

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS
E ANTÍGENOS ABO EM PACIENTES COM
CÂNCER DE PRÓSTATA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Klein Mastella

Santa Maria, RS, Brasil

2008

AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E ANTÍGENOS ABO EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA

por

Aline Klein Mastella

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientadora: Maria Beatriz Moretto
Co-Orientador: José Edson Paz da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E ANTÍGENOS
ABO EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

elaborada por
Aline Klein Mastella

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

José Edson Paz da Silva, Prof. Dr.
(Presidente/Co-Orientador)

Marcos Martins Neto, Prof. Dr. (UFSM)

Sandra Trevisan Beck, Profa. Dra. (UFSM)

Santa Maria, 20 de junho de 2008.

*A meus pais,
Carlos e Márcia*

Agradecimentos

Para a realização deste trabalho tive a ajuda de muitas pessoas, sem as quais não poderia ter chegado até aqui.

Inicialmente agradeço aos meus pais que sempre estão ao meu lado, dando apoio, incentivo, amor e desejando o melhor para mim. O dia de hoje só foi possível pela presença deles em minha vida.

Agradeço à dinda, por estar sempre ajudando e torcendo pelo meu sucesso.

Ao Prof. Dr. José Edson Paz da Silva por ter orientado o trabalho.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria. Pude contar com a ajuda da médica Marta e do farmacêutico Aílton no Laboratório de Imunohistoquímica, com a farmacêutica Sandra no Laboratório de Bioquímica e com a farmacêutica Adriana no Laboratório de Imunologia.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e meus colegas que lá trabalham.

Aos amigos que sempre estão por perto para oferecer descontração e ajuda quando necessário. Muito obrigada aos colegas de faculdade, de mestrado, de festas, de apartamento e de trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E ANTÍGENOS ABO EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE PRÓSTATA

AUTORA: ALINE KLEIN MASTELLA
ORIENTADOR: MARIA BEATRIZ MORETTO
Santa Maria, 20 de junho de 2008.

O câncer de próstata (CaP) é uma doença que acomete homens e tornou-se a primeira causa de morte por câncer no Brasil. A carcinogênese vem sendo relacionada à presença de processo inflamatório local e também à perda de antígenos eritrocitários nas células neoplásicas. O objetivo do trabalho foi avaliar o envolvimento do processo inflamatório e a expressão dos antígenos A e B em pacientes com CaP. Foi realizada dosagem sorológica do antígeno prostático específico (PSA), da proteína C reativa (PCR) e da albumina modificada pela isquemia (IMA) em pacientes saudáveis e em pacientes com alterações neoplásica ou hiperplásica prostática. Os valores de PSA mostraram-se crescentes na comparação dos pacientes saudáveis (1,13 ng/ml), com HBP (18,69 ng/ml) e com CaP (134,68 ng/ml). A IMA apresentou valores em unidade de absorvância acima de 0,400 apenas nos pacientes com HBP, sendo que os grupos sanguíneos O e AB apresentaram as maiores médias. Os valores médios da PCR não ultrapassaram o valor de referência de 5 mg/l nos grupos estudados. Não houve diferença significativa na avaliação de cada variável (PSA, PCR e IMA) em relação à tipagem sanguínea ABO dos pacientes. O processo neoplásico prostático mostrou anular a expressão dos antígenos A e B nas células afetadas. A característica inflamatória mostrou-se branda nas alterações prostáticas estudadas, não ultrapassando o valor de referência. A IMA atuou como um marcador de estresse oxidativo, sendo que os pacientes com HBP mostraram valor médio acima de 0,400 UABS. Tal diagnóstico prostático é útil ser considerado quando a IMA está sendo usada como marcador de isquemia cardíaca. O grupo sanguíneo ABO dos pacientes não mostrou diferença significativa nas determinações de PSA, PCR e IMA.

Palavras chave: câncer de próstata, grupo sanguíneo, inflamação, carcinogênese.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

EVALUATION OF INFLAMMATORY MARKERS AND ABO ANTIGENS IN PATIENTS DIAGNOSED WITH PROSTATE CANCER

AUTHOR: ALINE KLEIN MASTELLA
ADVISOR: MARIA BEATRIZ MORETTO
Santa Maria, June 20th, 2008.

Prostate cancer (PC) is a disease in men and became the first cause of death by cancer in Brazil. The carcinogenesis is related to the presence of local inflammatory process and to the loss of blood group in neoplastic cells. The aim of the study was to assess the involvement of inflammatory process and the expression of A and B antigens in prostate cancer. Serological measure of prostatic specific antigen (PSA), reactive C protein (CRP) and ischemia modified albumin (IMA) was made in healthy, hyperplasic (BPH) and neoplastic prostate volunteers. PSA values increased when comparing healthy (1,13 ng/ml), BPH (18,69 ng/ml) and PC (134,68 ng/ml) patients. IMA showed to be over 0,400 ABSU just in BPH patients. Medium CRP concentrations did not exceed normal values (5 mg/l) in the studied groups. There was not a meaningful difference in the evaluation of PSA, CRP and IMA in relation to the ABO blood group of the patients. The carcinogenesis of prostate seemed to abolish the expression of A and B antigens in neoplastic cells. Inflammatory feature showed to be mild in the prostatic alterations and did not reach reference values. IMA acted as a marker of oxidative stress and patients with BPH demonstrated concentration above 0,400 ABSU. The diagnosis of BPH must be considered when IMA is being used as a marker of myocardial ischemia. The ABO blood group of the volunteers did not show difference in the analysis of PSA, CRP and IMA.

Keywords: prostate cancer, blood group, inflammation, carcinogenesis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Glândula prostática e respectivas zonas	16
FIGURA 2 – Causas de inflamação prostática.....	22
FIGURA 3 – Inflamação, citocinas inflamatórias e estresse oxidativo na hiperplasia prostática	24
FIGURA 4 – Síntese do PSA no tecido prostático normal e na neoplasia ..	27
FIGURA 5 – Metabolismo do ácido araquidônico	31
FIGURA 6 – A. Paciente com HBP e do grupo sanguíneo A mostrando imunomarcção após a utilização do anticorpo anti-A. B. Paciente com CaP e do grupo sanguíneo A não mostra imunomarcção após a utilização do anticorpo anti-A.	51
FIGURA 7 – Gráfico do número de pacientes em relação à tipagem sanguínea e aos grupos estudados	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número de pacientes com HBP e CaP por tipagem sanguínea e reatividade imunohistoquímica	50
TABELA 2 – Dados gerais dos pacientes participantes em relação às variáveis PSA, IMA, PCR e idade	52
TABELA 3 - Dados dos pacientes do grupo sanguíneo O em relação às variáveis PSA, IMA, PCR e idade	54
TABELA 4 - Dados dos pacientes do grupo sanguíneo A em relação às variáveis PSA, IMA, PCR e idade	55
TABELA 5 - Dados dos pacientes do grupo sanguíneo B em relação às variáveis PSA, IMA, PCR e idade	56
TABELA 6 - Dados dos pacientes do grupo sanguíneo AB em relação às variáveis PSA, IMA e idade	56
TABELA 7 – Comparação entre os grupos sanguíneos para as variáveis PSA, IMA, PCR e idade no grupo controle	57
TABELA 8 – Comparação entre os grupos sanguíneos para as variáveis PSA, IMA, PCR e idade no grupo HBP	57
TABELA 9 – Comparação entre os grupos sanguíneos para as variáveis PSA, IMA, PCR e idade no grupo CaP	58
TABELA 10 – Comparação entre os grupos sanguíneos para as variáveis PSA, IMA, PCR e idade no grupo PT	58
.....	
TABELA 11 – Número de pacientes com CaP e HBP nas faixas de concentração de PSA	59
TABELA 12 – Número de pacientes com CaP e HBP nas faixas de UABS para IMA	59
TABELA 13 – Pacientes com CaP e HBP dos grupos sanguíneos O e não-O nas faixas de concentração de PSA	59
TABELA 14 – Pacientes com CaP e HBP dos grupos sanguíneos O e não-O nas faixas de absorvância de IMA	60

LISTA DE ABREVIATURAS

CaP	Câncer de próstata
DHT	Alfa-diidroxitestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
HBP	Hiperplasia benigna prostática
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
IMA	Albumina modificada pela isquemia
PAP	Fosfatase ácida prostática
PCR	Proteína C reativa
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PSA	Antígeno prostático específico
PT	Pós-Tratamento
RCP	Reação em cadeia da polimerase
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	76
APÊNDICE B – Técnica da Immunoperoxidase – Método Estreptavidina- Biotina	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 A Próstata	16
3.1.1 Carcinogênese	18
3.2 Hiperplasia Benigna Prostática	23
3.3 Antígeno Prostático Específico	25
3.4 Inflamação e Câncer	29
3.5 Proteína C Reativa	34
3.6 Albumina Modificada pela Isquemia	37
3.7 Grupo Sanguíneo ABO	39
3.7.1 Associação entre antígenos ABO e câncer	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Parte I – Avaliação Imunohistoquímica	44
4.1.1 Pacientes	44
4.1.2 Procedimento Laboratorial	45
4.2 Parte II – Avaliação Sorológica	46
4.2.1 Pacientes	46
4.2.2 Procedimento Laboratorial	47
4.3 Materiais utilizados na realização das técnicas	48
4.4 Análise Estatística	49
5 RESULTADOS	50
5.1 Parte I	50
5.2 Parte II	51
5.2.1 Análise dos valores de PSA e marcadores inflamatórios na população estudada	51
5.2.2 Variações dos valores de PSA, IMA e PCR relacionados à tipagem sanguínea ABO	53
5.2.3 Variações de PSA, marcadores inflamatórios entre os grupos ABO nas diferentes alterações prostáticas	56

5.2.4 Distribuição da população de acordo com os níveis de PSA e IMA ..	58
5.2.5 Distribuição da população estudada de acordo com os níveis de PSA e IMA em relação à tipagem sanguínea	59
6 DISCUSSÃO	61
6.1 Parte I	61
6.2 Parte II	62
7 CONCLUSÃO	66
8 BIBLIOGRAFIA	67

1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é uma neoplasia que acomete os homens, sendo a primeira causa de morte por câncer no Brasil e o Rio Grande do Sul está dentre os estados com maior incidência da doença. A chance de ocorrer a doença aumenta com a idade do paciente e com outros fatores intrínsecos e ambientais. O diagnóstico do CaP vem aumentando principalmente pelo incremento na investigação através dos métodos diagnósticos. Dentre eles, é utilizada na triagem dos pacientes a dosagem do antígeno prostático específico (PSA), o qual se encontra elevado nas alterações prostáticas, não exclusivamente nas doenças malignas (WHITTEMORE, 1995; BRASIL, 2007; CANCER DE PRÓSTATA, 2008).

A carcinogênese vem sendo relacionada com o processo inflamatório por muitos autores e estudos têm demonstrado que a inflamação é um fator de risco para o desenvolvimento neoplásico em diferentes órgãos. (COUSSENS *et al*, 2002; PALAPATTU *et al*, 2004; SCHOTTENFELD & BEEBE-DIMMER, 2006; DE MARZO *et al*, 2007b). A inflamação tecidual provoca aumento da proliferação celular e um ambiente rico em células inflamatórias, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e agentes promotores de dano tecidual que potencializam o risco de câncer (COUSSENS *et al*, 2002). Além disso, o processo inflamatório promove a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que causam dano ao DNA e outras estruturas celulares (DEMARZO *et al*, 1999; BALKWILL *et al*, 2001; SCHOTTENFELD *et al*, 2006). Uma forma de avaliar a inflamação é a determinação da proteína C reativa (PCR) no soro do paciente, pois esta é uma proteína que serve como marcador do processo inflamatório e é produzida pelos hepatócitos. (LATIF, *et al*, 2002; PEPYS *et al*, 2003; BLACK *et al*, 2004; HELTZSOUER *et al*, 2006).

As espécies reativas de nitrogênio e oxigênio geradas pela inflamação acabam por lesar o DNA aumentando o risco da instalação da neoplasia (DE MARZO *et al*, 2003). Os metabólitos gerados no estresse oxidativo alteram a conformação da albumina sérica, a qual perde a capacidade de ligação com alguns metais, como o cobre. Essa albumina modificada foi reconhecida em pacientes com síndrome coronariana aguda na qual há um processo de isquemia, desta forma a proteína passou a ser chamada de albumina modificada pela isquemia (IMA) (BAROR *et al*, 2000; SINHA *et al*, 2004).

Dentre os estudos com câncer, muitos deles avaliam a ligação entre tipagem sanguínea ABO e neoplasia (ROOTS *et al*, 1988; RAVN, 2000; SU *et al*, 2001; LE PENDU, 2001; JESCH *et al*, 2007) e também a expressão dos antígenos de grupo sanguíneo nas células neoplásicas. (HAKOMORI, 1999; LE PENDU, 2001; YAMAMOTO, 2004). Estes estudos sugerem que a perda da expressão de tais antígenos ocorra com a evolução da doença, e a perda da expressão dos antígenos A e B aumentam a motilidade celular, facilitando a ocorrência de metástases. Algumas hipóteses foram levantadas pra explicar como ocorre a perda dos antígenos, a qual é considerada característica de pior prognóstico (LE PENDU, 2001; GAO *et al*, 2004; YAMAMOTO, 2004).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Verificar se o adenocarcinoma prostático está relacionado à alteração na expressão dos antígenos ABO células neoplásicas, à inflamação e à hipóxia.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a expressão dos antígenos do grupo sanguíneo ABO nas células neoplásicas e hiperplásicas prostáticas através da técnica imunohistoquímica para a detecção dos antígenos A e B no tecido prostático.

Avaliar a presença da inflamação tecidual através da determinação da proteína C reativa no soro dos pacientes.

Verificar a presença da albumina modificada pela isquemia no soro de pacientes apresentando alteração prostática benigna ou maligna.

Verificar a tipagem sanguínea destes pacientes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Próstata

A próstata é composta por glândulas tubo alveolares ramificadas que eventualmente entram à uretra prostática. São organizadas em lóbulos e circundadas por estroma rico em fibras nervosas, células de músculo liso, colágeno e vasos linfáticos. Está localizada na pelve, na sua região posterior possui o reto, a bexiga na parte superior e o complexo de veias dorsais na região anterior (DE VITA *et al*, 1997).

A próstata é constituída por cinco zonas. A zona de transição circula a uretra prostática e ocupa 5% do tecido glandular. A zona central ocupa de 15 a 20% da glândula e se localiza ao redor do duto ejaculatório. A zona periférica é a porção palpável da glândula durante o exame do toque retal, circula a zona central e é responsável por 70% do tecido. A zona periuretral está adjacente à uretra e é circundada pelo esfíncter proximal. O estroma fibromuscular também faz parte da próstata, ocupando a superfície anterior da glândula (DE VITA *et al*, 1997).

A maioria dos casos de neoplasia prostática ocorre na zona periférica da glândula; poucos ocorrem na zona de transição e quase nenhum caso na zona central (DE MARZO *et al*, 2007b).

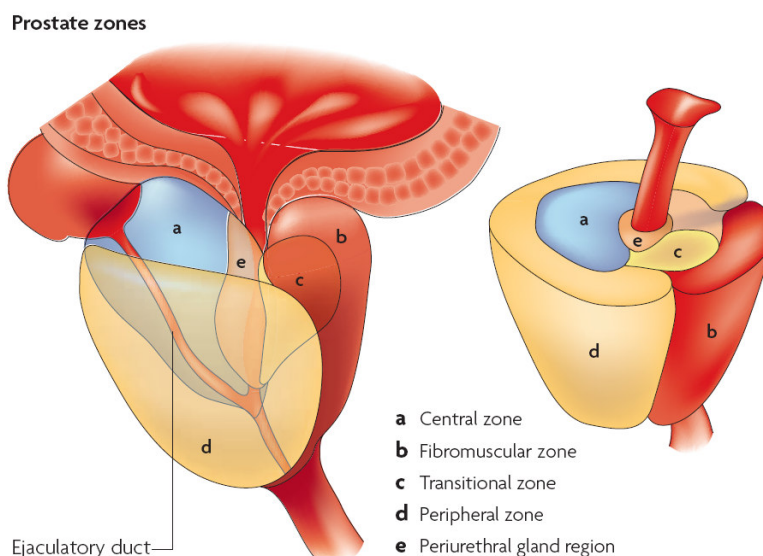


Figura 1 – Glândula prostática e respectivas zonas

Fonte: De Marzo *et al*, 2007.

A unidade funcional da próstata são os ácinos glandulares, constituídos por elementos do epitélio e do estroma. Os componentes epiteliais incluem as células epiteliais secretoras, células epiteliais basais, células neuroendócrinas, macrófagos e linfócitos. As células epiteliais secretoras estão em maior quantidade e contêm receptores de androgênio na sua superfície, necessitando deste hormônio para o seu crescimento, por isso são denominadas androgênio dependentes. Estas células também sintetizam e secretam antígeno prostático específico (PSA) e fosfatase ácida prostática específica (PAP), os quais passam a fazer parte do fluido prostático do sêmen. Quando os androgênios são retirados, essas células sofrem o processo de apoptose. As demais células não possuem receptores de androgênio na sua superfície e não envolvem na falta do hormônio. As células neuroendócrinas secretam serotonina e uma variedade de amina bioativas. As últimas provavelmente estão envolvidas com a regulação do crescimento e funcionamento da glândula por estimulação parácrina (DE VITA *et al*, 1997).

Os compartimentos epitelial e estromal são separados por uma membrana basal que contém proteína de matriz extracelular (DE VITA *et al*, 1997).

Na próstata do indivíduo adulto, as taxas de crescimento e morte celular estão equilibradas pela ação de androgênios, dentre eles o principal é a testosterona. No estroma, a testosterona é convertida a alfa-dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5alfa-redutase. A DHT forma um complexo com o receptor de androgênio, o qual interage com seqüências específicas do DNA conhecidas como elementos de resposta do androgênio presentes em genes androgênio-regulados. É a expressão dos genes androgênio-responsivos que regula o balanço entre proliferação celular, morte celular e diferenciação fenotípica de uma célula epitelial prostática (DE VITA *et al*, 1997).

Em contraste com as células epiteliais, os fibroblastos do estroma e células musculares lisas não sofrem apoptose e não são androgênio dependentes *per se*. Entretanto, a conversão da testosterona em DHT parece ocorrer nos fibroblastos do estroma, o que resulta na produção e secreção de fatores de crescimento tróficos como o DHT, fator de crescimento de queratinócito, fator de crescimento de nervo e fator de crescimento epidérmico. Esses fatores de crescimento influenciam as células estromais e se difundem pela membrana basal para se ligar a receptores de membrana específicos nas células epiteliais secretoras

e basais. As interações parácrinas estroma-epitélio são essenciais para a manutenção do número normal e função das células (DE VITA *et al*, 1997).

3.1.1 Carcinogênese

A patogênese do câncer prostático reflete fatores hereditários e a exposição a agentes infecciosos ou ambientais (DE MARZO *et al*, 2007b).

A carcinogênese se deve à soma de diversas lesões genéticas através da inativação de genes supressores tumorais ou ativação de oncogenes que podem resultar em proliferação celular descontrolada, decréscimo na morte celular ou apoptose, invasão, metástase e bloqueio da diferenciação celular (DE VITA *et al*, 1997); além da exposição a agentes infecciosos ou ambientais (DE MARZO *et al*, 2007b). Na próstata a expressão do fenótipo maligno representa o balanço entre a expressão da conversão do oncogene e a expressão do gene supressor tumoral que inibe o processo. Tecidos adultos são normalmente auto-regeneráveis, mas não é observado crescimento porque a taxa de proliferação celular está em equilíbrio com a taxa de morte celular (DE VITA *et al*, 1997).

