



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

MARCOS CEZAR FEITOSA DE PAULA MACHADO

**ENSAIO IMUNOQUILUMINESCENTE DE MARCADORES
PROGNÓSTICOS PARA LESÕES TUMORAIS PROSTÁTICAS**

RECIFE
2023

MARCOS CEZAR FEITOSA DE PAULA MACHADO

**ENSAIO IMUNOQUIMILUMINESCENTE DE MARCADORES
PROGNÓSTICOS PARA LESÕES TUMORAIS PROSTÁTICAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada a Saúde. Área de concentração: Biologia Aplica a Saúde.

Orientador: **Luiz Bezerra de Carvalho Júnior**

Departamento de Bioquímica, CB-UFPE

Coorientador: **Mario Ribeiro de Melo-Junior**

Área acadêmica de Patologia, CCM-UFPE

RECIFE

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Machado, Marcos Cezar Feitosa de Paula.

Ensaio imunoquimiluminescente de marcadores prognósticos para lesões tumorais prostáticas. /
Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado. – 2023.

88 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Junior.

Coorientador: Mario Ribeiro de Melo Júnior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada à saúde, 2023.

Inclui referências.

1. Câncer de próstata. 2. Imunoquimiluminescência. 3. Biomarcadores. I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de. (orient.). II. Melo Junior, Mario Ribeiro de. (coorient.). III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-083

MARCOS CEZAR FEITOSA DE PAULA MACHADO

**ENSAIO IMUNOQUIMILUMINESCENTE DE MARCADORES
PROGNÓSTICOS PARA LESÕES TUMORAIS PROSTÁTICAS**

Aprovado em 07/03/2023

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior (Orientador)

Departamento de Bioquímica, CB/UFPE Instituto de Imunopatologia Keizo Asami - iLIKA/UFPE
Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde da UFPE (PPGBAS/UFPE)

Profº. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior (Examinador Externo)

Área acadêmica de Patologia, CCM/UFPE
Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional (PPGST/UFPE)

Profa. Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida (Examinador Interno)

Universidade de Pernambuco - Campus Garanhuns
Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde da UFPE (PPGBAS/UFPE)

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Departamento de Histologia e Embriologia, CB/UFPE
Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional (PPGST/UFPE)

Profa. Dra. Luiza Rayanna Amorim de Lima

Universidade de Pernambuco - Campus Garanhuns Programa do Pós-Graduação em Ciências da
Saúde (PPGCS/UPE).

AGRADECIMENTOS

A minha esposa, Priscila Rodrigues e meus Filhos Gustavo Machado e Maria Eduarda Machado, por dividirem comigo os momentos mais difíceis dessa caminhada.

Ao meu pai, Jerônimo Machado, com quem aprendi, desde muito cedo, a ser forte.

Aos meus familiares, em especial as queridas tias, Fátima Machado e Conceição Machado, pela força e suporte incondicional.

Aos meus orientadores, Prof. Luiz de Carvalho pela confiança e por toda a transmissão de conhecimento que tive o privilégio de disfrutar em nossas conversas, ao amigo e Prof. Mario Ribeiro, pela inspiração e valiosos ensinamentos nessa jornada.

Aos Urologistas de Serra Talhada, Wesley Bezerra, Breno Ferraz, Neyton Santana e Luiz Pinto, que sempre se colocaram a disposição para a execução deste trabalho.

A equipe do Hospital São Vicente na figura do ilustre Dr. Clóvis Carvalho que abriu as portas para que pudesse captar parte das amostras, sem a sua colaboração nada disso seria possível.

Ao amigo André Barreto que nunca mediu esforços para que esse trabalho fosse concluído.

Aos incansáveis e sempre presentes amigos do Grupo de Pesquisa em Processos Patológicos (GP3), Jorge Araújo, Luciano Melo, Reginaldo Gonçalves e Vasco Patu, vocês sempre estão presentes nos piores e melhores momentos. Obrigado por toda força nessa jornada!!!!

A amiga Pauliana Galvão que me socorreu em um dos momentos mais difíceis dessa caminhada!!!!

