. Adjuvant therapy for melanoma. *Curr Opin Oncol* 1997 Mar;9(2):189-204.
  35. Lamm DL, Blumenstein BA, Grawford ED, Montie JE, Scardino P, Grossmann HB, et al. A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with Bacille Calmette-Guérin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med* 1991 Oct;325(17):1205-9.
  36. Herr HW, Schwalb DM, Zhang ZF, Sogani PC, Fair WR, Whitmore WFJ, et al. Intravesical Bacillus Calmette-Guérin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 1995 Jun;13(6):1404-8.

37. Merrin C, Han T, Klein E, Murphy GP. Immunotherapy of prostatic cancer with Bacillus Calmette-Guérin and purified protein derivative: preliminary results. *Urology* 1973 Dec;2(6):651-4.
38. Guinan P, Toronchi E, Shaw M, Crispin R, Sharifi R. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) adjuvant therapy in stage D prostate cancer. *Urology* 1982 Oct;20(4):401-3.
39. Hanna MG Jr, Brandhorst JS, Peters LC. Active specific immunotherapy of residual micrometastasis: an evaluation of sources, doses and ratios of BCG with tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1979;7:165-3.
40. Hanna MG Jr, Pollack VA, Peters LC, Hoover HC. Active-specific immunotherapy of established micro metastases with BCG plus tumor cell vaccines: effective treatment of BCG side effects with isoniaticid. *Cancer* 1982 Feb;49(4):659-64.
41. Hanna MG Jr, Peters LC. Specific immunotherapy of established visceral micrometastases by BCG-tumor cell vaccine alone or as an adjunct to surgery. *Cancer* 1978 Dec;42(6):2613-25.
42. Hoover HC Jr, Peters LC, Brandhorst JS, Hanna MG. Therapy of spontaneous metastases with an autologous tumor vaccine in a guinea pig model. *J Surg Res* 1981 Apr;30(4):409-15.
43. Key ME, Hanna MG Jr. Mechanism of action of BCG-tumor cell vaccines in the generation of systemic tumor immunity. I. Synergism between BCG and line 10 tumor cells in the induction of an inflammatory response. *J Natl Cancer*

- Inst 1981 Oct;67(4):853-61.
44. Peters LC, Brandhorst JS, Hanna MG Jr. Preparation of immunotherapeutic autologous tumor cell vaccines from solid tumors. *Cancer Res* 1979;39:1353-60.
  45. Hoover HC Jr, Surdyke MG, Dangel RB, Peters LC, Hanna MG Jr. Prospectively randomized trial of adjuvant active-specific immunotherapy for human colorectal cancer. *Cancer* 1985 Mar;55(6):1236-43.
  46. Hoover HC Jr, Brandhorst JS, Peters LC, Surdyke MG, Takeshita Y, Madariaga J, et al. Adjuvant active specific immunotherapy for human colorectal cancer: 6.5-year median follow-up of a phase III prospectively randomized trial. *J Clin Oncol* 1993 Mar;11(3):390-9.
  47. Harris JE, Ryan L, Hoover HC Jr, Stuart RK, Oken MM, Benson AB, et al. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol* 2000 Jan;18(1):148-57.
  48. Hanna MG, Hoover HC, Vermorken JB, Harris JE, Pinedo HM. Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: first randomized phase III trial shows promise. *Vaccine* 2001;19(17-19):2576-82.
  49. Berd D, Maguire HC Jr, Mccue P, Mastrangelo MJ. Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients. *J Clin Oncol* 1990 Nov;8(11):1858-67.