O entendimento das alterações genéticas moleculares associadas com a progressão do estado pré-maligno ao maligno é essencial para interromper o processo (DE VITA *et al*, 1997).

As alterações durante a carcinogênese prostática incluem a perda da formação glandular com o desenvolvimento de morfologia anaplástica, pleomorfismo nuclear, invasão da membrana basal, aumento da motilidade celular, perda da inibição de contato e angiogênese (DE VITA *et al*, 1997).

O crescimento neoplásico é resultado de fatores genéticos, hormonais, ambientais e infecciosos que modulam a expressão de genes específicos. As células tumorais possuem alterações genéticas inerentes que resultam na sua proliferação clonal. As alterações genéticas que levam à carcinogênese se devem principalmente à perda de material genético, ocorrendo perda de genes responsáveis pela função supressora para o desenvolvimento do fenótipo maligno (DE VITA *et al*, 1997).

O fato de que alterações histológicas são visualizadas já em homens de 20 a 30 anos de idade e que o diagnóstico do CaP é feito 3 ou 4 décadas mais tarde

indica que o desenvolvimento da doença envolve um processo que possui várias etapas e requer a presença de androgênios. Homens que são castrados ou que se tornam hipopituitários antes dos 40 anos de idade raramente desenvolvem CaP, mostrando o envolvimento androgênico na patologia da doença (DE VITA *et al*, 1997).

O desenvolvimento clonal das células parcialmente transformadas resultam em lesões pré-malignas identificáveis morfológicamente, denominadas hiperplasia atípica adenomatosa ou neoplasia intra-epitelial prostática (PIN). A PIN envolve a proliferação celular dentro de ductos e ácinos prostáticos preexistentes e é subdividida em alto e baixo grau (DE VITA *et al*, 1997).

Nem todas as lesões de PIN levam ao desenvolvimento do CaP durante a vida do hospedeiro, porém estudos de autópsia revelaram que a PIN precede o desenvolvimento do carcinoma por 10 anos ou mais. O potencial biológico de tais lesões ainda não é conhecido, nem é possível prever com precisão em um paciente se as lesões produzirão câncer baseando-se apenas na histologia (DE VITA *et al*, 1997).

A PIN é identificada como uma redução no volume das glândulas pré-existentes e pode ser dividida em 2 padrões principais, denominados difuso e focal. A atrofia prostática difusa resulta de um decréscimo na concentração de androgênios circulantes e envolve o órgão por completo de maneira relativamente uniforme. A atrofia focal não está relacionada com o decréscimo de androgênios e ocorre como pedaços de epitélio atrófico inserido em um epitélio normal ao seu redor. A atrofia prostática focal ocorre principalmente na zona periférica da glândula, local que também ocorre a maioria dos casos de CaP. A associação entre a atrofia prostática e o CaP não está totalmente definida, porém foi observado que algumas lesões de atrofia prostática têm caráter proliferativo como resposta à perda celular e que as lesões estão relacionadas a infiltrados inflamatórios (DE MARZO *et al*, 1999; DE MARZO *et al*, 2003) Desta forma, essas lesões são classificadas como atrofia proliferativa inflamatória (PIA) (DE MARZO *et al*, 1999; DE MARZO *et al*, 2003; DE MARZO *et al*, 2007a; DE MARZO *et al*, 2007b)

Um estudo realizado por Billis & Magna não encontrou diferença significativa entre atrofia prostática com inflamação e atrofia prostática sem inflamação em relação à presença de CaP ou PIN de alto grau, contrariando os autores citados anteriormente (BILLIS & MAGNA, 2003).

Na maioria dos casos, a causa da inflamação prostática não é clara. Muitas são as fontes possíveis para iniciar o evento, como infecção direta, refluxo urinário causado por trauma químico ou físico, fatores dietéticos, alterações hormonais ou a combinação desses fatores. Além disso, qualquer um desses fatores pode levar à quebra da tolerância imunológica e ao desenvolvimento de uma reação auto-imune no tecido prostático (SCHOTTENFELD & BEEBE-DIMMER, 2006; DE MARZO *et al*, 2007b).

Dentre os agentes infecciosos, os mais comuns na causa da inflamação prostática são os microorganismos sexualmente transmissíveis como *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* e *Treponema pallidum*. Há agentes não sexualmente transmissíveis capazes de causar prostatite, como o *Propionibacterium acnes* e bactérias gram negativas como *Escherichia coli* (PALAPATTU *et al*, 2004; DE MARZO *et al*, 2007b).

Além das bactérias, alguns vírus são conhecidos por infectarem o tecido prostático, como o papilomavírus humano (HPV), o herpes simples tipo 2 (HSV2), o citomegalovírus (CMV) e o herpes vírus tipo 8 (HHV8). A frequência que estes agentes infectam a próstata e a capacidade de gerar uma resposta inflamatória ainda não é conhecida (DE MARZO, *et al*, 2007b).

De acordo com a ligação entre inflamação e carcinogênese, alguns estudos indicam que o uso de agentes antiinflamatórios reduz o risco do desenvolvimento do CaP (SCHOTTENFELD & BEEBE-DIMMER, 2006; DE MARZO *et al*, 2007b), principalmente porque a enzima cicloxigenase 2 (COX-2) está com maior expressão em macrófagos e células epiteliais nas lesões de atrofia proliferativa inflamatória. A COX-2 atua na conversão de ácidos graxos em prostenóides proinflamatórios, como a prostagandina E2 (SCHOTTENFELD & BEEBE-DIMMER, 2006).

A irritação química devido ao refluxo urinário também pode ser causa de desenvolvimento de inflamação crônica na próstata. A urina possui muitas substâncias tóxicas, e dentre elas o ácido úrico é bastante nocivo ao epitélio prostático (DE MARZO, *et al*, 2007b).

Fatores dietéticos também estão correlacionados ao CaP, principalmente em relação ao consumo de carne vermelha e gordura de origem animal. Um mecanismo proposto pelo qual produtos de origem animal podem estimular a

carcinogênese pode estar relacionado à formação de aminas heterocíclicas (DE MARZO, *et al*, 2007b).

Outra hipótese para a causa de inflamação prostática e conseqüente CaP é a exposição do tecido à estrogênios. Os estrogênios possuem uma ligação forte com processos autoimunes em mulheres, as quais estão muito mais predispostas a doenças autoimunes que homens. O aumento dos níveis de estrogênio já foi correlacionado com o desenvolvimento do CaP. O hormônio afeta o crescimento e o desenvolvimento prostático e isso ocorre pela interferência em rotas indiretas do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal através da prolactina e por efeitos diretos mediados pelo receptor alfa de estrogênio. Além disso, é possível que a inflamação crônica na glândula seja devido a uma reação autoimune causada por estrogênios (DE MARZO, *et al*, 2007b).

O câncer de próstata tornou-se o tipo mais freqüentemente diagnosticado entre os homens e a segunda causa de morte relacionada ao câncer na América do Norte (LI *et al*, 2005) sendo considerado um problema de saúde pública, conforme Frankel (2003). No Brasil, de acordo com o texto “Câncer de Próstata” do *site* do INCA (Instituto Nacional de Câncer), o câncer de próstata passou a ser a primeira causa de óbito por câncer em homens e, para 2008, estimou-se a ocorrência de 49.530 casos novos (52,43 para cada 100 mil) para esta doença. O Rio Grande do Sul está entre os estados com maior incidência de CaP, com estimativa de 4.430 casos novos para 2008, ou 80,63 para 100 mil homens (BRASIL, 2007).

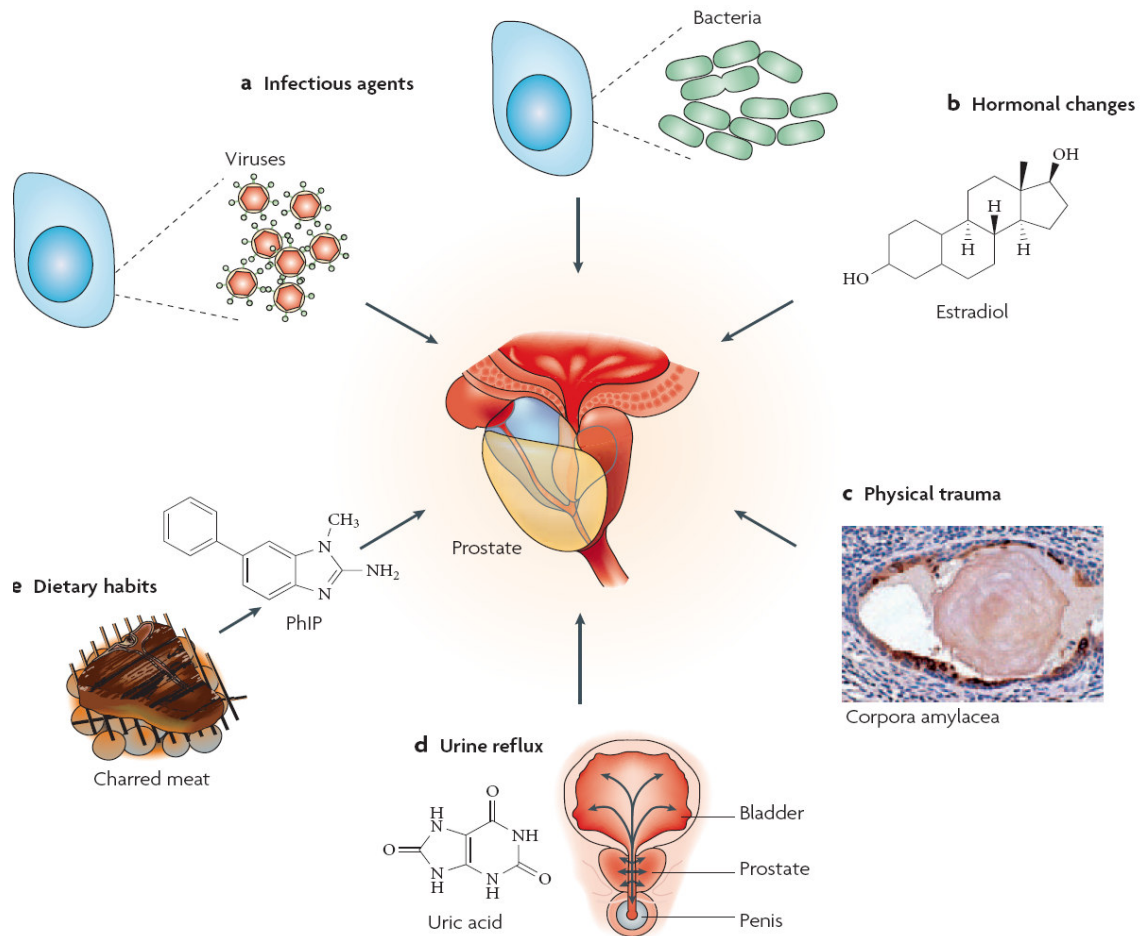


Figura 2 – Causas de inflamação prostática. a. Agentes infecciosos; b. Alterações hormonais (estrogênio); c. Trauma físico; d. Refluxo urinário; e. Hábitos dietéticos.

Fonte: De Marzo *et al*, 2007.

Ultimamente observa-se um aumento nas taxas de incidência dessa neoplasia, a qual pode ser parcialmente justificada pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida do brasileiro, pois a doença atinge homens acima de 50 anos de idade (CÂNCER DE PRÓSTATA, 2008).

3.2 Hiperplasia Benigna Prostática

A hiperplasia benigna prostática (HBP) é caracterizada pela progressiva hiperplasia dos tecidos estromal e glandular prostáticos que circundam a uretra com crescimento nodular localizado que leva ao aumento do volume da glândula. Os nódulos periuretrais na HBP comprimem a uretra e podem causar obstrução urodinâmica, levando aos sintomas do trato urinário baixo (lower urinary tract symptoms – LUTS), os quais incluem noctúria, esvaziamento incompleto da bexiga, hesitação urinária e fluxo fraco, podendo chegar à retenção urinária aguda (UNTERGASSER *et al*, 2005; WEI *et al*, 2005; NICKEL, 2007) e alterações que requerem intervenção cirúrgica, como hipertrofia da bexiga, infecção do trato urinário, alterações do trato urinário superior e retenção urinária (UNTERGASSER *et al*, 2005).

A etiologia da BPH ainda não está totalmente esclarecida, mas está relacionada à idade e à presença de androgênios (UNTERGASSER *et al*, 2005). Cerca de 42% dos homens de 51 a 60 anos de idade apresentam histologia para BPH. A incidência aumenta para 70% em homens de 61 a 70 anos e chega a 90% entre 81 e 90 anos (NICKEL, 2007).

Um estudo avaliou alguns fatores que poderiam estar relacionados com o aumento do volume prostático, o qual é uma medida objetiva da HBP. Os pacientes voluntários foram avaliados quanto ao volume prostático, peso, altura, circunferências da cintura e do quadril, exame do toque retal, dosagem do PSA e da glicose e responderam a um questionário para investigar quanto aos sintomas do trato urinário inferior. Ao final da pesquisa, os resultados sugeriram que obesidade, glicose de jejum elevada e diabetes atuam como fatores de risco para HBP (PARSONS *et al*, 2006).

De acordo com Crawford *et al* (2006), o volume total prostático aumentado, valores de PSA acima de 1,6 ng/dl, taxa de fluxo urinário máxima abaixo de 10,6 ml/s, volume residual urinário maior que 39 ml após esvaziamento e idade acima de 62 anos são fatores que aumentam o risco de progressão clínica da HBP (CRAWFORD *et al*, 2006)

A inflamação pode ser demonstrada histologicamente em tecido prostático com HBP e pode atuar no desenvolvimento da HBP (MISHRA, 2007; NICKEL, 2007; WANG *et al*, 2008). A inflamação assintomática da próstata é encontrada em BPH numa frequência de 43 a 98% (MISHRA, 2007). Infiltrados inflamatórios crônicos com presença de linfócitos T ativados e macrófagos são associados frequentemente em nódulos de HBP. Tais células são responsáveis pela produção de citocinas capazes de dar suporte ao crescimento fibromuscular da hiperplasia. As citocinas, por sua vez, aumentam a migração de linfócitos T para a área e são capazes de promover a proliferação de células epiteliais e estromais, contribuindo para o crescimento tecidual observado na HBP (NICKEL, 2007).

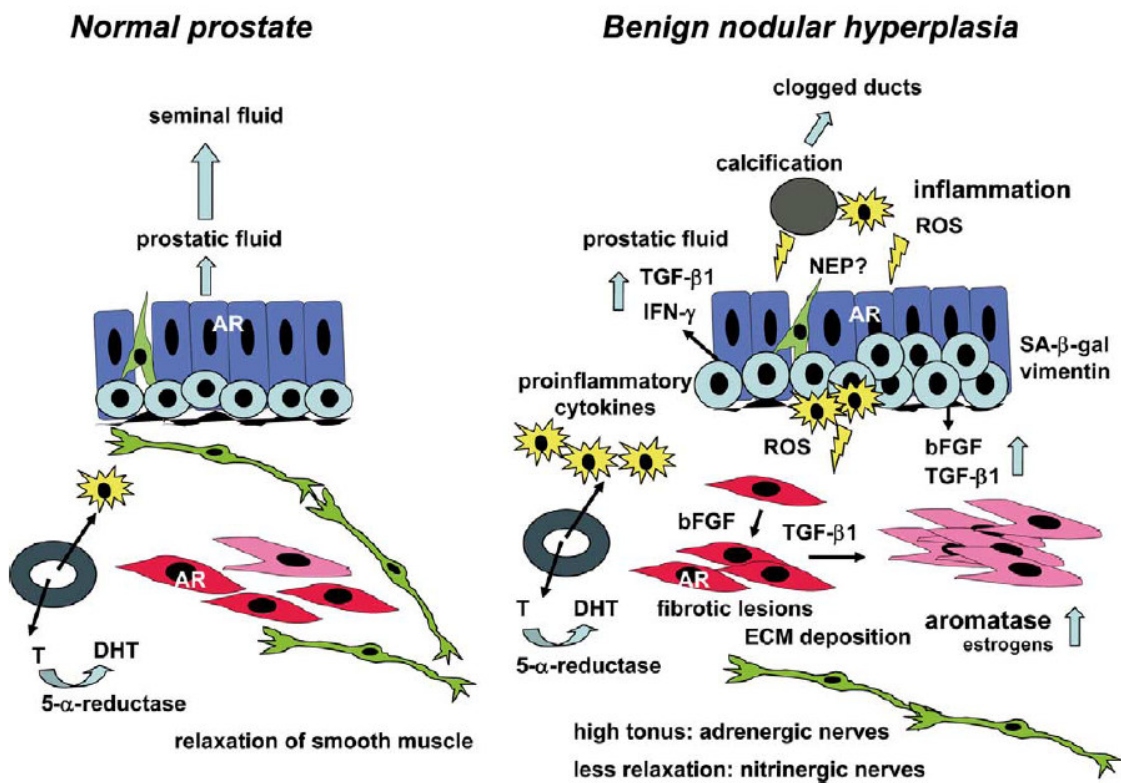


Figura 3 – Inflamação, citocinas inflamatórias e estresse oxidativo na hiperplasia prostática

Fonte: Untergasser *et al*, 2005.

Um estudo realizado por Delongchamps e colaboradores avaliou a presença de inflamação no tecido prostático e sua relação com CaP e HBP. Foi demonstrado que das glândulas com somente HBP, 79% apresentaram inflamação crônica

enquanto que nas glândulas em que a alteração era a neoplasia, 41% apresentaram a inflamação crônica. A análise estatística dos dados do estudo mostrou que a inflamação crônica está associada com a HBP, mas em casos de CaP a associação não foi significativa (DELONGCHAMPS *et al*, 2008).

Sauver *et al* (2008) realizaram um estudo para avaliar se o diagnóstico da prostatite está relacionado a eventos de BPH. A prostatite é uma condição diagnosticada principalmente em homens abaixo de 50 anos de idade com sintomatologia de dor pélvica. Cerca de 5 a 10% dos casos relacionam-se com infecção bacteriana e o restante dos casos (90-95%) com prostatite não bacteriana ou síndrome de dor pélvica crônica. Os resultados demonstraram um risco aumentado de pacientes com diagnóstico de prostatite desenvolverem BPH (SAUVER *et al*, 2008).

Devido à relação entre a presença de inflamação no tecido prostático e a HBP, é possível que fármacos antiinflamatórios auxiliem no tratamento da doença (NICKEL, 2007; WANG *et al*, 2008).

De acordo com o exposto, se a inflamação está relacionada com o desenvolvimento hiperplásico prostático, a utilização de um biomarcador seria de grande valor para avaliar o paciente. Um estudo utilizou a determinação de malondialdeído no soro, pois este relaciona-se com inflamação e estresse oxidativo. Comparando o grupo de voluntários saudáveis com o grupo com HBP, observou-se que o segundo apresentou aumento dos níveis do marcador e correlação positiva com o PSA (MERENDINO R.A, 2003 apud NICKEL, 2007). Outro estudo utilizou a proteína C reativa para avaliar a inflamação em pacientes com HBP e mostrou que homens com níveis de PCR acima de 3 mg/l tiveram 1,47 vezes mais chance de apresentar três ou mais sintomas relacionados à HBP que aqueles com concentrações inferiores (RHORMANN, S., 2005 apud NICKEL, 2007).