A todos colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde, em especial ao secretário Fábio Costa.

Aos pacientes que fizeram parte dessa pesquisa, minha mais sincera gratidão.

RESUMO

As alterações tumorais na próstata estão associadas ao envelhecimento, sendo a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) a alteração proliferativa mais frequentemente observada. Já o câncer próstático (CaP) é o segundo mais comum em homens em todo o mundo. Esse estudo objetivou quantificar, por meio de ensaios imunoquimiluminescentes, biomoléculas em tecido prostático em busca de possíveis marcadores prognósticos. Foram utilizados anticorpos para os antígenos da calprotectina, ADAM10, CD3 e CD20 sendo eles submetidos a conjugação com éster de acridina para detecção imunoquimiluminescente e avaliação da matriz extracelular em biópsias de pacientes com HPB (n = 90), CaP (n = 30) e controle (n=20). A média de idade dos pacientes foi de 67,4 anos (+/- 7,2 anos), sendo a faixa etária entre 60 e 69 a que apresentou o maior número de casos tanto de CaP (53,3%) quanto de HPB (57%). Em relação ao escore de Gleason (classificação padrão para tumores de próstata) foi observada uma ocorrência significativa do escore 7 (86,2%), com maior frequência o escore 7 (3+4) com cerca 56,66%. A quimioluminescência emitida como uma expressão das proteínas calprotectina, ADAM10, CD20 e CD3 foi estatisticamente significativamente maior em CaP do que HPB e controle conforme os resultados em termos de média +/- erro padrão para CaP, HPB e controle, respectivamente, foram: CD3 = 3,448 +/- 393, 1,015 +/- 16 e 675 +/- 28; calprotectina = 37,962 +/- 5,203, 1,899 +/- 149 e 268 +/- 12; CD-20 = 3,627 +/- 1,170, 857 +/- 31 e 264 +/- 16 e Adam-10 = 33,566 +/- 4,657, 1,304 +/- 127 e 279 +/- 13. Além disso, também foram observados valores mais altos de expressão em amostras que apresentaram escore de Gleason mais alto. Os resultados quantitativos deste estudo sustentam a hipótese de que o aumento da expressão da ADAM10, calprotectina e CD20 e CD3 seja resultado da migração de neutrófilos e células plasmocitárias para os tecidos alterados aumentando a probabilidade de desenvolvimento e agravamento de processos neoplásicos.

Palavras-chave: Câncer de Próstata; Imunoquimioluminescência; Biomarcadores

ABSTRACT

Tumor changes in the prostate are associated with aging, with Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) being the most frequently observed proliferative change. Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer in men worldwide. This study aimed to quantify through immunochemiluminescent detection biomolecules in prostate tissue in search of possible prognostic markers. Antibodies to calprotectin antigens, ADAM10, CD3 and CD20 were used and submitted to conjugation with acridine ester for immunochemiluminescent detection and evaluation of the extracellular matrix in biopsies of patients with BPH (n = 90), PCa (n = 30) and control (n = 20). The mean age of patients was 67.4 years (7.2 years), and the age range between 60 and 69 showed the highest number of cases both of PCa (53.3%) and BPH (57%). Regarding the Gleason score (standard classification for prostate tumors) a significant occurrence of score 7 (86.2%) was observed, being score 7 (3+4) the most frequent 56.66%. Chemiluminescence emitted as an expression of calprotectin, ADAM10, CD20 and CD3 was statistically significantly higher in CaP than HPB and control. These results in terms of mean +/- standard error for CaP, BPH and control, respectively, are as follows: CD3 = 3,448 +/- 393, 1,015 +/- 16 and 675 +/- 28; Calprotectin = 37,962 +/- 5,203, 1,899 +/- 149 and 268 +/- 12; CD-20 = 3,627 +/- 1,170, 857 +/- 31 and 264 +/- 16 and Adam-10 = 33,566 +/- 4,657, 1,304 +/- 127 and 279 +/- 13. In addition, it was also observed that the expression of these proteins were increased while the Gleason score increased. The quantitative results of this study support the hypothesis that the increase in ADAM10, calprotectin, and CD20 and CD3 is a result of migration of neutrophils and plasma cells to the altered tissues increasing the likelihood of development and aggravation of neoplastic processes.