50. Lotem M, Peretz T, Drize O, Gimmon Z, Ad El D, Weitzen R, et al. Autologous cell vaccine as a post operative adjuvant treatment for high-risk melanoma patients (AJCC stages III and IV). The new American Joint Committee on cancer. *Br J Cancer* 2002 May;86(10):1534-9.
51. Kim CJ, Dessureault S, Gabrilovich D, Reintgen DS, Slingluff CL. Immunotherapy for melanoma. *Cancer Control* 2002 Jan-Feb;9(1):22-30.
52. Zarour HM, Kirkwood JM. Melanoma vaccines: early progress and future promises. *Semin Cutan Med Surg* 2003 Mar;22(1):68-75.
53. Galligioni E, Quaia M, Merlo A, Carbone A, Spada A, Favaro D, et al. Adjuvant immunotherapy treatment of renal carcinoma patients with autologous tumor cells and bacillus Calmette-Guérin: five-year results of a prospective randomized study. *Cancer* 1996 Jun;77(12):2560-6.
54. Dillmann RO, Barth NM, VanderMolen LA, Garfield DH, De Leon C, O'Connor AA, et al. Treatment of kidney cancer with autologous vaccines of short-term cell lines derived from renal cell carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm* 2001 Feb;16(1):47-54.
55. Nelson WG, Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, et al. Cancer cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer as vaccines for the treatment of genitourinary malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46 Suppl:S67-72.
56. Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, et al.

- Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res* 1999 Oct;59(20):5160-8.
57. Eaton JD, Perry MJ, Nicholson S, Guckian M, Russell N, Whelan M, et al. Allogeneic whole-cell vaccine: a phase I/II study in men with hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int* 2002 Jan; 89(1):19-26.
58. Perry MJ, Hrouda D, Dalgleish AG. Prospects for vaccination in prostate cancer. *Drugs Aging* 2000 May;16(5):321-7.
59. Slovin SF. Vaccines as treatment strategies for relapsed prostate cancer: approaches for induction of immunity. *Hemat Oncol Clin North Am* 2001 Jun;15(3):477-96.
60. Palapattu GS, Naitoh J, Belldegrun AS. Gene therapy for prostate cancer: new perspectives on an old problem. *Urol Clin North Am* 1999 May;26(2):353-63.
61. McDevitt MR, Barendswaard E, Ma D, Lai L, Curcio MJ, Sgouros G, et al. An alpha-particle emitting antibody ([<sup>213</sup>Bi]J591) for radioimmunotherapy of prostate cancer. *Cancer Res* 2000 Nov 1;60(21):6095-100.

---

---

**ANEXOS**

---

---

**ANEXO A - CLASSIFICAÇÃO TNM PARA CÂNCER DE PRÓSTATA(2002)****- Classificação TNM**

2002

**T - Tumor Primário**

Tx - Tumor não avaliado

T0 - Sem evidência de tumor

T1 - Clinicamente inaparente. Tumor não palpável ou não detectável por imagem

T1a - Tumor incidental. Microscopicamente localizado em < 5% de tecido ressecado

T1b - Tumor incidental. Microscopicamente localizado em > 5% de tecido ressecado

T1c - Tumor identificado por biópsia – níveis elevados de PSA

T2 - Tumor confinado à próstata

T2a - Tumor envolve metade ou menos da metade do lobo prostático

T2b - Tumor envolve mais da metade de um lobo, mas não ambos

T2c - Tumor envolve ambos os lobos prostáticos

T3 - Tumor ultrapassa a cápsula prostática

T3a - Extensão extracapsular

T3b - Tumor invade vesículas seminais

T4 - Tumor fixo, invasão de estruturas pélvicas

**Tumores - Classificação Patológica**

pT2 - Órgão confinado

pT2a - Tumor envolve metade ou menos da metade do lobo prostático

pT2b - Tumor envolve mais da metade de um lobo, mas não ambos

pT2c - Tumor envolve ambos os lobos prostáticos

pT3 - Invasão extraprostática

pT3a - Invasão extraprostática

pT3b - Invasão de vesícula seminal

pT4 - Invasão da bexiga e/ou reto e/ou esfícter externo

### **Linfonodos**

Nx - Linfonodos regionais não avaliados

N0 - Sem metástases ganglionares

N1 - Metástases em linfonodos ou linfonodos regionais

### **Metástases a Distância**

Mx - Metástases a distância não avaliadas

M0 - Ausência de metástases a distância

M1 - Metástases a distância

M1a - Metástases em linfonodos não regionais

M1b - Metástases ósseas

M1c - Metástases em outros órgãos

## **ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE PARA COLETA DE MATERIAL PARA PRODUÇÃO DA VACINA**

### **ESTUDO DE FASE 1 COM VACINA CELULAR AUTÓLOGA IMUNOMODULADA PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER DE- PRÓSTATA LOCALMENTE AVANÇADO OU METASTÁTICO**

Nome da Instituição: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Nº de identificação do paciente na Instituição: \_\_\_\_\_

O seu médico lhe explicou que você tem câncer de próstata e que necessita de uma cirurgia. Estamos lhe propondo que durante esta cirurgia parte do material removido seja utilizado para a produção de uma vacina que estará sendo desenvolvida.