3.3 Antígeno Prostático Específico

Uma glicoproteína de 34kd, encontrada nas células acinares e ductais da próstata e no líquido seminal foi denominada Antígeno Prostático Específico (PSA)

(HENRY, 1999). O antígeno prostático específico (PSA) é uma serina protease androgênio dependente, membro da família da calicreína humana secretada somente pelas células epiteliais da próstata e pelo epitélio de revestimento das glândulas periuretrais, sendo uma proteína específica do tecido e um componente normal do sêmen (HERNÁNDEZ & THOMPSON, 2004; THOMPSON & ANKERST, 2007).

A glândula prostática humana consiste de uma camada única de células epiteliais secretoras circundadas por uma camada contínua de células basais e uma membrana basal. O PSA é produzido pelas células epiteliais secretoras nos ácinos e ductos e secretado diretamente para o lúmen. O PSA é a proteína que está em maior quantidade no fluido seminal, na concentração de 0,5 a 2,0 mg/ml (BALK *et al*, 2003).

O PSA tem função fisiológica significativa na liquefação do coágulo seminal para a liberação dos espermatozóides, a qual se faz através da clivagem das semenogelina I e II (JAIN *et al*, 2002; BALK *et al*, 2003; HERNÁNDEZ & THOMPSON, 2004). Grande parte do PSA é excretado no sêmen, mas uma pequena quantidade cai na circulação sistêmica, podendo ser detectada no soro (JAIN *et al*, 2002).

A síntese do PSA inicia através de uma seqüência inicial denominada pré-pró-PSA, a qual é clivada para gerar o pró-PSA, ambas proteínas inativas. O pró-PSA é secretado para o lúmen, onde a clivagem do N terminal do pró-PSA gera a enzima ativa, o PSA. Uma fração do PSA ativo pode difundir até a circulação, onde é rapidamente ligado a inibidores da protease (principalmente alfa 1-antiquimotripsina, ACT). O PSA presente ainda no lúmen, pode sofrer proteólise e gerar o PSA inativo, o qual também atinge a circulação e permanece na forma livre (BALK *et al*, 2003).

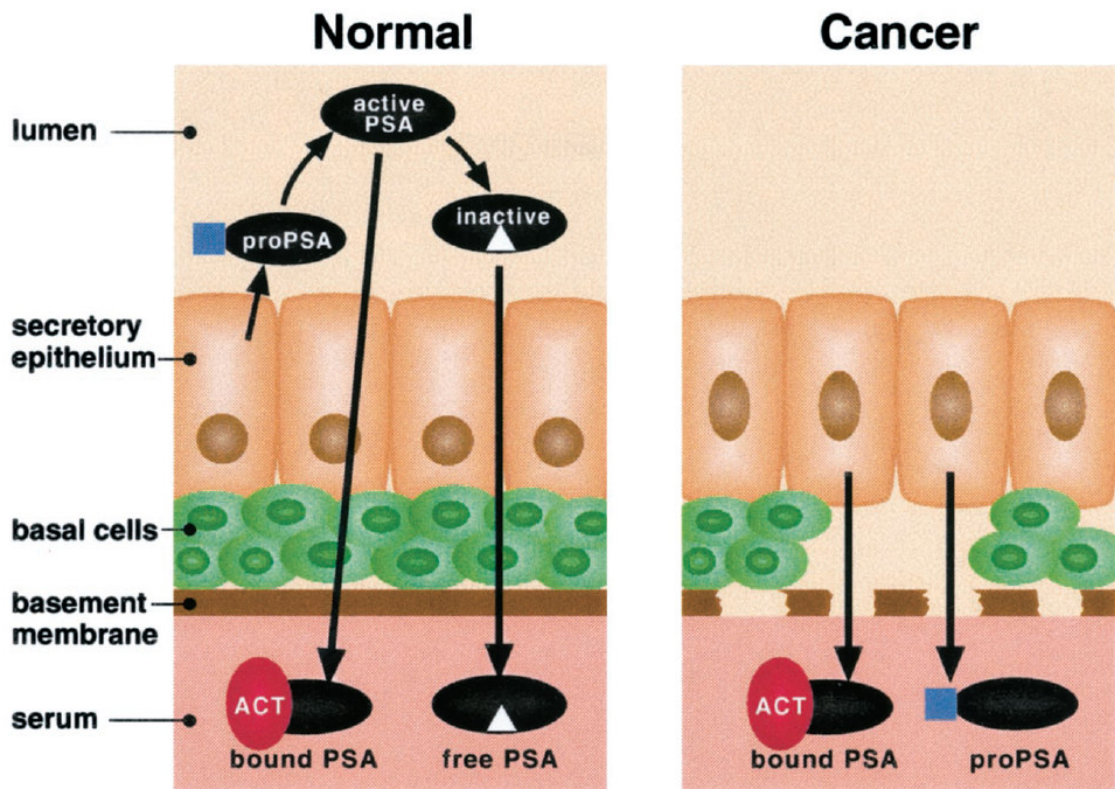


Figura 4 – Síntese do PSA no tecido prostático normal e na neoplasia

Fonte: Balk *et al*, 2003.

No CaP ocorre perda das células basais, da membrana basal e da arquitetura normal do lúmen, o que resulta numa diminuição da transformação do pré-PSA em PSA ativo e do PSA ativo em inativo e num aumento do PSA ligado e do pró-PSA no soro (BALK *et al*, 2003). Foi observado que o tecido prostático neoplásico libera 30 vezes mais PSA do que o tecido íntegro, isso se deve provavelmente devido à perda arquitetônica da glândula (JAIN *et al*, 2002).

A dosagem do PSA entrou na rotina laboratorial na década de 80 como um marcador para diagnóstico do câncer de próstata e se tornou o teste laboratorial mais comum para a triagem do câncer. Este fato aumentou a taxa de detecção, bem como o diagnóstico precoce da doença. Anteriormente, o diagnóstico do CaP era auxiliado pela dosagem da fosfatase ácida prostática, menos sensível que o PSA para neoplasias localizadas, mas com valor útil no monitoramento de doença avançada (BALK *et al*, 2003; HERNÁNDEZ & THOMPSON, 2004).

A grande importância do PSA como um marcador tumoral se embasou em algumas características observadas, como diminuição de sua concentração sérica

na resposta ao tratamento por terapia hormonal ou prostatectomia, sendo que o aumento de sua concentração estava relacionado à recorrência da doença pela falha do tratamento (HERNÁNDEZ & THOMPSON, 2004).

Apesar da sua utilidade para a detecção do CaP, o PSA não é específico para essa condição. A concentração sérica da proteína também encontra-se elevada em outras situações, como na hiperplasia benigna prostática e em inflamações crônicas da próstata (HENRY, 1999; JAIN *et al*, 2002).

Até a década passada, a concentração sérica de até 4 ng/ml para o PSA era considerada como valor normal. Os resultados acima desse valor indicavam a necessidade de maiores investigações, como a realização de biópsia para o diagnóstico do CaP, enquanto que os valores inferiores não eram investigados, apenas acompanhados (HERNÁNDEZ & THOMPSON, 2004; THOMPSON & ANKERST, 2007). Esse ponto de corte estabelecido proporciona uma especificidade de 75% e uma sensibilidade de apenas 40%. Além disso, cerca de 45% dos homens com CaP organo-confinado apresentam PSA abaixo de 4 ng/ml (JAIN *et al*, 2002).

Quando os valores de PSA encontram-se entre 4 e 10 ng/ml, o teste carece de especificidade; 75% das biópsias realizadas em pacientes com PSA em tal faixa são negativas para CaP (EASTHAM *et al*, 2003). Além disso, o risco de obter um resultado positivo para CaP numa biópsia é similar entre os homens com PSA entre 2,5 e 4 ng/ml e aqueles com PSA entre 4 e 10ng/ml (THOMPSON *et al*, 2006).

A triagem para o CaP é dificultada pela variabilidade natural da doença. Estudos de autópsias encontraram que 27% dos homens na 3ª década e 34% dos homens na 4ª década de vida tinham evidências histológicas da doença (THOMPSON & ANKERST, 2007).

O sugerido atualmente é que os valores de referência de PSA sérico sejam de acordo com a idade do paciente, sendo mais elevado nos mais idosos. Dessa forma, o valor de PSA é até 2,5 ng/ml para homens de 40 a 49 anos; até 3,5 ng/ml de 50 a 59 anos; até 4,5 ng/ml de 60 a 69 anos e até 5,5 ng/ml para homens com 70 a 79 anos. Esses novos valores de referência têm a vantagem de aumentar a sensibilidade do teste em homens mais jovens e aumentar a especificidade em homens mais idosos. O objetivo é aumentar a detecção do câncer precoce nos jovens e diminuir a detecção de neoplasia insignificante nos mais velhos (JAIN *et al*, 2002; HERNÁNDEZ & THOMPSON, 2004).

Além disso, um estudo demonstrou que alguns homens apresentam concentração elevada de PSA que retorna espontaneamente a valores normais, o que indica que apenas uma determinação elevada de PSA não é suficiente para prosseguir com avaliações para o diagnóstico do CaP. O ideal é que uma nova dosagem seja realizada em 4 a 6 semanas para confirmar o resultado obtido, e assim determinar a necessidade de realização da biópsia. O atraso no diagnóstico de algumas semanas ou meses não altera a eficácia do tratamento e ajuda na diminuição do número de procedimentos desnecessários (EASTHAM *et al*, 2003).

3.4 Inflamação e Câncer

A lesão celular pode ser causada por vários estímulos, sejam eles endógenos ou exógenos. As principais causas de lesão celular são hipóxia, agressão por agentes físicos, químicos e infecciosos, reações imunológicas, distúrbios genéticos e desequilíbrios nutricionais. Esses estímulos também podem provocar uma reação complexa no tecido conjuntivo vascular, a qual é denominada inflamação (COTRAN *et al*, 1996).

A inflamação tem a função de destruir, diluir ou bloquear o agente agressor e desencadear eventos que cicatrizam e reconstituem o tecido lesado. Porém, algumas vezes a inflamação pode ser nociva, como nos casos que desencadeia reações de hipersensibilidade a drogas e toxinas e em doenças como a artrite reumatóide, aterosclerose e fibrose pulmonar (COTRAN *et al*, 1996).

O processo inflamatório ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, envolvendo o plasma, os leucócitos circulantes, os vasos sanguíneos e os componentes extravasculares do tecido conjuntivo. As células envolvidas incluem os neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, células do endotélio vascular e fibroblastos do tecido conjuntivo. A principal característica do processo inflamatório é a reação que envolve os vasos sanguíneos e que conduz a um acúmulo de líquido e leucócitos no tecido extravascular (COTRAN *et al*, 1996).

A inflamação pode ter caráter agudo ou crônico. A inflamação aguda tem duração curta, de minutos a poucos dias. As principais características são a

exsudação de líquido e de proteínas plasmáticas com formação de edema e a emigração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Quando crônica, a inflamação tem duração maior e se associa com a presença de linfócitos e macrófagos com a proliferação de vasos sanguíneos e de tecido conjuntivo (COTRAN *et al*, 1996).

A liberação de proteínas plasmáticas ocorre devido à agressão direta do agente ao endotélio enquanto que a liberação dos leucócitos ocorre através de diapedese e quimiotaxia para a destruição do agente por fagocitose. Nesse processo, os leucócitos ativados e o endotélio podem liberar mediadores químicos como enzimas lisossomais, metabólitos ativos derivados do oxigênio e produtos do metabolismo do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos). Esses produtos são mediadores da agressão endotelial e tecidual e amplificam os efeitos do estímulo inflamatório inicial. Assim, a persistência do infiltrado inflamatório passa a atuar como agressor (COTRAN *et al*, 1996).

Muitos mediadores da inflamação são conhecidos, dentre eles estão as aminas vasoativas, as proteases plasmáticas, os metabólitos do ácido araquidônico, o fator de ativação plaquetária, as citocinas, o óxido nítrico, os componentes lisossômicos dos leucócitos, os radicais livres de oxigênio, além de outros. Os mediadores originam-se no plasma e nas células e desempenham atividade biológica através de ligação a receptores específicos em células-alvo, por atividade enzimática direta ou como mediadores de uma lesão oxidativa direta. Após sua ativação e liberação pelas células, a maioria dos mediadores tem curta duração de ação, sendo rapidamente degradados, inativados por enzimas, eliminados ou inibidos (COTRAN *et al*, 1996).

Os principais metabólitos do ácido araquidônico são as prostaglandinas e os leucotrienos. São hormônios locais de curto alcance, rapidamente formados, exercem suas ações localmente e em seguida são destruídos por enzimas ou decaem espontaneamente. Eles afetam diversos processos biológicos, dentre eles a inflamação. O ácido araquidônico se localiza nas células esterificado nos fosfolipídios de membrana. Quando ocorre ativação das fosfolipases celulares por estímulo químico, físico ou traumático, o ácido araquidônico é liberado e seu metabolismo é iniciado (COTRAN *et al*, 1996).

O metabolismo do ácido araquidônico ocorre por duas vias, via da cicloxigenase ou via da lipoxigenase, de acordo com a enzima que inicia a reação. A via da cicloxigenase gera as prostaglandinas (PG), as quais incluem PGE₂, PGD₂,

PGF_{2α}, prostaciclina (PGI₂) e tromboxane (TxA₂). As prostaglandinas PGE₂, PGD₂ e PGF_{2α} têm ação na vasodilatação e potencialização do edema; A PGI₂ causa vasodilatação e inibe a agregação plaquetária e a TxA₂ causa vasoconstrição e promove a agregação plaquetária. A via da lipoxigenase leva à formação do 5-HETE, seu principal produto, e dos leucotrienos. Os metabólitos da via da lipoxigenase possuem ações como quimiotaxia de leucócitos, vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (COTRAN *et al*, 1996).

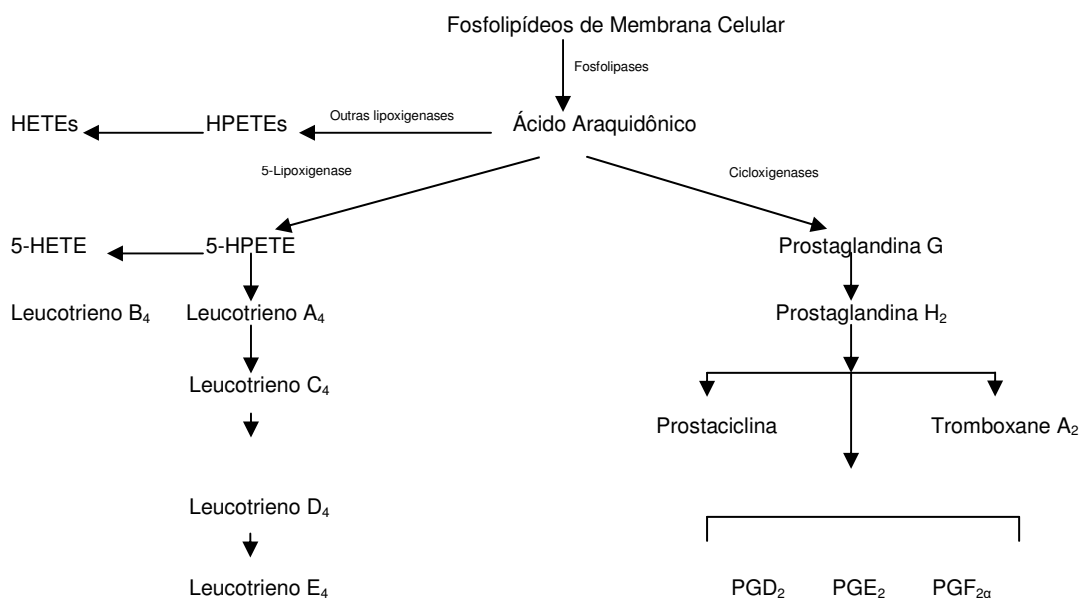


Figura 5 – Metabolismo do ácido araquidônico

As citocinas também são mediadores da inflamação, desempenhando papel importante na resposta inflamatória e imune. São proteínas de baixo peso molecular produzidas por leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e células do estroma da medula óssea (FERREIRA, 2001). O estímulo da secreção das citocinas ocorre por endotoxinas, por imunocomplexos, por toxinas, por agravos físicos e por processos inflamatórios (COTRAN *et al*, 1996).

Sua ação ocorre no local onde há a resposta imune ou em sítios diversos do organismo. Atualmente são conhecidas mais de uma centena de citocinas e as funções exercidas por elas estão bem definidas, sendo principalmente relacionadas

com a ativação e a regulação da resposta imune celular e humoral e da resposta imune inespecífica (FERREIRA, 2001).

Na inflamação, as principais citocinas envolvidas são a interleucina-1 (IL-1), os fatores de necrose tumoral α e β (TNF- α e TNF- β), a interleucina-6 (IL-6) e a família da interleucina-8 (IL-8). A atuação da IL-1 e do TNF- α ocorre principalmente sobre o endotélio, leucócitos e fibroblastos e na indução de reações sistêmicas de fase aguda. Além disso, também induzem a IL-8, uma quimioquina com grande ação ativadora de neutrófilos e com atividade limitada sobre eosinófilos e monócitos (COTRAN *et al*, 1996). As quimioquinas são proteínas de 8 a 10 kd que estimulam o recrutamento e a migração de leucócitos como parte da resposta do hospedeiro a agressões antigênicas (SCHOTTENFELD *et al*, 2006). A IL-6 tem como principal função estimular os hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda (FERREIRA, 2001).

As citocinas também induzem respostas sistêmicas de fase aguda associadas com infecção ou agressão, como febre, produção de sono de ondas lentas, liberação de neutrófilos na circulação, liberação do hormônio adrenocorticotrófico e corticosteróides e efeitos hemodinâmicos do choque séptico no caso do TNF, com hipotensão, redução da resistência vascular, aumento da frequência cardíaca e redução do pH sanguíneo (COTRAN *et al*, 1996).

Por último, os radicais livres do oxigênio também participam como mediadores da inflamação. São espécies químicas que têm um único elétron não pareado no orbital externo, o que confere característica extremamente reativa e não estável (COTRAN *et al*, 1996).

A formação dos radicais livres ocorre dentro das células pela absorção de energia radiante; por reações endógenas, principalmente oxidativas, durante os processos metabólicos normais; ou pelo metabolismo enzimático de substâncias químicas ou drogas exógenas. A partir de então, podem ser liberados para o meio extracelular após exposição a agentes quimiotáticos, a imunocomplexos ou a uma exposição fagocitária (COTRAN *et al*, 1996).

Os radicais livres participam de reações com substâncias químicas inorgânicas ou orgânicas, proteína, lipídios, carboidratos, principalmente com moléculas nas membranas e ácidos nucleicos. Também iniciam reações autocatalíticas, reagindo com moléculas que são convertidas em radicais livres, propagando a cadeia de danos. Os principais efeitos nocivos dos radicais livres que

causam lesão tecidual são as peroxidação lipídica das membranas, modificações oxidativas de proteínas e lesões no ácido desoxirribonucléico, levando à morte ou transformação maligna da célula (COTRAN *et al*, 1996).