Keywords: Prostatic cancer, Chemiluminescence; Biomarker

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Esquemas da divisão anatômica da próstata proposta por McNeal em quatro regiões: zona de transição, zona central, zona periférica e estroma fibromuscular anterior.	14
Figura 2:	Fotomicrografia mostrando a composição histológica da próstata: o epitélio, formado pelos ácinos (setas vermelhas) e ductos	15
Figura 3:	Aspectos comparativos entre próstata normal e próstata hiperplásica.	18
Figura 4:	Estrutura molecular da calprotectina	23
Figura 5:	Estrutura molecular da ADAM10	26
Figura 6:	Apresentação de expressão de antígenos de superfície (CDs) durante a maturação de linfócitos T	28
Figura 7:	Processo de montagem do TMA	30
Figura 8:	Esquema de reação quimiluminescente dos ésteres derivados de acridina	32
Figura 9:	Esquema de ensaio imunoquimiluminescente com éster de acridina	33

ARTIGO 1

Figura 1:	Immunochemiluminescent detection of CD-3 and 46 calprotectin in prostate tissues of patients with BPH, CaP and controls. *The bracket indicates the value of p (statistical significance) between the analyzed groups, while the whiskers show the mean $\pm$ standard error of the group.	45
Figura 2:	Immunochemiluminescent detection of CD-20 and ADAM-10 in prostate tissues of patients with BPH, CaP and controls. *The bracket indicates the value of p (statistical significance) between the analyzed groups, while the whiskers show the mean $\pm$ standard error of the group.	46
Figura 3:	Results of immunochemiluminescence, expressed in RLU, of CD3, Calprotectin, CD20 and Adam10 compared to Gleason grade	47

ARTIGO 2

Figura 1:	Relação do histórico familiar e diagnóstico de Adenocarcinoma Prostático de pacientes atendidos em um serviço de Urologia no município de Serra Talhada-PE no período de 2020 a 2021	61
Figura 2:	Relação do escore de Gleason de pacientes atendidos em um serviço de Urologia no município de Serra Talhada-PE no período de 2020 a 2021	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Porcentagem de índice de incidência de câncer de próstata.	19
Tabela 2:	Estadiamento tumoral TNM para o câncer de próstata.	22
Tabela 3:	Grupos histológicos na classificação de Gleason no câncer de próstata.	22
ARTIGO 1		
Tabela 1:	ISUP Prostate Cancer Grade Groups	44
ARTIGO 2		
Tabela 1:	Perfil epidemiológico dos fatores de risco para tumorações prostáticas de pacientes atendidos em um serviço de Urologia do município de Serra Talhada-PE no período de 2020 a 2021.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Azul de alcian
CaP	Câncer de próstata
CD	Diferenciação celular
Cish	Reação de hibridação in situ cromogênica
CP	Calprotectina
CPS	“Contagens” de luz por segundo
DAB	diaminobenzidina-tetrahidrocloro
DHT	Diidrotestosterona
EA	Éster de acridina
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
Fish	Reação de hibridação in situ fluorescente
HE	Hematoxilina e eosina azul de alcian (AB)
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HRP	Horseradish Peroxidase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo de histocompatibilidade
OMS	Organização mundial de saúde
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PSA	Antígeno prostático específico
QL	Quimiluminescência
STUI	Síndrome do trato urinário inferior
TCR	Receptor de células T
TM	Tricrômico de Masson
TMA	Tissue Microarray
TNF	Fator de necrose tumoral
ZC	Zona central
ZP	Zona periférica
ZT	Zona de transição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	HISTOFISIOLOGIA PROSTÁTICA	13
2.2	LESÕES TUMORAIS PROSTÁTICAS	16
2.2.1	Hiperplasia Prostática Benigna	16
2.2.2	Câncer de Próstata	18
2.2.3	Estadiamento Tumoral	21
2.3	BIOMOLÉCULAS RELACIONADAS ÀS ALTERAÇÕES PROSTÁTICAS	23
2.3.1	Calprotectina	23
2.3.2	Adam 10	25
2.3.3	CD3 e CD20	27
2.4	TISSUE MICROARRAY	29
2.5	ENSAIOS QUIMILUMINESCENTES	30
2.6	APLICAÇÕES DA QUIMILUMINESCÊNCIA NA SAÚDE	33
3	JUSTIFICATIVA	35
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GERAL	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5	MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1	AMOSTRAS	37
5.2	ASPECTOS ÉTICOS	37
5.3	ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	37
5.4	TÉCNICA DE TISSUE MICROARRAY	38
5.5	ENSAIO IMUNOQUIMIOLUMINESCENTE	38
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6	RESULTADOS	40
6.1	ARTIGO 1	40
6.2	ARTIGO 2	55
7	CONCLUSÕES FINAIS	68
8	REFERÊNCIAS	69
9	APÊNDICE	78
10	ANEXOS	85
	ANEXO 1 (PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA)	85
	ANEXO 2 (MODELO DO TCLE)	87