Trata-se de um estudo de pesquisa clínica para câncer de próstata. Para este estudo será necessário coletar células de seu tumor durante a cirurgia que será realizada. Estas células serão utilizadas em laboratório para produção de uma vacina específica para você.

Caso o material coletado durante a cirurgia seja suficiente e viável para a produção da vacina, você poderá participar de um estudo, que irá estudar a viabilidade, segurança e eficácia desta nova vacina utilizada para o tratamento do câncer de próstata. Se as células obtidas durante o procedimento cirúrgico não sobrevivam no laboratório ou sejam contaminadas não será possível o preparo da vacina. O tratamento somente iniciará se obtivermos material suficiente para o preparo de no mínimo 4 doses da vacina.

#### **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

A preparação da vacina poderá demorar de algumas semanas até 3 meses. Além das células de seu tumor, será necessário coletar uma amostra de 20ml de sangue total para uma análise específica do seu sistema imunológico (de defesa).

#### **RISCOS**

Não haverá qualquer risco adicional relacionado com a coleta deste material além dos riscos ligados ao procedimento cirúrgico.

#### **BENEFÍCIOS**

Havendo quantidade suficiente de células e estas crescendo adequadamente em laboratório, para preparação de no mínimo 4 doses da vacina, você poderá optar por receber o tratamento em estudo com a vacina específica.

Você pode não obter benefício pessoal através deste estudo. Porém os dados desta pesquisa poderão auxiliar futuros estudos para tratamentos.

Por haver a possibilidade de inclusão na 2ª etapa deste estudo, os riscos e benefícios referentes a esta 2ª etapa serão devidamente esclarecidos em um segundo consentimento.

## CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS

Você tem direito a privacidade e toda informação de identificação colhida para este estudo é confidencial até os limites permitidos por lei. Seu registro médico permanecerá confidencial podendo se necessário ser consultado anonimamente por autoridades legalmente reconhecidas, ou por indivíduos que trabalhem diretamente com o médico responsável por este tratamento, observando o devido sigilo profissional.

## INFORMAÇÕES ADICIONAIS

As células coletadas durante a cirurgia serão utilizadas única e exclusivamente para a produção de uma vacina específica para você.

Esta vacina é de uso investigacional e está sendo estudada pela **FK Biotecnologia**, e pelo Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Este documento foi aprovado pelo **Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre** o qual é o responsável por assegurar que os direitos humanos sejam protegidos.

Este estudo está sob responsabilidade do Dr. Walter José Koff.

Você pode fazer quaisquer perguntas sobre o estudo e a qualquer momento. Caso você tenha qualquer problema ou dúvida entre em contato com o Dr. .... no telefone .....

Caso você tenha alguma questão referente à parte Ética deste estudo, pode entrar em contato com o Comitê de Ética desta Instituição, o qual aprovou seu desenvolvimento: .....

Sua autorização para coleta do material é voluntária. Você pode optar por não participar ou desistir a qualquer momento sem qualquer penalidade ou perda de benefícios aos quais você de outra forma teria direito.

## TERMO DE PARTICIPAÇÃO E ASSINATURAS

Pediríamos que, caso você concorde em participar deste estudo, assine este consentimento, de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde, de outubro de 1996, que asseguram a proteção dos pacientes envolvidos em pesquisa biomédica.

Eu li as informações acima e entendi o conteúdo deste termo e o objetivo da coleta do material, bem como os possíveis riscos e benefícios de minha participação. Eu



## ANEXO C - SELEÇÃO DE PACIENTES

Os critérios usados para escolher os pacientes visaram também selecionar futuros candidatos a receber a vacina, uma vez que está em andamento um ensaio clínico fase I com esta vacina.