O organismo possui mecanismos antioxidantes de proteção para anular a toxicidade dos radicais livres. O soro, os líquidos teciduais e as células alvo contêm algumas substâncias que realizam tal efeito, como as proteínas ceruloplasmina, transferrina, as enzimas superóxido desmutase, catalase e glutatíon peroxidase, dentre outras. Dessa forma, o dano causado pelos radicais livres no tecido devido ao processo inflamatório, depende do equilíbrio entre sua produção e os mecanismos antioxidantes (COTRAN *et al*, 1996).

A ligação entre inflamação e carcinogênese surgiu em 1863 quando Virchow observou leucócitos em tecidos neoplásicos. Sua hipótese dizia que substâncias irritantes causam injúria tecidual e inflamação, acentuando a proliferação celular, o que causaria o câncer (BALKWILL *et al*, 2001; COUSSENS *et al*, 2002).

Os conhecimentos atuais demonstram que apenas a proliferação celular não é capaz de causar câncer, outros fatores estão envolvidos no processo, porém, a proliferação celular sustentada (continuada) em um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, agentes promotores de dano tecidual potencializa o risco de câncer (COUSSENS *et al*, 2002). O infiltrado leucocitário no tecido neoplásico atua como uma fonte de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e de angiogênese. Além disso, a inflamação crônica e os metabólitos provenientes do processo fagocitário promovem o excesso na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com capacidade de causar dano permanente ao DNA, às lipoproteínas e às membranas (DEMARZO *et al*, 1999; BALKWILL *et al*, 2001; SCHOTTENFELD *et al*, 2006). Também há liberação de metabólitos de ácido araquidônico, incluindo prostaglandinas e leucotrienos pelas células inflamatórias, sendo que as cicloxigenases são as enzimas que controlam as etapas limitantes da síntese de prostaglandinas (BALKWILL *et al*, 2001; SCHOTTENFELD *et al*, 2006). Dessa forma, alguns estudos avaliam a utilização de fármacos antiinflamatórios teriam ação benéfica na prevenção da carcinogênese por atuarem nas enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico (BALKWILL & MANTOVANI, 2001; COUSSENS & WERB, 2002; SCHOTTENFELD & BEEBE-DIMMER, 2007).

3.5 Proteína C Reativa

A proteína C reativa (PCR) é um marcador de fase aguda de infecção e foi descoberta em 1930 durante um estudo de pacientes com infecção por *Streptococcus pneumoniae* no laboratório de Oswald Avery. No soro obtido dos pacientes durante a fase aguda da doença foi encontrada uma proteína capaz de precipitar o polissacarídeo C da parede celular do pneumococo. Anos mais tarde, o ligante da PCR na parede celular foi identificado como uma fosfocolina, que faz parte do ácido tectóico da parede celular do *S. pneumoniae*. Atualmente se conhecem várias outras macromoléculas ligantes da PCR, bem como suas ações de ativadora da via clássica do complemento, estimuladora da fagocitose e ligação com receptores de imunoglobulinas, com atuação na defesa do hospedeiro contra infecções, funciona como um mediador pro-inflamatório (PEPYS *et al*, 2003; BLACK *et al*, 2004).

A fase aguda compreende as respostas bioquímicas e fisiológicas não específicas frente a dano tecidual, infecção, inflamação e neoplasias. Dessa forma, um número grande de proteínas é rapidamente sintetizado principalmente nos hepatócitos, sob o controle de citocinas que são originadas no local afetado. Assim, a proteína C reativa é produzida nos hepatócitos através do controle da interleucina-6 (IL-6), embora outros locais de síntese e secreção sejam sugeridos, e pode ser medida no plasma, onde tem meia-vida de 19 horas. Após um estímulo agudo inflamatório, a concentração da PCR aumenta rapidamente (PEPYS *et al*, 2003).

A concentração plasmática da PCR é estável e cada indivíduo possui sua concentração característica (PEPYS *et al*, 2003). Os níveis encontrados em indivíduos saudáveis variam de 0,1 a 10 mg/l (HEIKKILÄ *et al*, 2007). Não há variação sazonal, diurna ou dietética da concentração de PCR (WILKINS *et al*, 1999; PEPYS *et al*, 2003). A variação nesses níveis é determinada pela taxa de sua produção, a qual está relacionada com a intensidade do processo patológico que a estimulou. Quando o estímulo cessa, a concentração plasmática da PCR rapidamente cai aos valores basais. Foi observado que a concentração aumenta com a idade, provavelmente devido a patologias subclínicas. Além disso, estados de falência hepática afetam a produção da PCR, diminuindo sua concentração (PEPYS *et al*, 2003).

Na maioria das doenças, a determinação da PCR mostra-se mais precisa que outros parâmetros laboratoriais para resposta de fase aguda, como a viscosidade plasmática e a velocidade de hemossedimentação (PEPYS *et al*, 2003).

Desta forma, a concentração plasmática de PCR é um útil e não específico marcador de inflamação (COLLEY *et al*, 1983; PEPYS *et al*, 2003; IL'YASOVA *et al*, 2005). Sua determinação/dosagem contribui para a triagem de doenças orgânicas, monitoramento da resposta ao tratamento de inflamações e infecções, detecção de infecções intercorrentes em indivíduos imunocomprometidos e em casos de certas doenças caracterizadas por uma resposta de fase aguda modesta ou ausente (PEPYS *et al*, 2003).

O aumento na concentração da PCR foi relatado em muitas doenças, entre elas as doenças cardiovasculares, diabetes melitus tipo 2, artrites e neoplasias (HEIKKILÄ *et al*, 2007).

Muitos mecanismos foram propostos para relacionar PCR e neoplasias. Um deles indica que o crescimento do tumor causa inflamação tecidual e por isso aumenta os níveis da PCR. Outro diz que a PCR pode atuar como indicador de resposta imune aos antígenos tumorais. Finalmente um último mecanismo propõe que as células neoplásicas produzem proteínas inflamatórias, o que poderia explicar a alta concentração de PCR em pacientes com câncer. Alguns estudos demonstraram que certas células neoplásicas parecem secretar IL-6 e IL-8, que estão envolvidas na produção da PCR. Esses mecanismos sugerem que o aumento dos níveis de PCR é uma resposta ao processo neoplásico que as concentrações de PCR poderiam servir como um marcador para identificar pessoas com câncer em um estágio precoce, onde o tratamento pode ser mais efetivo. Além disso, a inflamação crônica pode ter papel na etiologia do câncer. Foi sugerido que a inflamação cria um micro ambiente tecidual onde espécies reativas de oxigênio e nitrogênio liberadas pelas células inflamatórias poderiam causar alterações malignas no DNA e que algumas citocinas e proteínas inflamatórias da inflamação crônica promovem o crescimento tumoral (HEIKKILÄ *et al*, 2007).

A inflamação pode contribuir para a carcinogênese prostática e é frequentemente encontrada em biópsias da glândula e material de prostatectomia radical. Infiltrados inflamatórios são geralmente encontrados em focos de atrofia e ao seu redor, sendo caracterizado por um aumento no índice proliferativo. Esses focos

(atrofia inflamatória proliferativa) podem ser precursores do CaP ou podem indicar um ambiente intraprostático favorável à carcinogênese (LEHRER *et al*, 2005).

De acordo com um estudo de Lehrer, não há diferença significativa na concentração de PCR em homens com CaP localizado ou HBP, mas foi encontrado aumento significativo naqueles com metástase óssea. O mesmo estudo encontrou correlação entre os níveis de PSA e PCR em pacientes com CaP. Essa forte associação, independente do estágio tumoral, sugere que a inflamação pode ser fundamental no desenvolvimento do CaP, e que a inflamação crônica pode ser um alvo para a prevenção e para o tratamento da doença (LEHRER *et al*, 2005).

Os níveis elevados de PCR no plasma de pacientes com CaP androgênio-independente parece ser um forte preditor de mau prognóstico e desenvolvimento de evento esquelético relacionado (GRAFF *et al*, 2007).

A PCR apresentou níveis séricos mais elevados em pacientes com CaP metastático do que naqueles com hiperplasia benigna prostática (HBP) ou CaP de acordo com um estudo realizado por Latif *et al* (2002). Também foi demonstrado que a PCR não se correlacionou com os níveis de PSA em pacientes com CaP em diferentes estágios da doença (LATIF *et al*, 2002).

Heltzsouer e colaboradores (2006) estudaram a correlação entre PCR e neoplasias de cólon, reto e próstata e avaliaram que somente o primeiro tem seu desenvolvimento associado com a PCR (HELTZSOUER *et al*, 2006).

Um estudo realizado por Il'yasova e colaboradores (2005) avaliou a associação entre 3 marcadores inflamatórios, PCR, TNF-a e IL-6, e câncer. Os três marcadores apresentaram fraca associação com o aumento do risco de eventos neoplásicos e a PCR pareceu ser mais precisa que os demais, mostrando-se mais fortemente associada com morte por câncer do que com casos não fatais. Nenhum marcador apresentou correlação significativa com o tempo de diagnóstico. Porém, níveis elevados dos marcadores tiveram associação com a presença de metástase (IL'YASOVA *et al*, 2005).

Kato e colaboradores também não conseguiram estabelecer a utilidade clínica da dosagem de PCR no soro para o screening do CaP (KATO *et al*, 2006).

O estudo de McArdle *et al* (2004) avaliou que não há diferença significativa nas concentrações de PCR e IL-6 quando se compara pacientes com doença benigna e pacientes com CaP. O aumento do escore de Gleason

correlaciona-se com o aumento dos níveis de PCR, IL-6 e PSA. Não foi observada a correlação entre PSA e PCR ou IL-6 (McARDLE *et al*, 2004).

Platz *et al* avaliaram a PCR como um possível marcador para risco de desenvolvimento do câncer prostático. A concentração da PCR foi mensurada por método imunoturbidimétrico em grupo controle e no grupo casos. Os resultados obtidos no estudo demonstraram que apesar da média das concentrações da proteína ser mais baixa nos controles, ela não foi estatisticamente diferente da média obtida nos casos, indicando que não há associação entre a concentração da PCR e o risco de câncer (PLATZ *et al*, 2004).

3.6 Albumina Modificada pela Isquemia

A albumina sérica é um peptídeo composto por 585 aminoácidos e 66500 daltons. Possui uma seqüência característica de aminoácidos que é específica de humanos, com um grupamento amino-terminal. Esse grupamento amino-terminal tem a capacidade de se ligar a metais de transição, como o Co(II), Cu(II) e Ni(II). O local de ligação dos metais à albumina sérica humana é particularmente susceptível a degradação (BAR-OR *et al*, 2000).

Foi observado que ocorre redução da ligação da albumina ao cobalto no soro de pacientes com síndrome coronariana aguda (angina instável ou síndrome coronariana aguda) (BAR-OR *et al*). Isso ocorre porque durante uma situação de isquemia há perda ou alteração na porção amino-terminal da albumina, assim ela passa a ser chamada de Albumina Modificada pela Isquemia (IMA) (BAR-OR *et al*, 2000; SINHA *et al*, 2004).

A albumina modificada pela isquemia (IMA) é um marcador de isquemia pela possibilidade de ser detectado no sangue depois de uma lesão isquêmica, como a isquemia do miocárdio (BAR-OR *et al*, 2000; SINHA *et al*, 2004).

Bar-Or *et al* (2000) desenvolveram um método colorimétrico para a avaliação quantitativa da IMA através da propriedade desta proteína deixar de se ligar ao cobalto após a alteração da porção amino-terminal. Este teste determina a quantidade de cobalto não ligado à albumina através da absorbância da amostra. O estudo avaliou pacientes com isquemia do miocárdio e propôs que valores de

absorbância acima de 0,400 são positivos para isquemia e valores abaixo deste limite são negativos (BAR-OR *et al*, 2000).

Estudos têm demonstrado que a IMA é útil como um marcador de isquemia em casos de infarto agudo do miocárdio por ser de detecção mais precoce no sangue quando comparado a marcadores utilizados atualmente (BAR-OR *et al*, 2000; SINHA *et al*, 2004; MELANSON & TANASIJEVIC, 2005). De acordo com SINHA *et al* (2004), a IMA mostrou ser mais sensível para infarto agudo do miocárdio do que o eletrocardiograma e a troponina T, sendo proposto que a proteína fosse o padrão ouro para isquemia do miocárdio (SINHA *et al*, 2004).

Apesar da boa sensibilidade, a IMA não é específica para o tecido miocárdico, podendo estar elevada em outras condições em que há isquemia em qualquer outro tecido, como foi observado após exercício físico vigoroso devido à isquemia do músculo esquelético (SINHA *et al*, 2004).

Além dessas situações, também foi observado por Turedi *et al* (2007) que a IMA apresenta concentração aumentada em pacientes com embolia pulmonar. O estudo que envolveu um grupo de pacientes com diagnóstico de embolia pulmonar e um grupo controle de voluntários saudáveis mostrou diferença significativa na determinação da IMA. Foi sugerido que a proteína pode auxiliar no diagnóstico da doença, reduzindo a necessidade da utilização de técnicas por imagem ou invasivas que são mais caras, demoradas e podem causar complicações. O valor de absorbância para a exclusão de embolia pulmonar foi determinado em 0,540 no mesmo estudo (TUREDI *et al*, 2007).

Cichota *et al* (2008) realizaram um estudo avaliando os níveis de IMA em pacientes com anemia associada à doença renal crônica. Os resultados mostraram que os pacientes obtiveram concentração maior da proteína quando comparados ao grupo controle, sugerindo que a hipóxia causada pelo baixo nível de hemoglobina pode ser a causa do aumento da formação da IMA (CICHOTA *et al*, 2008).

Os mecanismos envolvidos na alteração da albumina pela isquemia/reperfusão incluem exposição tecidual à hipóxia, acidose, dano por radicais livres, disfunções da bomba de membrana dependente de sódio e cálcio e exposição a íons livres de ferro e cobre (BAR-OR *et al*, 2000; MELANSON *et al*, 2005).

O estresse oxidativo e eletrofílico pode ser derivado da hipóxia tecidual, além de outras situações, como o aumento do metabolismo celular, disfunção

mitocondrial e intoxicações provenientes do ambiente ou da alimentação. Além disso, outra fonte de espécies reativas de oxigênio provém de células inflamatórias fagocíticas que liberam esses compostos a fim de erradicar organismos infecciosos (DE MARZO *et al*, 2003).

Por ser a proteína de maior quantidade no plasma, a albumina acaba sendo o alvo de modificações durante o estresse oxidativo. (OETTL *et al*, 2007). Espécies reativas de oxigênio modificam a porção amino-terminal da albumina. A exposição *in vitro* da albumina ao radical hidroxil fez aumentar a concentração da IMA rapidamente (ROY *et al*, 2006) Além disso, a exposição ao radical peróxido também alterou a estrutura da albumina, aumentando a proporção de dissulfeto. (OETTL *et al*, 2007).

A prevalência do câncer de próstata parece estar aumentada em pacientes que são expostos a certos agentes oxidantes e eletrofílicos. Os radicais de oxigênio podem atacar o DNA, o que pode resultar num acúmulo de bases de DNA oxidadas potencialmente promutagênicas. O estresse oxidativo crônico pode resultar em peroxidação lipídica e gerar vários outros produtos reativos com capacidade de danificar o DNA. De acordo com esse modelo de carcinogênese, agentes antioxidantes atuam como protetores contra o CaP, muitos são provenientes da dieta, como licopeno, vitamina E e selênio (DE MARZO *et al*, 2003).

3.7 Grupo Sanguíneo ABO

Antígenos eritrocitários são estudados desde o início do século XX, e atualmente são reconhecidos mais de 250 antígenos eritrocitários diferentes. Inicialmente foram identificados como estruturas químicas encontradas na superfície dos eritrócitos e depois foram encontradas também nas demais células e secreções do organismo. (ZAGO *et al*, 2001; BATISSOCO e NOVARETTI, 2003, LE PENDU, 2001, YAMAMOTO, 2004).

O mais importante dos grupos sanguíneos é o sistema ABO. É encontrada sua importância em outros aspectos além da medicina transfusional através de estudos genéticos, de química dos carboidratos, transplante de órgãos, forense, enzimologia, biologia molecular, celular e do câncer. (YAMAMOTO, 2004)

Os antígenos A e B são carboidratos sintetizados por uma série de reações enzimáticas catalizadas por enzimas denominadas glicosiltransferases (HENRY, 1999; BATISSOCO e NOVARETTI, 2003; LEE e REID, 2000; OLSON *et al*, 2001).

A expressão dos antígenos do grupo sanguíneo ABO é controlada por vários conjuntos independentes de genes: o *locus* ABO localizado no braço longo do cromossomo 9 e o gene H determinado no cromossomo 19 (HENRY, 1999; BATISSOCO e NOVARETTI, 2003; LEE e REID, 2000; OLSON *et al*, 2001).

Inicialmente o gene H produz transferase que fixa L-fucose ao segundo carbono do terminal galactose das cadeias de oligossacarídeos do tipo 1 ou 2. As cadeias do tipo 1 predominam nas glândulas secretoras e as cadeias do tipo 2 são as únicas presentes nos eritrócitos (HENRY, 1999; BATISSOCO e NOVARETTI, 2003; LEE e REID, 2000; OLSON *et al*, 2001).

O antígeno H é o substrato básico para a ação das transferases codificadas pelos genes A e B e ele pode ser encontrado tanto nas hemáceas quanto nas secreções (HENRY, 1999).

Em seguida as transferases são responsáveis pela transferência dos resíduos específicos de açúcar N-acetil-D-galactosamina ou D-galactose ao substrato H, convertendo-os em antígenos A ou B, respectivamente, originando a heterogeneidade fenotípica do sistema ABO (BATISSOCO, 2003).

A enzima N-acetilgalactosaminiltransferase, codificada pelo gene A, apresenta uma N-acetilgalactosamina unida por ligação α (1-3) à galactose terminal do antígeno H, enquanto a D-galactosaminiltransferase, codificada pelo gene B, apresenta uma D-galactose ligada nesta posição (HENRY, 1999, YAMAMOTO, 2004).

O gene O origina-se da falta das transferases A ou B e portanto não modifica o antígeno H, sendo este o antígeno encontrado nas hemáceas do grupo sanguíneo O, enquanto o gene AB origina-se da produção tanto da transferase A quanto da B (HENRY, 1999; BATISSOCO e NOVARETTI, 2003).

Os antígenos dos grupos sanguíneos possuem aloanticorpos específicos que são de ocorrência natural, provavelmente como resultado da estimulação contínua ou ocasional por antígenos promíscuos presentes em abundância no ambiente ou devido à aloimunização em decorrência de transfusão ou gravidez (ZAGO *et al*, 2001; YAMAMOTO, 2004).

Na próstata, os antígenos ABO são expressos nas células do epitélio glandular de acordo com o tipo sanguíneo de cada indivíduo. Nestas células a visualização ocorre no citoplasma, na região apical (RAVN, 2000).

3.7.1 Associação entre antígenos ABO e câncer

Vários trabalhos têm relacionado a maior frequência de alguns tipos de câncer e outras doenças com a expressão de determinado grupo sanguíneo, com prognóstico mais ou menos favorável (RAVN, 2000; LE PENDU, 2001).

Jesch *et al* em 2007 determinaram a significância entre diferentes grupos sanguíneos e algumas patologias e encontraram significativas associações. Indivíduos do grupo O têm mais chance de desenvolver gastrite, colite ulcerosa e duodenite enquanto que homens do grupo A tendem a sofrer mais de tumores. Em relação a tumores intestinais, as mulheres do grupo A e homens do grupo O têm mais chances de desenvolvê-lo.