1 INTRODUÇÃO

A população idosa no Brasil vem em um crescimento exponencial e segundo informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população de idosos (pessoas com 60 anos ou mais) no país deve alcançar o patamar superior a 66 milhões até o ano de 2050 (IBGE, 2021). Isto mostra o aumento na probabilidade de inúmeras manifestações patológicas prostáticas, incluindo alterações neoplásicas e não neoplásicas, uma vez que um dos fatores de risco para o surgimento dessas alterações é a idade.

O câncer de próstata (CaP) é uma doença do genoma associada ao envelhecimento, visto que pessoas acima de 50 anos são mais propensas a desenvolverem (LOWRANCE *et al.*, 2021). A idade é de fato o maior fator de risco para desenvolvimento desta doença, mas não se pode descartar fatores como: Etnia, onde os indivíduos da raça negra são mais afetados, fatores genéticos e possivelmente fatores dietéticos (dieta pobre em vegetais, ingestão de gordura animal) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA, 2022). O CaP é o segundo mais comum em homens no mundo, com mais de 1,2 milhão de casos e 358.000 mortes anuais, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (SIEGEL *et al.*, 2021).

Quando há suspeita de CaP, a biopsia continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico, no entanto, a identificação e a caracterização da doença têm se tornado cada vez mais precisas por meio da melhoria da estratificação de risco e dos avanços de exames de imagem como por exemplo a ressonância prostática, bem como do surgimento de biomarcadores (LITWIN; TAN, 2017).

Os testes de diagnóstico molecular demonstraram um impacto profundo no diagnóstico e tratamento do câncer (SIPOS; RINGEL, 2022). Com base na enorme expansão do conhecimento do cenário genômico, para um diagnóstico preciso e muitas vezes precoce, é empregada a quantificação de substâncias protéicas denominadas marcadores moleculares, produzidas pelo tecido tumoral ou pelo organismo em resposta ao tumor (NAOUN; ROCHA, 2016).

Dentre várias técnicas utilizadas para o diagnóstico das neoplasias, os ensaios imunoquimiluminescentes apresentam uma elevada sensibilidade (superior aos ensaios espectrofotométricos e fluorimétricos) por permitirem detecção na faixa de femtomoles ou atomoles (10^{-15} a 10^{-18} mol) com grande estabilidade analítica

(FERREIRA; ROSSI, 2002). Estes ensaios baseiam-se na detecção da emissão de luz, decorrente da reação entre o antígeno e anticorpos marcados por compostos quimiluminescentes, como o éster de acridina (BROWN *et al.*, 2009).