### Critérios de inclusão

- Adenocarcinoma de próstata localmente avançado ou metastático com indicação de tratamento cirúrgico.
- Adenocarcinoma de próstata clinicamente localizado, candidatos a prostatectomia radical, com PSA >10 ng/ml no pré-operatório.
- Idade de 38 a 80 anos.
- Expectativa de vida de pelo menos três meses.
- Hemograma definido como: leucócitos >4.0x10<sup>9</sup>/L, neutrófilos >2.0x10<sup>9</sup>/L, plaquetas >100x10<sup>9</sup>/L e hemoglobina >10g/dL.
- Função renal e hepática dentro dos limites da normalidade.

### Critérios de exclusão

- Pacientes com doença metastática no SNC.
- Presença de infecção ativa.
- Presença de doença mental ou crônica de risco.
- História prévia ou concomitante de doença cardiovascular importante.
- História prévia e concomitante de doença pulmonar importante.
- Uso crônico de corticosteróides em doses imunossupressoras.
- Presença de condição psicológica, familiar, sociológica ou geográfica que impedisse o andamento ou seguimento do estudo.

## **ANEXO D - TÉCNICA DE COLETA DO MATERIAL ATRAVÉS DE PROSTATECTOMIA RADICAL RETROPÚBICA (PRR)**

Logo após a sua retirada, a peça de prostatectomia radical foi limpa, inspecionada para verificar a presença de nódulos ou alterações na sua consistência e tingida com tinta nanquim estéril nas cores de verde no lobo direito e preto no lobo esquerdo.

Esperou-se que a peça secasse.

Usando faca de enxeto, foram realizados cortes finos na peça, sempre cuidando muito para preservar a anatomia inicial da peça.

Amostras dos possíveis focos do câncer, como nódulos, aumento da consistência e alteração macroscópica, foram identificadas e coletadas. Na ausência de alteração macroscópica, a coleta foi realizada nas zonas periféricas de ambos os lobos.

Um pequeno fragmento de cada amostra coletada para cultura celular foi encaminhado para exame anatomopatológico. A peça cirúrgica foi reconstruída, colocada em solução de formol a 10% e enviada para exame anatomopatológico definitivo.

As amostras coletadas para cultura celular foram colocadas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, NY, USA) com 20% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina, estreptomicina e gentamicina), armazenadas a 4°C e transportadas para o laboratório de biologia tumoral da FK Biotecnologia, de Porto Alegre.

## **ANEXO E – TÉCNICA DE COLETA DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DE RTUp E Bx**

### **Coleta em RTUp**

Nessa coleta, foram usados ressector, eletrocoagulação monopolar e água destilada com solução de irrigação contínua. Não se fez nenhum controle da intensidade da corrente elétrica.

Inicialmente, procedeu-se à ressecção da mucosa da uretra prostática e à retirada dos fragmentos.

Posteriormente, fez-se a ressecção dos lobos laterais posteriores, procurando coletar amostra do CaP junto à cápsula posterior. Os fragmentos eram evacuados e avaliados. Eram escolhidos para amostra os maiores e que tinham uma consistência aumentada.

Uma pequena fração de cada fragmento coletado para cultura celular (biópsia da amostra) foi enviada para exame anatomopatológico em separado dos demais fragmentos.

As amostras coletadas para cultura celular foram colocadas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, NY, USA) com 20% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina, estreptomicina e gentamicina), armazenadas a 4°C e transportadas para o laboratório de biologia tumoral da FK Biotecnologia, de Porto Alegre.

### **Coleta através de Biópsia a céu aberto ( Bx)**

No paciente com adenocarcinoma metastático com invasão de colo vesical e esfíncter uretral e tamponamento vesical por coágulos, não foi possível acesso endoscópico.

As amostra foram coletadas através de biópsia transvesical durante a realização de cistostomia aberta.

Biópsias das amostras coletadas foram enviadas para exame anatomopatológico.

As amostras coletadas para cultura celular foram colocadas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, NY, USA) com 20% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina, estreptomicina e gentamicina), armazenadas a 4°C e transportadas para o laboratório de biologia tumoral da FK Biotecnologia, de Porto Alegre.