Um estudo na China (SU *et al*, 2001) associou indivíduos masculinos do grupo B com um maior risco de desenvolver câncer da cárdia. O mesmo estudo demonstrou que indivíduos do grupo B têm maior probabilidade de desenvolver câncer no terço superior do esôfago.

De acordo com um estudo de You *et al* (2000), há uma associação entre indivíduos do grupo A e lesões pré-cancerosas gástricas.

Observando-se as relações de grupo sanguíneo A/O e B/O, há um maior risco de câncer de pulmão e de brônquios, respectivamente, de acordo com Roots *et al* (1988).

Segundo Vioque e Walker (1991), ao avaliarem a relação entre câncer pancreático e grupo sanguíneo, há um risco modesto entre pessoas do grupo A desenvolverem a doença; por outro lado, Annese *et al*(1990) demonstraram um número aumentado de casos de câncer pancreático em pacientes do grupo B e um número reduzido em pacientes do grupo O.

Um estudo piloto intitulado “Relação entre resultados de PSA e grupos sanguíneos ABO: uma amostra de 2521 pacientes” mostrou um maior risco de

pacientes do grupo sanguíneo B desenvolverem adenocarcinoma prostático (BECKER *et al*, 2003).

Além da maior prevalência de um tipo de grupo sanguíneo em determinada neoplasia, alguns estudos demonstram que as células neoplásicas perdem ou diminuem a expressão dos antígenos A ou B, dependendo do grupo sanguíneo do paciente. Esse acontecimento se correlaciona com o desenvolvimento e agressividade da doença. (YAMAMOTO, 2004; HAKOMORI, 1999)

A perda da expressão dos antígenos A e B aumentam a motilidade celular, facilitando a ocorrência de metástases, enquanto que a presença do antígeno H aumenta a resistência à apoptose.(LE PENDU, 2001).

Em 1990, Perlman e Epstein demonstraram que os antígenos de grupo sanguíneo poderiam atuar como marcadores na oncogênese. O estudo analisou a expressão dos antígenos A e B no tecido prostático utilizando anticorpos monoclonais e evidenciou a sua ausência em células de adenocarcinomas e displasias, suportando a idéia de que algum distúrbio enzimático das transferases ocorrera.

Aguiar *et al* (2002) avaliaram a distribuição da expressão dos antígenos ABH correlacionando com as alterações histopatológicas de pacientes com gastrite crônica e concluíram que “os antígenos de grupos sanguíneos refletem padrões diferentes de diferenciação celular, constituindo-se de potenciais marcadores, utilizáveis no diagnóstico e prognóstico de diversas doenças gástricas”.

Amostras de tecido gástrico foram avaliadas por método imunohistoquímico para determinar a distribuição de antígenos ABO. Comparando casos de neoplasia com casos sem neoplasia gástrica, foi observado que ocorreu perda focal dos antígenos ABO, enquanto que o tecido normal apresentou os antígenos no epitélio foveolar (HIROHASHI, 1984a). A mesma forma de estudo de distribuição dos antígenos ABO foi realizada no tecido pulmonar normal e com um tipo de adenocarcinoma. Os antígenos A, B e H foram reduzidos ou ausentes nas células neoplásicas (HIROHASHI, 1984b).

A análise imunohistoquímica para a pesquisa de antígenos sanguíneos A e B em amostras benignas e malignas do urotélio da bexiga demonstrou a perda da expressão dos antígenos naqueles com doença maligna. Nessas células houve perda da atividade das transferases específicas dos carboidratos A e B (ORNTOFT *et al*, 1988). Em 1996 o mesmo grupo de pesquisa avaliou o mecanismo para a

perda da atividade das glicosiltransferases A e B dos antígenos sanguíneos. Através da metodologia da reação em cadeia da polimerase, a presença do RNAm do ABO ocorreu apenas no urotélio normal e em tumores de baixo grau enquanto que em tumores de alto grau estava ausente, sugerindo que a glicosilação dos antígenos ABO é regulada a nível de RNAm e que o mecanismo associado com a proliferação celular desencadeia a diminuição do RNAm. (ORNTOFT, 1996)

Na análise de carcinomas orais foi observada a perda da expressão dos antígenos A e B nas lesões. Além disso, os autores também analisaram o genótipo do grupo sanguíneo e observaram que em alguns casos houve perda dos alelos do grupo ABO, e por isso não havia a expressão no tecido. Os autores defendem a idéia de que a perda dos antígenos nas células carcinomatosas é uma alteração precoce e a modificação de seus precursores genéticos é um evento tardio do desenvolvimento neoplásico. (GAO *et al*, 2004)

De acordo com Le Pendu (2001) a localização do gene ABO no cromossomo 9 é uma região sensível a sofrer rearranjos e principalmente perda da heterozigosidade. Dessa forma, existem duas hipóteses que tentam explicar a ocorrência desse fenômeno. Foi observada a perda das transferases responsáveis pela transferência dos açúcares na superfície da células e a correspondente ausência da síntese do RNAm em biópsias de tumor. A outra hipótese é explicada pela metilação do gene, que seria responsável pela ausência da transcrição do gene ABO. (LE PENDU, 2001; YAMAMOTO, 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A realização do trabalho ocorreu em duas partes. A primeira etapa (Parte I) foi caracterizada pela pesquisa dos antígenos A e B de grupo sanguíneo no tecido prostático. A segunda (Parte II) constituiu-se das dosagens sorológicas de PSA, IMA, PCR e prova reversa para tipagem sanguínea. As Partes I e II não foram realizadas nos mesmos pacientes voluntários.

Todos os pacientes concordaram com a participação na pesquisa, tendo assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (Número do processo: 23081.007785/2006-98; Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 0047.0.246.000-06) e sua privacidade foi mantida. Os critérios de exclusão foram a presença de outra situação clínica que altere as dosagens realizadas, como cardiopatia, neoplasias e hiperplasias além da prostática, histórico de IAM (Infarto agudo do miocárdio) ou AVC (acidente vascular cerebral), condições inflamatórias de qualquer natureza e a não concordância de o paciente participar da pesquisa.

A participação na pesquisa não ofereceu riscos à saúde ou desconforto aos pacientes.

4.1 Parte I – Avaliação Imunohistoquímica

4.1.1 Pacientes

Para a realização da pesquisa imunohistoquímica dos antígenos sanguíneos A e B foram selecionados pacientes com indicação de biópsia prostática para diagnóstico de câncer ou prostatectomia. Foram utilizados todos os pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma prostático ou hiperplasia prostática do serviço de patologia do Hospital Universitário de Santa Maria, no período de janeiro a agosto de 2007. O tempo de coleta foi determinado a partir da disponibilidade, para a

realização de todas as etapas. Participaram da pesquisa 9 pacientes com CaP e 7 pacientes com hiperplasia prostática. O grupo sanguíneo dos pacientes foi obtido através de dados do Banco de Sangue do mesmo hospital.

4.1.2 Procedimento Laboratorial

O procedimento laboratorial da técnica imunohistoquímica está baseado em Alves *et al* (1999) e é de rotina no laboratório de imunohistoquímica do HUSM (Hospital Universitário de Santa Maria)

Após a retirada do tecido prostático por biópsia ou prostatectomia, ele foi acondicionado em recipiente adequado e enviado em formol para o Laboratório de Imunohistoquímica do HUSM. O formol atua como um fixador e conservador da forma e estrutura do tecido.

O tecido prostático foi então colocado no processador automático de tecidos, responsável pela desidratação, diafanização e impregnação da parafina. A desidratação é realizada com etanol e tem por fim retirar a água presente no tecido. Na diafanização o etanol é substituído por xilol, um dissolvente da parafina. A impregnação por parafina consiste na substituição do xilol por parafina, dando resistência ao tecido, por ser sólida à temperatura ambiente. Logo após foi feito o preparo do bloco para a execução dos cortes.

Foram realizados cortes histológicos de espessura de 3 micrômetros no micrótomo, obtendo uma fita de parafina. Para cada paciente foram realizados 3 cortes histológicos. Um corte para anti-A, um para anti-B e o terceiro foi utilizado como controle negativo sem utilizar anticorpo primário. A fita de parafina foi colocada em banho-maria histológico e os cortes foram depositados em lâminas de vidro previamente lavadas e tratadas com ATPS (aminopropil sílica).

As lâminas foram levadas à estufa a 60°C por 24h para ocorrer adesão do tecido. Após a retirada da estufa foi realizada a desparafinização do tecido, mergulhando as lâminas em xilol quente (60°C) por 30 min e depois em xilol a temperatura ambiente por 5 min.

Depois as lâminas foram hidratadas. Para a hidratação as lâminas foram mergulhadas em uma série de diferentes concentrações de etanol: 96, 90, 80 e 70GL durante 1 minuto em cada concentração.

As lâminas foram lavadas por 3 min em água corrente e deixadas em água destilada por 1 minuto (lavagem padrão).

As lâminas com os cortes histológicos estão, desta forma, prontas para a realização da Técnica de Imunoperoxidase – Método Estreptavidina-Biotina.

A imunoperoxidase indireta é um tipo de técnica imunoenzimática introduzida em 1966 por Avrameas e Uriel e por Nakane e Pierce com a finalidade de detectar e localizar antígenos celulares utilizando microscopia óptica comum. O anticorpo que reage com o antígeno em estudo possui ligação covalente com a enzima peroxidase. A enzima converte o componente cromógeno adicionado (substrato + doador de hidrogênio) em produto insolúvel, o qual é visível ao microscópio óptico. É uma técnica bastante utilizada por ser de fácil realização, fornecer resultados satisfatórios e reprodutíveis, além de fornecer preparações duradouras (FERREIRA e ÁVILA, 2001). O procedimento completo da técnica e modo de preparo das soluções reagentes podem ser visualizados no Apêndice B.

4.2 Parte II – Avaliação Sorológica

4.2.1 Pacientes

A determinação da Proteína C Reativa (PCR), da Albumina Modificada pela Isquemia (IMA) e a tipagem sanguínea foi realizada em soro de 249 pacientes com solicitação médica de dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA) que concordaram em cedê-lo para a pesquisa durante o período de julho a outubro de 2007. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos e o soro sobrenadante foi separado, acondicionado em tubos e congelado a -20°C até o momento da realização das técnicas. A situação clínica dos pacientes foi obtida através da pesquisa dos prontuários no HUSM (Hospital Universitário de Santa Maria).

Participaram da pesquisa 249 pacientes, sendo divididos em quatro grupos de acordo com a situação clínica: Controle, com 18 pacientes; HBP, com 102 pacientes; CaP, com 84 pacientes e Pós-Tratamento (PT), com 45 pacientes.

4.2.2 Procedimento Laboratorial

A determinação da IMA foi realizada conforme técnica descrita por Bar-Or *et al* (2000). Em um tubo de vidro foi adicionado 25 µl de cloreto de cobalto 0,1% e 100 µl de soro, a mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 10 minutos para a ligação entre albumina e cobalto. 25 µl de DTT foi adicionado como reagente de core a reação foi cessada 2 minutos após através da adição de 500 µl de cloreto de sódio 0,9%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 470 nm, comparando com o branco de cada amostra sem DTT. O resultado foi reportado como unidades de absorbância (UABS)

A dosagem da PCR foi realizada em soro por método imunoturbidimétrico com intensificação de partículas automatizado em equipamento Cobas Integra 400 plus (Roche) utilizando a cassete COBAS INTEGRA C-Reactive Protein (Latex) (CRPLX) (Roche). A PRC humana aglutina-se a partículas de látex revestidas com anticorpos anti-PCR monoclonais. O precipitado é determinado turbidimetricamente a 552 nm. O resultado foi dado em miligramas por litro (mg/l) e o valor de referência considerado é até 5 mg/l como normal conforme estipulado pelo kit utilizado.

Os valores de PSA foram obtidos através de registros do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM que realizou a dosagem em cada paciente devido a solicitação médica. O resultado foi expresso em nanogramas por mililitros (ng/ml).

A determinação da tipagem sanguínea ABO foi realizada através da técnica de tipagem reversa pela pesquisa de anticorpos presentes no soro do paciente. Para tal foi utilizado reagentes de hemáceas-teste para prova reversa DiaCell ABO (DiaMed) de acordo com as especificações da bula do reagente.

4.3 Materiais utilizados na realização da técnica

Lâminas de vidro

Lamínulas de vidro

Balança

Processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica)

Micrótomo (HM320, Leica)

Banho-maria histológico

Estufa a 60°C

Estufa a 37°C

Refrigerador (2-8°C)

Microondas

Câmara úmida

Pipetador automático

Ponteiras

Água destilada

Parafina

Xilol

Etanol

Peróxido de hidrogênio 3% (solução comercial)

Leite desnatado

Clara de ovo

Anticorpo primário (anti-A e anti-B)

Sistema de detecção ultraestreptavidina (kit LSAB)

Solução PBS

Solução tampão PBS-diluente

Solução substrato cromogênico (reveladora)

Solução tampão citrato 10mM pH 6,0

Solução de ATPS (aminopropilsilica) a 4% em acetona

Hematoxilina

Microscópio óptico

Tubos de ensaio

Cloreto de Sódio

Cloreto de Cobalto

Ditiotreitol

Espectrofotômetro

Centrífuga de tubos

Cobas Integra 400 plus (Roche)

Cassete COBAS INTEGRA C-Reactive Protein (Latex) (CRPLX) (Roche)

Reagentes de hemáceas-teste para prova reversa DiaCell ABO (DiaMed)

4.4 Análise Estatística

Na análise estatística foi inicialmente verificada a normalidade das variáveis pelos testes de Lilliefors e Shapiro Wilks e depois a análise não paramétrica pelos testes de Kruscal-Wallis e teste U de Mann-Whitney para comparações duas a duas. Foi realizado o teste de qui-quadrado para os cruzamentos. O software utilizado foi o Statistica 7.0.

5. RESULTADOS

5.1 Parte I

Na análise imunohistoquímica para detecção de antígenos eritrocitários A e B no tecido prostático foram analisados 16 pacientes, sendo que 9 com diagnóstico de adenocarcinoma prostático e 7 com hiperplasia prostática. A tipagem sanguínea dos pacientes mostrou que daqueles com CaP, 4 são do grupo O, 2 do grupo B e 4 do grupo A enquanto que daqueles com HBP 4 são do grupo O, 2 do grupo B e 1 do grupo A. Os dados aparecem na Tabela 1.

A realização da técnica IHQ, utilizando ora anti-A como anticorpo primário, ora anti-B como anticorpo primário, mostrou que os pacientes O tanto com CaP ou com HBP não apresentaram coloração na visualização microscópica da lâmina. Os pacientes com HBP dos grupos A ou B apresentaram coloração após a utilização do anticorpo anti-A ou Anti-B, respectivamente. A localização dos antígenos foi visualizada na região apical do citoplasma das células glandulares acinares. Já os pacientes com CaP do grupo A ou B não apresentaram coloração após a utilização do anticorpo primário anti-A ou anti-B, mostrando que houve perda da expressão dos antígenos A e B nas células neoplásicas prostáticas.

Tabela 1 – Número de pacientes com HBP e CaP por tipagem sanguínea e reatividade imunohistoquímica

	Tipagem sanguínea	Nº de amostras	Imunomarcação
HBP	O	4	Negativa
	B	2	Positiva
	A	1	Positiva
CaP	O	4	Negativa
	B	2	Negativa
	A	3	Negativa

HBP – Hiperplasia benigna prostática; CaP – Câncer de Próstata

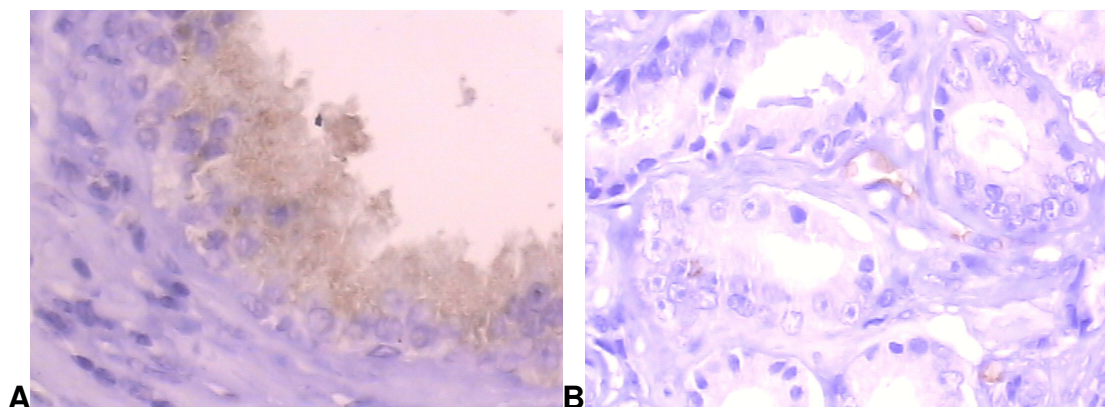


Figura 6 - A. Paciente com HBP e do grupo sanguíneo A mostrando imunomarcação após a utilização do anticorpo anti-A. B. Paciente com CaP e do grupo sanguíneo A não mostra imunomarcação após a utilização do anticorpo anti-A.

5.2 Parte II

Para a avaliação sorológica de PSA, IMA e PCR participou do estudo um total de 249 pacientes. Eles foram divididos em 4 grupos: Controle; HBP; CaP e Pós-tratamento (PT) para os pacientes que já haviam recebido tratamento para CaP, com 18, 102, 84 e 45 pacientes, respectivamente.

Inicialmente os valores obtidos a partir das dosagens foram analisados como média e desvio padrão. Depois foi realizada uma abordagem, avaliando os resultados em faixas de concentrações para PSA e IMA, de acordo com valores de referência preconizados. Para PSA foram utilizadas as faixas de concentração de 0 a 4 ng/ml, 4 a 10 ng/ml e acima de 10 ng/ml e para IMA foram analisados os valores como abaixo ou acima de 0,400 UABS.

5.2.1 Análise dos valores de PSA e marcadores inflamatórios na população estudada

A primeira etapa avaliou as médias de PSA, IMA, PCR e idade para cada grupo e os resultados podem ser visualizados na tabela 2.

O grupo Controle apresentou os menores resultados médios para as 4 variáveis analisadas (PSA, IMA, PCR e idade).

Avaliando juntamente todos os grupos sanguíneos na dosagem do PSA, obteve-se resultados inferiores a 2,5 ng/ml para os pacientes do grupo controle e para o grupo que já recebeu tratamento efetivo para CaP. Os valores elevados de PSA foram observados em pacientes com CaP ou HBP, com resultados superiores a 4 ng/ml.

O valor do PSA no grupo controle (1,13 ng/ml) diferiu significativamente do grupo HBP (18,69 ng/ml) e do grupo CaP (134,68 ng/ml), mas não diferiu do grupo PT (1,29 ng/dl). O grupo com HBP diferiu do grupo CaP.

Para a IMA, o maior valor encontrado foi para pacientes com HBP (0,415 UABS), estatisticamente diferente do grupo controle (0,312 UABS), mas sem diferença significativa dos grupos CaP (0,376 UABS) e PT (0,395 UABS).

A PCR não mostrou diferença significativa entre os 4 grupos Controle, HBP, CaP e PT, sendo que a média das análises mostrou valores inferiores a 5 mg/l, sendo considerados normais.

A média das idades aumentou progressivamente nos grupos HBP (67,77 anos), CaP (69,96 anos) e PT (68,87 anos). Apesar do grupo controle ser diferente dos demais, se encontra acima de 50 anos e na faixa de risco para a doença.

Tabela 2 – Dados gerais dos pacientes participantes em relação às variáveis PSA, IMA, PCR e idade

	PSA (ng/ml) (249)*	IMA (UABS) (236)	PCR (mg/l) (110)	IDADE (anos) (248)
Controle (18)	1,13 ± 1,29** c***	0,312 ± 0,16 b	0,41 ± 0,35 a	53,65 ± 11,61 c
HBP (102)	18,69 ± 115,65 b	0,415 ± 0,16 a	0,78 ± 1,15 a	67,77 ± 8,64 b
CaP (84)	134,68 ± 745,17 a	0,376 ± 0,16 a b	1,70 ± 2,84 a	69,96 ± 12,77 a
PT (45)	1,29 ± 2,09 c	0,395 ± 0,16 a b	1,31 ± 2,66 a	68,87 ± 7,58 a b

*Os números entre parênteses indicam o valor absoluto de participantes em cada grupo.** Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. ***Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$). A letra a é sempre o valor mais elevado.

PSA: Antígeno Prostático Específico, IMA: Albumina Modificada pela Isquemia, PCR: Proteína C Reativa

Na variável IMA, a sua determinação foi realizada com menor número de amostra devido à insuficiência de amostra para a realização da técnica. Para a análise da PCR, o número da amostra foi menor devido à falta de reativo para que a totalidade das amostras pudessem ser processadas e de um paciente não foi obtida a idade.

5.2.2 Variações dos valores de PSA, IMA e PCR relacionados à tipagem sanguínea ABO

A tipagem sanguínea mostrou que 123 pacientes eram do tipo O, 92 do tipo A, 21 do tipo B e 10 do tipo AB. A figura 7 mostra o gráfico do número de pacientes de acordo com a tipagem sanguínea nos grupos estudados.

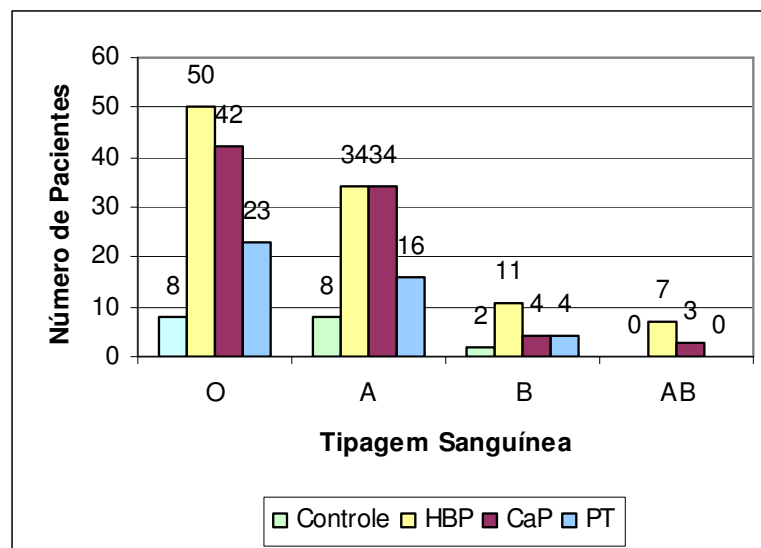


Figura 7 – Gráfico do número de pacientes em relação à tipagem sanguínea e aos grupos estudados

HBP: Hiperplasia Benigna Prostática, CaP: Câncer de Próstata, PT: Pós-tratamento

A dosagem de PSA nos pacientes do grupo O foi de acordo com a análise de todos os pacientes. O grupo Controle (0,93 ng/ml) não foi significativamente diferente do grupo PT (1,50 ng/ml), ambos com resultados considerados dentro da

faixa normal, mas foi estatisticamente diferente dos grupos HBP (27,80 ng/ml) e CaP (40,00 ng/ml), ambos com valores alterados acima de 4 ng/dl mas estatisticamente diferentes entre si.

A análise da IMA mostrou que o grupo Controle (0,275 UABS) é diferente do grupo HBP (0,440 UABS), mas não dos grupos CaP (0,415 UABS) e PT (0,385 UABS).

A PCR não mostrou diferença significativa entre os grupos Controle (0,49 mg/l), HBP (0,80 mg/l), CaP (1,62 mg/l), e PT (0,74 mg/l), todos com valores na faixa normal.

Em relação à idade no tipo sanguíneo O, o grupo Controle (53,50 anos) apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos que apresentaram idade mais elevada, sendo todos acima de 50 anos.

A relação das médias das dosagens de PSA, IMA, PCR e idade nos grupos Controle, HBP, CaP e PT para os pacientes do grupo sanguíneo O está na tabela 3.

Tabela 3 - Dados dos pacientes do grupo sanguíneo O em relação às variáveis PSA, IMA, PCR e idade

	PSA (ng/ml) (123)*	IMA (UABS) (118)	PCR (mg/l) (53)	IDADE (anos) (123)
Controle (8)	0,93 ± 0,55** c***	0,275 ± 0,15 b	0,49 ± 0,44 a	53,50 ± 12,49 b
HBP (50)	27,80 ± 161,83 b	0,440 ± 0,15 a	0,80 ± 1,17 a	68,54 ± 8,05 a
CaP (42)	40,00 ± 96,83 a	0,399 ± 0,16 a b	1,62 ± 2,64 a	70,19 ± 13,19 a
Ptrat (23)	1,50 ± 2,17 c	0,385 ± 0,15 a b	0,74 ± 0,83 a	69,52 ± 8,22 a

*Os números entre parênteses indicam o valor absoluto de participantes em cada grupo.** Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. ***Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

PSA: Antígeno Prostático Específico, IMA: Albumina Modificada pela Isquemia, PCR: Proteína C Reativa

Nos pacientes do grupo sanguíneo A a média das concentrações de PSA mostrou que todos os grupos foram estatisticamente diferentes uns dos outros. O grupo PT apresentou os menores valores (0,53 ng/ml), seguido dos grupos Controle (1,44 ng/ml), HBP (12,54 ng/ml) e CaP (280,69 ng/ml).

A determinação da IMA mostrou que a média do grupo CaP foi a mais baixa (0,343 UABS) e o grupo PT a mais elevada (0,453 UABS), sendo estatisticamente diferentes. Os grupos controle (0,377 UABS) e HBP (0,398 UABS) apresentaram resultados intermediários e não diferentes dos demais grupos.

As médias de PCR nos 4 grupos também não mostraram diferença significativa para os pacientes com tipagem sanguínea A, todos com resultados nos valores de referência.

Em relação à idade, os pacientes do grupo sanguíneo A mostraram diferença significativa com o grupo controle, que apresentou idade mais baixa.

A relação das médias das dosagens de PSA, IMA, PCR e idade nos grupos Controle, HBP, CaP e PT para os pacientes do grupo sanguíneo A está na tabela 4.

Tabela 4 - Dados dos pacientes do grupo sanguíneo A em relação às variáveis PSA, IMA, PCR e idade

	PSA (ng/ml) (92)*	IMA (UABS) (84)	PCR (mg/l) (43)	IDADE (anos) (91)
Controle (8)	1,44 ± 0,80** c***	0,377 ± 0,18 a b	0,39 ± 0,30 a	55,71 ± 11,69 c
HBP (34)	12,54 ± 42,11 b	0,398 ± 0,17 a b	0,86 ± 1,22 a	67,24 ± 10,00 a b
CaP (34)	280,69 ± 1160,95 a	0,343 ± 0,16 b	1,89 ± 3,33 a	71,29 ± 7,48 a
Ptrat (16)	0,53 ± 0,68 d	0,453 ± 0,69 a	2,08 ± 3,90 a	66,38 ± 6,76 b

*Os números entre parênteses indicam o valor absoluto de participantes em cada grupo.** Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. ***Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

PSA: Antígeno Prostático Específico, IMA: Albumina Modificada pela Isquemia, PCR: Proteína C Reativa

Os grupos dos pacientes com tipagem sanguínea B apresentaram média das concentrações de PSA significativamente iguais, apesar da variação entre resultados considerados normais (< 4 ng/dl) e alterados (> 4 ng/dl). As médias mais elevadas estão nos grupos HBP (6,14 ng/ml) e CaP (18,35 ng/ml) e as mais baixas nos grupos Controle (0,67 ng/ml) e PT (2,46 ng/ml).

Os pacientes do grupo sanguíneo B não apresentaram diferença nas médias da determinação da IMA e o maior resultado ocorreu no grupo CaP (0,426 UABS).

Com relação à PCR, os 4 grupos mostraram média das dosagens sem diferenças, sendo que a concentração mais elevada foi no grupo CaP (1,32 mg/l), mas ainda considerado normal.

A relação das médias das dosagens de PSA, IMA, PCR e idade nos grupos Controle, HBP, CaP e PT para os pacientes do grupo sanguíneo B está na tabela 5.

Tabela 5 - Dados dos pacientes do grupo sanguíneo B em relação às variáveis PSA, IMA, PCR e idade

	PSA (ng/ml) (21)*	IMA (UABS) (21)	PCR (mg/l) (12)	IDADE (anos) (21)
Controle (2)	0,67 ± 0,06** a***	0,344 ± 0,19 a	0,21 ± 0,20 a	47,00 ± 11,31 a
HBP (11)	6,14 ± 5,84 a	0,325 ± 0,77 a	0,75 ± 1,39 a	67,36 ± 8,46 a b
CaP (4)	18,35 ± 31,04 a	0,426 ± 0,15 a	1,32 ± 1,89 a	51,25 ± 30,35 b
Ptrat (4)	2,46 ± 4,58 a	0,329 ± 0,15 a	0,51 ± 0,13 a	75,75 ± 4,11 a

*Os números entre parênteses indicam o valor absoluto de participantes em cada grupo.** Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. ***Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

PSA: Antígeno Prostático Específico, IMA: Albumina Modificada pela Isquemia, PCR: Proteína C Reativa

Para o grupo sanguíneo AB, houve pacientes apenas para os grupos HBP e CaP e não houve amostra de soro suficiente para a determinação da PCR.

Os grupos HBP (3,25 ng/ml) e CaP (0,38 ng/ml) mostraram-se diferentes em relação à dosagem de PSA.

A IMA não se mostrou diferente nos grupos HBP (0,450 UABS) e CaP (0,423 UABS) nos pacientes AB.

A idade foi estatisticamente diferente entre os 2 grupos, sendo mais baixa nos pacientes com HBP (65,57 anos) em relação àqueles com CaP (79 anos).

A relação das médias das dosagens de PSA, IMA e idade nos grupos HBP e CaP para os pacientes do grupo sanguíneo AB está na tabela 6.

Tabela 6 - Dados dos pacientes do grupo sanguíneo AB em relação às variáveis PSA, IMA e idade

	PSA (ng/ml) (10)*	IMA (UABS) (10)	IDADE (anos) (10)
HBP (7)	3,25 ± 1,03** a***	0,450 ± 0,15 a	65,57 ± 6,78 a
CaP (3)	0,38 ± 0,06 b	0,423 ± 0,14 a	79,00 ± 4,36 b

*Os números entre parênteses indicam o valor absoluto de participantes em cada grupo.** Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. ***Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

PSA: Antígeno Prostático Específico, IMA: Albumina Modificada pela Isquemia

5.2.3 Variações de PSA, marcadores inflamatórios entre os grupos ABO nas diferentes alterações prostáticas

Foi realizada comparação dos valores de PSA, IMA, PCR e idade entre os diferentes grupos sanguíneos (TS) nos 4 grupos analisados, Controle, HBP, CaP e PT. Os resultados são mostrados nas tabelas 7, 8, 9 e 10.

A tabela 7 mostra os resultados do grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos sanguíneos A, B e O na análise das variáveis PSA, IMA, PCR e idade.

Tabela 7 – Comparação entre os grupos sanguíneos para as variáveis PSA, IMA, PCR e idade no grupo controle

TS	PSA (ng/ml)	IMA (UABS)	PCR (mg/l)	IDADE (anos)
A	1,44 a	0,341 a	0,39 a	55,71 a
B	0,67 a	0,344 a	0,21 a	47,00 a
O	0,93 a	0,275 a	0,49 a	53,50 a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

TS: Tipagem Sanguínea, PSA: Antígeno Prostático Específico, IMA: Albumina Modificada pela Isquemia, PCR: Proteína C Reativa

Os pacientes com HBP apresentam os resultados na tabela 8. Em relação às variáveis PSA, PCR e idade não houve diferença na comparação entre os grupos sanguíneos. Apenas a variável IMA mostrou alguma diferença. Os grupos O e B são significativamente distintos um do outro com valores de UABS de 0,325 e 0,440, respectivamente, mas não são diferentes dos grupos A e AB, com valores intermediários.

Tabela 8 - Comparação entre os grupos sanguíneos para as variáveis PSA, IMA, PCR e idade no grupo HBP

	PSA (ng/ml)	IMA (UABS)	PCR (mg/l)	IDADE (anos)
A	12,54 a*	0,398 a b	0,86 a	67,24 a
AB	3,25 a	0,450 a b	0,13 a	65,57 a
B	6,14 a	0,325 b	0,75 a	67,36 a
O	27,80 a	0,440 a	0,80 a	68,54 a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

PSA: Antígeno Prostático Específico, IMA: Albumina Modificada pela Isquemia, PCR: Proteína C Reativa

Na tabela 9 observa-se as médias para o grupo CaP. Para a IMA e a PCR não há diferença entre os grupos A, AB, B e O. Para o PSA, o valor mais elevado foi do grupo sanguíneo A (288,95 ng/ml), sendo distinto do grupo AB (2,33 ng/ml), mas não dos grupos B (18,35 ng/ml) e O (40,00 ng/ml). A idade também variou entre os grupos sanguíneos, sendo mais elevada no grupo AB (78,5 anos) e menor no grupo B (51,25 anos).

Tabela 9 - Comparação entre os grupos sanguíneos para as variáveis PSA, IMA, PCR e idade no grupo CaP

	PSA (ng/ml)	IMA (UABS)	PCR (mg/l)	IDADE (anos)
A	288,95 a	0,369 a	1,89 a	71,12 b
AB	2,33 b	0,384 a		78,50 a
B	18,35 a b	0,426 a	1,32 a	51,25 c
O	40,00 a	0,413 a	1,62 a	70,19 a b c

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

PSA: Antígeno Prostático Específico, IMA: Albumina Modificada pela Isquemia, PCR: Proteína C Reativa

O grupo PT não apresentou variações entre os grupos sanguíneos para as variáveis PSA, IMA, PCR e idade, conforme a tabela 10.

Tabela 10 - Comparação entre os grupos sanguíneos para as variáveis PSA, IMA, PCR e idade no grupo PT

	PSA (ng/ml)	IMA (UABS)	PCR (mg/l)	IDADE (anos)
A	0,53 a*	0,453 a	2,08 a	66,38 a
AB	2,84 a	0,255 a		66,00 a
B	2,46 a	0,329 a	0,51 a	75,75 a
O	1,50 a	0,385 a	0,74 a	69,52 a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

PSA: Antígeno Prostático Específico, IMA: Albumina Modificada pela Isquemia, PCR: Proteína C Reativa

5.2.4 Distribuição da população de acordo com os níveis de PSA e IMA

A segunda etapa foi constituída da análise do número de pacientes em diferentes faixas de concentração de PSA (em ng/ml) e de IMA (em UABS).

Para a dosagem de PSA foi analisado o número de pacientes nas concentrações de 0 a 4 ng/ml, 4 a 10 ng/ml e maior que 10 ng/ml para os grupos CaP e HBP e os resultados estão na tabela 11. Comparando os grupos CaP e HBP, eles se mostraram diferentes. Maior número de pacientes com CaP obteve dosagem de PSA acima de 10 ng/ml, enquanto que a maioria dos pacientes com HBP teve dosagem de PSA até 4 ng/ml. Dos 45 pacientes do grupo CaP com PSA acima de 10 ng/ml, oito apresentaram valor de PSA acima de 100 ng/ml. Em relação aos pacientes do grupo HBP, dos 11 com PSA acima de 10 ng/dl, dois alcançaram PSA acima de 100 ng/ml.

Tabela 11 – Número de pacientes com CaP e HBP nas faixas de concentração de PSA

PSA (ng/ml)	Controle	CaP*	HBP*
0 4,0	18	20	51
4,0 10	0	19	40
10 100	0	45	11

*p < 0,05 – diferença significativa entre grupo CaP e HBP pelo teste do qui-quadrado

PSA: Antígeno Prostático Específico, CaP: Câncer de Próstata, HBP: Hiperplasia Benigna Prostática

Para a IMA, o ponto de corte utilizado foi 0,400 UABS na comparação entre os grupos CaP e HBP, os quais não se mostraram diferentes quanto ao número de pacientes acima e abaixo de 0,400 UABS. Os resultados estão na tabela 12.

Tabela 12 – Número de pacientes com CaP e HBP nas faixas de UABS para IMA.

IMA	Controle	CaP*	HBP*
< 0,400	12	37	46
> 0,400	6	38	47

*p > 0,05 – diferença não significativa entre grupos CaP e HBP pelo teste do qui-quadrado

IMA: Albumina Modificada pela Isquemia, CaP: Câncer de Próstata, HBP: Hiperplasia Benigna Prostática

5.2.5 Distribuição da população estudada de acordo com os níveis de PSA e IMA em relação à tipagem sanguínea

As mesmas análises foram feitas para PSA e IMA, separando os pacientes com CaP e HBP em grupos sanguíneo O e não-O (A + B + AB). Não houve diferença significativa para o número de pacientes com CaP e com HBP para as diferentes faixas de concentração de PSA entre o grupo O e o grupo A + B + AB, conforme mostra a tabela 13.

Tabela 13 – Pacientes com CaP e HBP dos grupos sanguíneos O e não-O nas faixas de concentração de PSA

PSA (ng/ml)	CaP*		HBP*	
	A + B + AB	O	A + B + AB	O
0 4,0	11	9	26	25
4,0 10,0	7	12	19	21
> 10,0	23	22	7	4

*p > 0,05 – diferença não significativa na comparação dos grupos O e não-O tanto para CaP quanto para HBP

PSA: Antígeno Prostático Específico, CaP: Câncer de Próstata, HBP: Hiperplasia Benigna Prostática

Na tabela 14 está a análise para IMA em relação ao número de pacientes acima e abaixo de 0,400 UABS nos grupos sanguíneos O e A + B + AB com CaP e com HBP. Não houve diferença entre os grupos sanguíneos pela análise estatística.

Tabela 14 - Pacientes com CaP e HBP dos grupos sanguíneos O e não-O nas faixas de absorvância de IMA

IMA (UABS)	CaP*		HBP*	
	A + B + AB	O	A + B + AB	O
<0,400	20	17	22	24
>0,400	15	23	24	23

* $p > 0,05$ – diferença não significativa na comparação dos grupos O e não-O tanto para CaP quanto para HBP

IMA: Albumina Modificada pela Isquemia, CaP: Câncer de Próstata, HBP: Hiperplasia Benigna Prostática

6. DISCUSSÃO

6.1 Parte I

A avaliação imunohistoquímica dos antígenos eritrocitários A e B pela técnica da imunoperoxidase utilizando antígenos anti-A e anti-B no tecido prostático mostrou que os pacientes do grupo sanguíneo O não apresentaram imunomarcagem nas células, sendo elas neoplásicas ou hiperplásicas (Tabela 1). Isso ocorre porque esses pacientes não possuem as transferases A e B para a implantação dos resíduos de açúcar específico nas superfícies das células (HENRY, 1999; BATISSOCO e NOVARETTI, 2003).

As amostras de pacientes dos grupos A e B apresentaram imunomarcagem na região apical do citoplasma das células glandulares acinares (Figura 6) conforme exposto por RAVN (2000) apenas nos pacientes com diagnóstico de HBP. Os pacientes dos grupos sanguíneos A e B com células neoplásicas não expressaram os antígenos no tecido lesado como já demonstrado em outros tecidos neoplásicos (HIROHASHI, 1984a; HIROHASHI, 1984b; ORNTOFT et al, 1988; ORNTOFT, 1996; GAO *et al*, 2004). Essas evidências demonstram que a perda dos antígenos nas células pode ser uma evidência de agressividade e pior prognóstico, já que as células neoplásicas deixam de expressar tais resíduos na sua superfície (YAMAMOTO, 2004; HAKOMORI, 1999; AGUIAR *et al* (2002). A falta dos açúcares A e B na membrana celular pode atuar como um facilitador para que as células aumentem sua motilidade e possam se instalar em um local distante do sítio primário da doença, o que caracteriza a metástase (LE PENDU, 2001), que também é um sinal de evolução da neoplasia, com pior prognóstico. Infelizmente os pacientes não foram acompanhados clinicamente, portanto a condição ausência ou presença de metástase não foi avaliada.

A análise realizada não permite supor a causa da perda da expressão dos antígenos A e B nas células neoplásicas, apenas relacioná-la com a gravidade da doença.

6.2 Parte II

A Parte II constituiu-se da análise no soro para avaliação do PSA, da IMA e da PCR nos grupos controle, HBP, CaP e PT.

A determinação de PSA nos diferentes grupos estudados (Tabela 2) comportou-se conforme dados já registrados na literatura. A avaliação separando os pacientes por grupo sanguíneo mostrou os mesmo resultados. Os pacientes do grupo controle e aqueles após o tratamento efetivo para o CaP mostraram valores mais baixos e inferiores a 2,5 ng/ml, sugerindo que o valor de 4 ng/ml é elevado como referência e pode ser diminuído, a fim de evitar que alguns casos de CaP deixem de ser investigados porque o nível de PSA ficou inferior ao de referência, uma vez que valores de PSA entre 2,5 e 4,0 ng/ml e entre 4,0 e 10,0 ng/ml têm o mesmo risco de obter resultado positivo para CaP conforme Thompson *et al* (2007). Dessa forma, o ponto de corte de 4,0 ng/ml não parece ser satisfatório.

Os pacientes com alteração prostática, seja HBP ou CaP, apresentaram valores bem superiores aos controles e acima de 4ng/dl. Apesar de os dois grupos apresentarem valores elevados, a análise estatística demonstrou que pacientes com CaP têm concentração sérica de PSA superior àqueles com HBP. Isso mostra que pacientes com neoplasia exibem os maiores valores de PSA, embora não se possa avaliar somente pela dosagem do PSA se a alteração prostática é benigna ou maligna, evidenciando a inespecificidade da proteína para um diagnóstico correto, de acordo com relatos anteriores (HENRY, 1999; JAIN *et al*, 2002).

Os grupos A e O (Tabelas 3 e 4) são os que contêm o maior número de pacientes, por isso as médias de PSA manteve-se como na análise geral dos pacientes. Os grupos Controle e PT apresentaram as menores dosagens, seguidos pelos grupos HBP e CaP com valores mais elevados. As diferenças observadas são estatisticamente diferentes em ambos os grupos sanguíneos, apenas houve semelhança entre os resultados de PSA entre Controle e PT no grupo O.

Nos pacientes do grupo sanguíneo B (Tabela 5), a análise estatística não mostrou diferença significativa entre as médias de PSA nos grupos estudados. Apesar disso, os pacientes com CaP e HBP obtiveram médias das concentrações acima de 2,5 ng/dl. Os pacientes do grupo AB (Tabela 6) mostraram resultados

controversos em relação ao PSA nos grupos HBP e CaP. Isso provavelmente ocorreu devido ao pequeno número de amostras e ao tratamento com hormonioterapia realizado pelos pacientes com neoplasia. Mesmo assim, os pacientes com HBP obtiveram valor superior a 2,5 ng/dl.

Através da tabela 11 é possível observar o número de pacientes em diferentes concentrações de PSA. Enquanto que metade dos pacientes com HBP apresentou PSA entre 0 e 4 ng/ml, a grande maioria dos pacientes com CaP mostrou concentrações mais elevadas, sendo que mais da metade obteve PSA acima de 10 ng/ml, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Todos os pacientes do grupo controle obtiveram PSA abaixo de 4 ng/ml, sendo que o valor mais elevado foi 2,91 ng/ml. Esses valores concordam com os dados de Hernández & Thompson (2004) como sendo compatíveis com tecido prostático sem alterações.

O grande aumento da medida da concentração do PSA ocorre devido às alterações morfológicas e perda da arquitetura da glândula prostática de acordo com JAIN *et al* (2002). Os resultados obtidos confirmam essa hipótese, demonstrando que o processo neoplásico afeta mais a morfologia glandular que o processo hiperplásico.

Quando os pacientes foram divididos em grupo sanguíneo O e não-O, não ocorreu diferença no número de pacientes em cada faixa de concentração de PSA, mostrando a não interferência do grupo sanguíneo dentro de cada situação clínica, CaP e HBP, conforme a tabela 13.

A IMA é uma proteína recentemente avaliada, que se forma em casos de hipóxia e que ainda não possui valores de referência para sua determinação, apenas alguns autores propuseram valores de absorvância para confirmar ou excluir situações clínicas de isquemia do miocárdio e embolia pulmonar (BAR-OR *et al*, 2000; TUREDI *et al*, 2007).

Os dados gerais dos pacientes estudados (tabela 2) mostraram que houve diferença significativa entre o grupo Controle (0,312 UABS) e o grupo HBP (0,415). O último foi o único que apresentou valor de absorvância acima de 0,400. A mesma diferença significativa manteve-se nos pacientes do grupo sanguíneo O, no qual os valores de IMA no grupo HBP foi 0,440 UABS e no grupo controle foi 0,275 UABS (tabela 3). Os pacientes com tipagem sanguínea AB também apresentaram média de IMA acima de 0,400 UABS, mas a comparação com o grupo controle não foi

possível porque não havia voluntário deste grupo sanguíneo no grupo controle (tabela 6).

Este fato torna-se importante na avaliação do diagnóstico do infarto agudo do miocárdio, pois alguns autores (BAR-OR *et al*, 2000; SINHA *et al*, 2004; MELANSON & TANASIJEVIC, 2005) propõem o uso da IMA como marcador para tal situação devido à hipóxia instalada. Na possibilidade de a IMA estar aumentada em pacientes com HBP, torna-se necessário o conhecimento desse diagnóstico prostático quando da avaliação de hipóxia cardíaca, pois a condição hiperplásica pode ser a responsável pelo maior valor de absorbância da amostra, e não a condição de infarto agudo do miocárdio somente. O fato se torna mais importante porque as duas condições clínicas geralmente ocorrem na mesma faixa etária, a partir dos 50 anos (SINHA *et al*, 2004; UNTERGASSER *et al*, 2005; NICKEL, 2007).

A IMA já foi caracterizada como não sendo específica para o tecido miocárdico (SINHA *et al*, 2004). Situações de embolia pulmonar (TUREDI *et al*, 2007) e de anemia associada à doença renal crônica (CICHOTA *et al*, 2008) também foram relacionadas ao aumento da proteína. O presente trabalho aponta mais uma condição clínica que gera maior formação desta proteína. Desta forma, a utilização da IMA como marcador de isquemia cardíaca deve ser avaliada com cuidado e sem descartar a história clínica do paciente.

São necessários novos estudos para avaliar a relação entre IMA, infarto agudo do miocárdio e HBP, propor valores de referência e utilizar a proteína como marcador de isquemia do miocárdio.

A maior formação da IMA em pacientes com HBP pode ocorrer devido ao caráter inflamatório envolvido no processo hiperplásico (MISHRA, 2007; NICKEL, 2007; WANG *et al*, 2008), pois a inflamação produz espécies reativas de oxigênio e nitrogênio capazes de alterar a estrutura da albumina e formar IMA (BAR-OR *et al*, 2000; DE MARZO *et al*, 2003; MELANSON *et al*, 2005). Este mesmo processo ocorre na carcinogênese (DEMARZO *et al*, 1999; BALKWILL *et al*, 2001; COUSSENS *et al*, 2002; SCHOTTENFELD *et al*, 2006), por isso valores de IMA maiores que 0,400 UABS foram observados em pacientes com CaP nos grupos sanguíneos B e AB (tabelas 5 e 6). Apesar desses valores, a relação entre CaP e IMA é apenas sugerida, pois o número de pacientes dos grupos B (4) e AB (3) é muito pequeno, sendo necessários mais estudos acerca do assunto. Os grupos O

(42) e A (34) apresentaram maior número de pacientes com CaP e a média da IMA não ultrapassou 0,400 UABS.

Avaliando os pacientes dos grupos CaP e HBP utilizando o ponto de corte de 0,400 UABS sugerido por BAR-OR *et al* (2000), não há diferença significativa entre os grupos (tabela 12), nem quando ocorre a divisão entre grupos sanguíneos O e não-O (tabela 14).

As médias obtidas para a concentração da PCR foram todos significativamente iguais entre os grupos Controle, HBP, CaP e PT, inclusive quando os grupos sanguíneos foram analisados separadamente. As médias se encontram abaixo do valor de referência máximo de 5 mg/l.

Apesar de não haver diferença estatística entre as situações, o grupo CaP apresentou valores 4 vezes mais elevado e grupo HBP quase 2 vezes maior que o grupo Controle.

Aparentemente a PCR não se relaciona com a presença de neoplasia pelos resultados obtidos, embora alguns estudos já descreveram tal correlação (LATIF *et al*, 2002; IL'YASOVA *et al*, 2005; LEHRER *et al*, 2005) pois há a demonstração da associação entre processo inflamatório e carcinogênese (BALKWILL *et al*, 2001; COUSSENS *et al*, 2002).

Da mesma forma que os resultados obtidos por Platz *et al* (16), os grupos HBP, CaP e PT apresentaram média da concentração de PCR mais elevada que no grupo controle, mas os resultados não foram estatisticamente diferentes.

A inflamação que se correlaciona com a carcinogênese pode ser de caráter mais brando ou crônico, o que não causaria um aumento exagerado na sua concentração, e o ideal seria comparar com valores obtidos anteriormente, pois a PCR tem concentração característica em cada indivíduo (PEPYS & HIRSHFIELD, 2003).

A comparação da PCR entre os grupos sanguíneos não mostrou diferenças significativas (Tabelas 7 a 10), mostrando que a presença ou ausência dos antígenos A e B não interfere no caráter inflamatório.

Um fato que não se pode excluir é que a dosagem da PCR foi a última a ser realizada, quando o soro já havia sofrido ciclo de gelo e degelo, o que pode ter desnaturado a proteína e proporcionado valores inferiores ao real.

Desta forma, a relação entre inflamação e carcinogênese não pode ser descartada nem confirmada.

7. CONCLUSÃO

O processo neoplásico prostático afeta as características celulares, ocorrendo perda dos antígenos A e B glandulares nos pacientes dos grupos sanguíneos A, B e AB, enquanto que o processo hiperplásico não mostrou tal perda.

A característica inflamatória presente em casos de CaP e HBP mostraram-se brandas e não conclusivas através da dosagem da PCR, não ultrapassando os valores de referência para a proteína, apesar dos valores para HBP e CaP serem quase 2 vezes maior e 4 vezes maior, respectivamente, quando comparados ao grupo controle.

A determinação da IMA foi útil para avaliar o estresse oxidativo nos processos hiperplásicos e neoplásicos. Foram encontrados valores acima de 0,400 UABS em pacientes com HBP tanto na avaliação geral quanto nos pacientes do grupo O e AB, e esse fato deve ser considerado numa avaliação isquêmica miocárdica.

A tipagem sanguínea dos grupos A, B e O não mostraram diferença significativa na média das determinações de PSA, IMA e PCR.

8. BIBLIOGRAFIA

AGUIAR, D. C. F. et al. Expressão dos antígenos ABH e Lewis na gastrite crônica e alterações pré-neoplásicas na mucosa gástrica. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 39, n. 4, p. 222-231, 2002.

ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. **Manual de Imuno-Histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

ANNESE, V. et al. ABO blood groups and cancer of the pancreas. **International Journal of Pancreatologia**, v. 6, n. 2, p. 81-88, 1990.

BALK, S.; KO, Y-J.; BUBLEY, G. J. Biology of Prostate-Specific Antigen. **Journal of Clinical Oncology**. V. 21, n. 2, Jan 15, p. 383-391, 2003.

BALKWILL, F. Cancer and the Chemokine Network. **Nature**. V. 4, Jul, p. 540-550, 2004.

BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M.; An inflammatory link. **Nature**. V. 431, Sep, p. 405-406, 2004.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**. v. 357, p.539-545, 2001.

BAR-OR, D.; LAU, E.; WINCKLER, J. V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potencial as a marker for myocardial ischemia – A preliminary report. **The Journal of Emergency Medicine**. v.19, n.4, p.311-315, 2000.

BATISSOCO, A. C.; NOVARETTI, M. C. Aspectos moleculares do sistema sangüíneo ABO. **Revista Brasileira de Hematologia e Homoterapia**. São Paulo. v.1, n.25, p.47-58, 2003.

BECKER, C. B. *et al.* Relação entre resultados de PSA e grupos sangüíneos ABO: uma amostra de 2521pacientes. XVIII. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2003.

BILLIS, A.; MAGNA, L. A. Inflammatory Atrophy of the Prostate. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. v.127, p. 840-844, 2003.

BLACK, S.; KUSHNER, I.; SAMOLS, D. C-reactive Protein. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 279, n. 47, p. 48487-48490, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007, disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>>. Acesso em 3 mar. 2008.

CÂNCER DE PRÓSTATA. In: INCA – Instituto Nacional do Câncer, disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=339>. Acesso em: 3 mar. 2008.

CARDOSO, I. C. R. *et al.* Utilização do PSA como Marcador Tumoral no Diagnóstico de Câncer de Próstata e Hiperplasia Benigna Prostática. **NewsLab**. v. 36, p. 114 – 122. Belo Horizonte, 1999.

CARTER, H. B.; ISAACS, W. B. Improved Biomarkers for Prostate Cancer: A Definite Need. **Journal of the National Cancer Institute**. V. 96, n. 11, Jun 2, p. 813-815, 2004.

CHRISTENSON, R. H.; DUH, S. H.; SANHAI, W. R.; WU, A. H. B.; HOLTMAN, V.; PAINTER, P.; BRANHAM, E.; APPLE, F. S.; MURAKAMI, M.; MORRIS, D. L. Characteristics of an Albumin Cobalt Binding Test for Acute Coronary Syndrome Patients: A Multicenter Study. **Clinical Chemistry**. V.47, n. 3, p. 464-470, 2001.

CICHOTA, L. C.; MORESCO, R. N.; DUARTE, M. M. M. F.; SILVA, J. E. P. Evaluation of Ischemia-Modified Albumin in Anemia Associated to Chronic Kidney Disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. V. 22; p. 1-5, 2008.

COLLEY, C. M.; FLECK, A.; GOODE, A. W.; MULLER, B. R.; MYERS, M. A. Early time course of the acute phase protein response in man. **Journal of Clinical Pathology**. V. 36, p. 203-207, 1983.

COTRAN, R. S.; KUMAS, V. ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature**. V. 420, p. 860-867, 2002.

CRAWFORD, E. D.; WILSON, S. S.; MCCONNELL, J. D.; SLAWIN, K. M.; LIEBER, M. C.; SMITH, J. A.; MEEHAN, A. G.; BAUTISTA, O. M.; NOBLE, W. R.; KUSEK, J. W.; NYBERG, L. M.; ROEHRBORN, C. G. Baseline Factors as Predictors of Clinical Progression of Benign Prostatic Hyperplasia in Men Treated With Placebo. **The Journal of Urology**. V. 175, p. 1422-1427, 2006.

DE MARZO, A. *et al.* Human Prostate Cancer Precursors and Pathobiology. **Urology**. V. 62, p. 55-62, 2003.

DE MARZO, A. M.; MARCHI, V. L.; EPSTEIN, J. I.; NELSON, W. G. Proliferative Inflammatory Atrophy of the Prostate. Implications for Prostatic Carcinogenesis. **American Journal of Pathology**. V. 155, n. 6, p. 1985-1992, 1999.

DE MARZO, A. M.; MEEKER, A. K.; ZHA, S.; LUO, J.; NAKAYAMA, M.; PLATZ, E. A.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Human Prostate Cancer Precursors and Pathobiology. **Urology**. Suplemento 5A, Nov, p. 55-62, 2003.

DE MARZO, A. M.; NAKAI, Y.; NELSON, W. G. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. **Urologic Oncology**. V. 25, p. 398-400, 2007a.

DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; SUTCLIFFE, S.; XU, J.; GRÖNBERG, H.; DRAKE, C. G.; NAKAI, Y.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature**. V. 7, Apr, p. 256-269, 2007b.

DE MARZO, A.; MARCHI, V. L.; EPSTEIN, J. I.; NELSON, W. G. Proliferative Inflammatory Atrophy of the Prostate – Implications for Prostatic Carcinogenesis. **American Journal of Pathology**. V. 155, n. 6, p. 1985-1992, 1999.

DE VITA JR.; V. T, HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: Principles & Practice of Oncology**. V1, 5 ed. New York: Lippincott - Raven Publishers, 1997. p.1322-1376.

DELONGCHAMPS, N. B.; ROZA, G.; CHANDAN, V.; JONES, R.; SUNHEIMER, R.; THREATTE, G.; JUMBELIC, M.; HAAS, G. P. Evaluation of Prostatitis in Autopsied Prostates – Is Chronic Inflammation More Associated With Benign Prostatic Hyperplasia or Cancer? **The Journal of Urology**. V. 179, p. 1736-1740, 2008.

EASTHAM, J. A.; RIEDEL, E.; SCARDINO, P. T.; SHIKE, M.; FLEISHER, M.; SCHATZKIN, A.; LNZA, E.; LATKANI, L.; BEGG, C, B. Validation of Serum Prostate-Specific Antigen Levels: An Evaluation of Year-to-Year Fluctuations. **The Journal Of The American Medical Association**. V. 289, p. 2695-2700, 2003.

ENTSCHLADEN, F.; DRELL, T. L.; LANG, K.; JOSEPH, J.; ZAENKNER, K. S. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. **The Lancet**. V. 5, Apr, p. 254-258, 2004.

ETZIONI, R.; FALCON, S.; GANN, P. H.; KOOPERBERG, C. L.; PENSON, D. F.; STAMPFER, M. J. Prostate-Specific Antigen and Free Prostate-Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Do Combination Tests Improve Detection? **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. V. 13, n. 10, p. 1640-1645, 2004.

FERREIRA, W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Auto-Imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FRANKEL, S. et al. Screening for prostate cancer. **The Lancet**, v. 361, p.1122-1128, 2003.

GRAFF, J.; LALANI, A. S.; LEE, S.; CURD, J. G.; HENNER, W. D.; RYAN, C. W.; VENNEN, P. M.; RUETHER, J, D.; CHI, K. N.; BEER, T. M. C-reactive protein as a prognostic marker for men with androgen-dependent prostate cancer. **Journal of Clinical Oncology**. V. 25, n. 18S, p. 5074, 2007.

HAKOMORI, S.-i. Antigen structure and genetic basis of histo-blood group A, B and O: their changes associated with human cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**. N. 1473, p. 247-266, 1999.

HEIKKILÄ, K.; EBRAHIM, S.; LAWLOR, D. A. A Systematic review of the association between circulating concentrations of C reactive protein and cancer. **Journal of epidemiology and community health**. V. 61, p. 824-832, 2007.

HELZLSOUER, K. J.; ERLINGER, T. P.; PLATZ, E. A. C-reactive protein levels and subsequent cancer outcomes: Results from a prospective cohort study. **European Journal of Cancer**. V.42, p. 704-707, 2006.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19 ed. São Paulo: Manole, 1999.

HERNÁNDEZ, J.; THOMPSON, I. M. Prostate-Specific Antigen: A Review of the Validation of the Most Commonly Used Cancer Biomarker. **Cancer**. V. 101, p. 894-904, 2004.

HIROHASHI, S.; INO, Y.; KODAMA, T.; SHIMOSATO, Y. Distribution of blood group antigens A, B, h and I(Ma) in muçus-producing adenocarcinoma of human lung. **Journal of the National Cancer Institute**. V.72, n. 6, p. 1299-1305, 1984b.

HIROHASHI, S.; SHIMOSATO, Y.; INO, Y.; TOME, Y.; WATANABE, M.; HIROTA, T.; ITABASHI, M. Distribution of blood group antigens and CA 19-9 in gastric cancers and non-neoplastic gastric mucosa. **The Japanese Journal of Cancer Research**. V. 75, n. 6. p. 540-547, 1984a.

HUGHES, C.; MURPHY, A.; MARTIN, C.; SHEILS, O.; O'LEARY, J. Molecular pathology of prostate cancer. **Journal of Clinical Pathology**. V. 58, p. 673-684, 2005.

IL'YASOVA, D.; COLBERT, L. H.; HARRIS, T. B.; NEWMAN, A. B.; BAUER, D. C.; SATTERFIELD, S.; KRITCHEVSKY, S. Circulating Levels of Inflammatory markers and Cancer Risk in the Health Aging and Body Composition Cohort. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. V. 14, n. 10, p. 2413-2418, 2005.

JAIN, S. BHOJWANI, A. G.; MELLON, J. K. Improving the utility of prostate specific antigen (PSA) in the diagnosis of prostate cancer: the use of PSA derivatives and novel markers. **Postgraduate Medicine**. N. 78, p. 646-650, 2002.

JESCH, U.; ENDLER, P. C.; WULKERSDORFER, B.; SPRANGER, H. ABO Blood Group. Related Investigations and Their Association with Defined Pathologies. **The Scientific World Journal**. V.7, p. 1151-1154, 2007.

KARAKIEWICZ, P. I.; BANAYOUN, S.; BÉGIN, L. R.; DUCLOS, A.; VALIQUETTE, L.; McCORMAC, M.; BÉNARD, F.; SAAD, F.; PERROTTE, P. Chronic inflammation is negatively associated with prostate cancer and high grade prostatic intraepithelial neoplasia on needle biopsy. **International Journal of Clinical Practice**. V. 61, n. 3, Mar, p. 425-430, 2007.

KATO, T.; SUZUKI, H.; KOMIYA, A.; IMAMOTO, T.; NAYA, Y.; TOBE, T.; ICHIKAWA, T. Clinical significance of urinary white blood cell count and serum C-reactive protein level for detection of non palpable prostate cancer. **International Journal of Urology**. V. 13, p. 915-919, 2006.

LABRIE, F. et al. Serum prostate specific antigen as pre-screening test for prostate cancer. **Journal of Urology**. v.149, n.5, p.1149-50, 1993.

LATIF, Z.; MCMILLAN, D. C.; WALLACE, A. M.; SATTAR, N.; MIR, K.; JONES, G. The relationship of circulating insulin-like growth factor 1, its binding protein-3,

prostate-specific antigen and C-reactive protein with disease stage in prostate cancer. **BJU International**. V. 89, p. 396-399, 2002.

LEE, A. H., REID, M. E. **ABO blood group system**: a review of molecular aspects. *Journal of Blood Group Serology and Education*. v.16, n.1, 2000.

LEHRER, S.; DIAMOND, E.; MAMKINE, B.; DROLLER, M. J.; STONE, N. N.; STOCK, R. G. C-reactive protein is significantly associated with prostate-specific antigen and metastatic disease in prostate cancer. **BJU International**. V. 95, p. 961-962, 2005.

LI, L.; CARROL, P. R.; DAHIYA, R. Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 2, p. 103-115, 2005.

McARDLE, P. A.; McMILLAN, D. C.; SATTAR, N.; WALLACE, A. M.; UNDERWOOD, M. A.; The relationship between interleukin-6 and C-reactive protein in patients with benign and malignant prostate disease. **British Journal of Cancer**. V. 91, p. 1755-1757, 2004.

MELANSON, S.; TANASIJEVIC, M. Laboratory diagnosis of acute myocardial injury. **Cardiovascular Pathology**. V. 14, p. 156-161, 2005.

MISHRA, V. C.; ALLEN, D. J.; NICOLAOU, C.; SHARIF, H.; HUDD, C.; KARIM, O. M. A.; MOTIWALA, H. G.; LANIADO, M. E. Does intraprostatic inflammation have a role in the pathogenesis and progression of benign prostatic hyperplasia? **BJU International**. V. 100, p. 327-331, 2007.

NICKEL, J. C. Inflammation and Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics of North America**. V. 35, p. 109-115, 2007.

OETTL, K.; STAUBER, R. E. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. **British Journal of Pharmacology**. V. 151, p. 580-590, 2007.

OLSON, M. L. et al. Genomic analysis of clinical samples with serological ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. **Blood**. v.98, n.5, p1585-1593, 2001.

ORNTOFT, T. F.; WOLF, H.; WATKINS, W. M. Activity of the human blood group ABO, Se, H, Le and X gene-encoded glycosyltransferases in normal and malignant bladder urothelium. **Cancer Research**. V. 48, n. 15. p. 4427-4433. 1988.

PALAPATTU, G. S.; SUTCLIFFE, S.; BASTIAN, P. J.; PLATZ, E. A.; DE MARZO, A. M.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Prostate Carcinogenesis and inflammation: emerging insights. **Carcinogenesis**. V. 26, n. 7, p. 1170-1181, 2004.

PARSONS, J. K.; CARTER, B., PARTIN, A. W.; WINDHAM, B. G.; METTER, E. J.; FERRUCCI, L.; LANDIS, L.; PLATZ, E. Metabolic Factors Associated with Benign

Prostatic Hyperplasia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. V. 91, n. 7, p. 2562-2568, 2006.

PEPYS, M. B.; HIRSHFIELD, G. M. C-Reactive Protein: a critical update. **The Journal of Clinical Investigation**. V. 111, p. 1805-1812, 2003.

PERLMAN, E. J.; EPSTEIN, J. I. Blood group antigen expression in dysplasia and adenocarcinoma of the prostate. **The American journal of surgical pathology**. N. 14, v. 9, p. 810-818, 1990.

PLATZ, E. A.; DE MARZO, A. Epidemiology of Inflammation and Prostate Cancer. **The Journal of Urology**. V. 171, Feb, p. S36-S40, 2004.

PLATZ, E. A.; DE MARZO, A. M.; ERLINGER, T. P.; RIFAI, N.; VISVANATHAN, K.; HOFFMAN, S. C.; HELTZSOUER, K. J. No Association Between Pre-Diagnostic Plasma C-Reactive Protein Concentration and Subsequent Prostate Cancer. **The Prostate**. V. 59, p. 393-400, 2004.

POURAZAR, A. Red cell antigens: Structure and function. **Asian Journal of Transfusion Science**. V. 1, n. 1, Jan, p. 24-32, 2007.

RAVN, V.; DABELSTEEN, E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**. v. 108, p. 1-28, 2000.

ROOTS, I. et al. Debrisoquine hydroxylation phenotype, acetylation phenotype, and ABO blood group as genetic host factors of lung cancer. **Klin Wochenschr**, v. 11, p. 87-97, 1988.

ROY, D.; QUILES, J.; GAZE, D. C.; COLLINSON, P.; KASKI, J. C.; BAXTER, G. F. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. **Heart**. V. 92, p. 113-114, 2006.

SARAVANA, M. et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. **Nature**. n.412, p.822-826, August, 2001.

SAUVER, J. L. S.; JACOBSON, D. J.; MCGREE, M. E.; GIRMAN, C. J.; LIEBER, M. M.; JACOBSEN, S. J. Longitudinal Association between Prostatitis and Development of Benign Prostatic Hyperplasia. **Urology**. V. 71, p. 475-479, 2008.

SCHOTTENFELD, D.; BEEBE-DIMMER, J. Chronic Inflammation: A Common and Important Factor in the Pathogenesis of Neoplasia. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. V. 56, p. 69-83, 2006.

SHANEYFELT, T. et al. Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 4, p. 847-853, 2000.

SINHA, M. K.; ROY, D.; GAZE, D. C.; COLLINSON, P. O.; KASKI, J-C. Role of "ischemia Modified Albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. **Emergency Medicine Journal** v. 21, p. 29-34, 2004.

STAMEY, T. A.; CALDWELL, M.; McNEAL, J. E.; NOLLEY, R.; HEMENEZ, M.; DOWNS, J. The Prostate Specific Antigen Era in the United States is over for Prostate Cancer: What Happened in the last 20Years? **The Journal of Urology**. V. 172, p. 1297-1301, 2004.

SU, M. et al. Relationship between ABO blood groups and carcinoma of esophagus and cardia in Chaoshan inhabitants of China. **World Journal of Gastroenterology**. v.7, n.5, p.657-661, 2001.

SUTCLIFFE, S.; PLATZ, E. A. Inflammation in the etiology of prostate cancer: An epidemiologic perspective. **Urologic Oncology**. V. 25, p. 242-249, 2007.

THOMPSON, I. M.; ANKERST, D. P. Prostate-Specific Antigen in the early detection of prostate cancer. **Canadian Medical Association**. V. 176, n. 13, Jun 19, p.1853-1858, 2007.

THOMPSON, I. M.; ANKERST, D. P.; CHI, C.; GOODMAN, P. J.; TANGEN, C. M.; LUCIA, M. S.; FENG, Z.; PARNES, H. L.; COLTMAN JR, C. A. Assessing Prostate Cancer Risk: Results from the Prostate Cancer Prevention Trial. **Journal of the National Cancer Institute**. V. 98, n. 8, Apr 19, p. 529-534, 2006.

TUREDI, S.; GUNDUZ, A.; MENTESE, A.; KARAHAN, S. C.; YILMAZ, S. E.; EROGLU, O.; NUHOGLU, I.; TURAN, I.; TOPBAS, M. Value of ischemia-modified albumin in the diagnosis of pulmonary embolism. **American Journal of Emergency Medicine**. V. 25, p. 770-773, 2007.

UNDERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. **Experimental Gerontology**. V. 40, p. 121-128, 2005.

VIOQUE, J.; WALKER, A. M. Pancreatic cancer and ABO blood types: a study of cases and controls. **Medicina Clinica**, v. 96, n. 20, p. 761-764, 1991.

VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxal roles of the immune system during cancer development. **Nature**. V. 6, Jan, p. 24-37, 2006.

WANG, L.; YANG, J.; YANG, L.; LIU, Z. Chronic inflammation in benign prostatic hyperplasia: Implications for therapy. **Medical Hypotheses**. V. 70, p. 1021-1023, 2008.

WEITZMAN, S. A.; GORDON, L. I. Inflammation and Cancer: Role of Phagocyte-Generated Oxidants in Carcinogenesis. **The Journal of The American Society of Hematology**. V. 76, n. 4, p. 655-663, 1990.

WHITTEMORE, A. S. et al. Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. **Journal Natl Cancer Inst.** n.87, v.9, p.652-61, May, 1995.

YAMAMOTO, F. Review: ABO blood group system – ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. **Immunohematology.** V.20, n. 1, p. 3-22, 2004.

YOU, W. et al. Blood type and family cancer history in relation to precancerous gastric lesions. **International Journal of Epidemiology.** n.29. p. 405-407, 2000.

ZAGO, M. A.; FALCÃO R.P.; PASQUINI R. **Hematologia: Fundamentos e Prática.** 1 ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido

O projeto de pesquisa intitulado “Associação de antígenos ABO com antígenos do câncer prostático” será realizado pela mestrandia Aline Klein Mastella sob orientação do Professor Doutor José Edson Paz da Silva. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, portanto a participação de voluntários é importante.

O objetivo deste estudo é verificar se o desenvolvimento do câncer de próstata está relacionado com substâncias A e B do grupo sanguíneo. Também vai avaliar o papel da inflamação e da hipóxia (falta de oxigenação) nesse caso.

A sua participação na pesquisa será a permissão da utilização do tecido prostático para análise laboratorial após a biópsia indicada pelo seu médico e a permissão na utilização do seu sangue após as análises solicitadas pelo seu médico.

Os métodos de avaliação não oferecem risco à sua saúde.

Todas as informações necessárias para o projeto de pesquisa serão confidenciais, serão utilizadas apenas para o projeto de pesquisa e cada paciente será identificado com um número.

A sua não concordância ou a sua desistência em participar do projeto de pesquisa não implicará em prejuízo no seu atendimento. O projeto de pesquisa não prevê ressarcimento.

Eu, _____, declaro que fui informado dos objetivos, justificativas e procedimentos necessários à pesquisa. As minhas dúvidas foram respondidas e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Sou livre para interromper minha participação no projeto de pesquisa a qualquer momento, sem que isto implique em prejuízo no meu atendimento. O meu nome não será divulgado e não receberei ressarcimento. Eu concordo em participar do estudo.

Santa Maria, ___/___/_____

Assinatura do voluntário ou responsável _____

Assinatura do pesquisador responsável _____

Assinatura do pesquisador orientador _____

Telefone para contato com os pesquisadores: 9969-4550 (Aline)

APÊNDICE B - Técnica de Imunoperoxidase – Método Estreptoavidina-Biotina

Técnica de Imunoperoxidase – Método Estreptoavidina-Biotina

1. Bloqueio da peroxidase endógena:

A atividade da peroxidase é inibida tratando o tecido com solução de peróxido de hidrogênio 3% em 2 banhos de 10 min.

Realizar lavagem padrão.

2. Recuperação antigênica:

As amostras fixadas em formol formam ligações aldeído-proteína que podem alterar, destruir ou mascarar alguns antígenos. Como recurso para recuperação desses antígenos são utilizados:

- enzimas proteolíticas (tripsina, pepsina, proteína se-K)
- calor (irradiação por microondas, vapor, banho-maria etc)

Nesta pesquisa foi utilizado o calor por microondas para a recuperação antigênica.

Colocar as lâminas em um suporte com fundo vazado, o qual é colocado num recipiente com capacidade de aproximadamente 1 litro e preenchido com tampão tris-EDTA pH 9,0.

A recuperação antigênica é alcançada em 25 min 30 s na potência máxima de um aparelho microondas de 800W.

Deixar esfriar por 1 h a temperatura ambiente para completar o processo de recuperação.

Proceder a lavagem padrão por 5 min com água corrente e 2 min em água destilada.

3. Bloqueio da avidina endógena:

Imergir as lâminas em solução de clara de ovo em água destilada por 15 min.

Realizar a lavagem padrão.

4. Bloqueio das reações inespecíficas:

Mergulhar as lâminas em leite desnatado por 30 min.

Lavagem padrão por 5 min com água corrente e 2 min em água destilada.

Mergulhar em PBS por 5 min.

5. Incubação com anticorpo primário:

Secar cuidadosamente as lâminas e pingar sobre os cortes histológicos o anticorpo em diluição apropriada, deixando por 15-18h no refrigerador em câmara úmida.

Utilizar anti-A e anti-B humano de origem murina como anticorpo primário, utilizados em cortes diferentes. Como cada paciente terá 3 cortes histológicos, no primeiro adicionar o anti-A, no segundo anti-B e no terceiro não adicionar o anticorpo primário. Este último atua como um controle negativo da reação.

6. Incubação com anticorpo secundário:

Lavar as lâminas com um jato de PBS para interromper a reação com o anticorpo primário.

Colocar as lâminas em uma cuba contendo PBS e deixar por 10 min (trocar a solução a cada 5 min).

Secar as lâminas e incubá-las com o anticorpo secundário (anti IgG de origem murina) conjugado à biotina conforme tempo e temperatura indicada pelo fabricante. (kit LSAB: 30 min a temperatura ambiente).

7. Amplificação com avidina-biotina:

Realizar a lavagem padrão e pingado sobre o corte o complexo avidina-biotina-peroxidase. (kit LSAB: 30 min a temperatura ambiente)

8. Revelação:

Realizar a lavagem padrão e mergulhar as lâminas numa solução de cromógeno [DAB (diaminobenzidina)/PBS (salina tamponada com fosfato)/água oxigenada] por 3 min no escuro.

Lavagem padrão.

9. Contra-coloração:

A contra-coloração é feita com hematoxilina previamente filtrada deixando as lâminas em imersão por 1-3 min.

Lavagem padrão.

10. Desidratar, clarificar, montar, etiquetar:

A desidratação é feita deixando as lâminas mergulhadas em etanol de diferentes concentrações (96, 90, 80 e 70GL) por 2 min em cada.

A clarificação é realizada deixando as lâminas mergulhadas por 2 min em 2 recipientes com xilol.

Montar lâmina e lamínula utilizando bálsamo.

Etiquetar as lâminas para identificação.

Preparo das soluções reagentes

Tampão PBS (Solução salina tamponada com fosfatos) 0,01M pH 7,2-7,4

Cloreto de sódio p.a.	7,2 g
Fosfato de sódio dibásico anidro p.a.	1,48 g
Fosfato de sódio monobásico di-hidratado p.a.	0,43 g
Água destilada	qsp 1000 ml

Solução tampão PBS-diluyente

Soroalbumina bovina (BSA)	1,0 g
Azida sódica p.a. (NaN ₃)	0,1 g
Tampão PBS	qsp 100 ml

Tris-EDTA pH 9,0

EDTA (ácido etileno diamino tetracético)	0,37 g
Tris base	1,21 g
Água destilada	qsp 1000 ml

Se necessário ajustar o pH com HCl 1N ou NaCl 1N

Solução substrato cromogênico (reveladora)

Diaminobenzidina (DAB)	72 mg
Peróxido de hidrogênio 3%	1,2 ml
Tampão PBS	qsp 120 ml

Solução de clara de ovo

Clara de ovo	2 unidades
Água destilada	200 ml

Solução de cloreto de cobalto 0,1%

Cloreto de cobalto	100 mg
Água destilada	100 ml

Solução de Ditiotreitól 1,5 mg/ml

Ditiotreitól	150 mg
Água destilada	100 ml

Solução de Cloreto de sódio 0,9%

Cloreto de sódio	0,9 g
Água destilada	100 ml