A quimiluminescência já foi estudada em trabalhos com doenças inflamatórias e neoplasias e mostrou-se eficaz nas avaliações, permitindo a identificação do perfil de expressão de moléculas associadas à avaliação no prognóstico dessas doenças (LIMA *et al.*, 2013; MELO RÊGO *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2014). Nesse contexto, a avaliação prognóstica usando imunoquimiluminescência ainda não apresenta estudos para as alterações prostáticas, sendo então de alta relevância a identificação de novos marcadores prognósticos nas lesões tumorais da próstata, já que nenhum marcador molecular específico e bem caracterizado foi uniformemente recomendado para aplicação de rotina na detecção de metástase e recorrência desta neoplasia (BAZZICHETTO *et al.*, 2019; LOTAN *et al.*, 2020).

2 REVISÃO DA LITERATURA

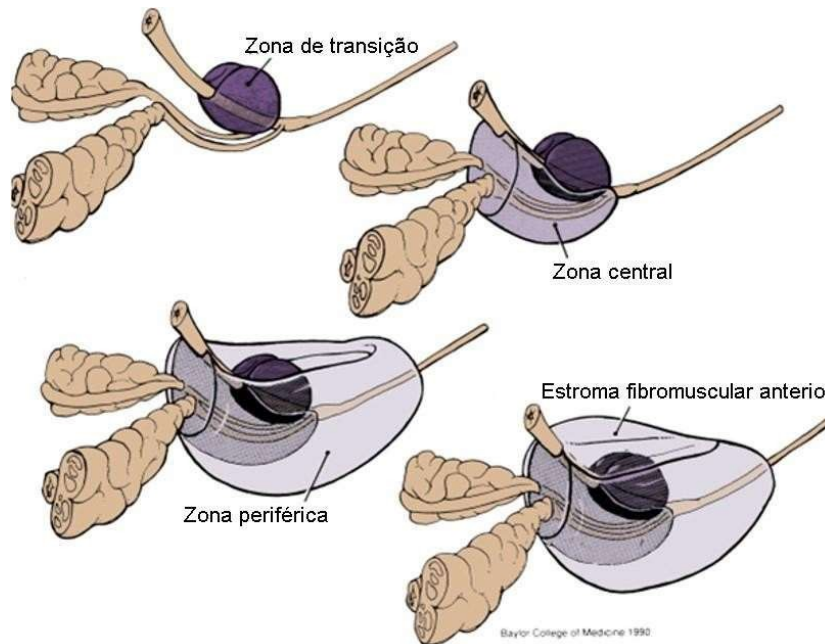
2.1 HISTOFISIOLOGIA PROSTÁTICA

O termo “próstata” vem da palavra grega *prohistani*, isso correspondendo à localização da glândula em frente à bexiga. Este termo foi utilizado inicialmente por Herófilus de Calcedônia, em 335 a.C., grego considerado o pai da anatomia (GARDINER *et al.*, 2000; BAY; BAY, 2010).

A próstata é uma glândula sexual acessória exclusiva de mamíferos e fundamental para função reprodutiva, por meio da produção de um fluido chamado líquido prostático, que, em conjunto com o líquido seminal, nutre e auxilia na mobilidade dos espermatozoides. No adulto jovem, possui o tamanho aproximado de uma ameixa, mas, fisiologicamente, pode aumentar de tamanho com o envelhecimento (KUMAR; MAJUMDER, 1995; LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011; MARKER *et al.*, 2003). Seu desenvolvimento, crescimento, manutenção estrutural e funcional ocorre devido aos hormônios androgênicos, potenciais estimuladores da diferenciação e do crescimento do epitélio e do estroma prostáticos (FUJIKAWA *et al.*, 2005; GNANAPRAGASAM *et al.*, 2000; LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011; MARKER *et al.*, 2003). O período da adolescência é o que apresenta maior taxa de crescimento da próstata, estabelecido em cerca de 1,6 grama ao ano, atingindo seu peso fisiológico máximo na idade adulta, de aproximadamente 20 gramas. O crescimento da próstata é regulado por uma complexa interação entre o epitélio e o estroma prostáticos (LEE *et al.*, 2001).

Na década de 1980, o pesquisador McNeal concluiu que a próstata tratava-se de um órgão heterogêneo identificando uma região não glandular, chamada de estroma fibromuscular anterior, aparentemente sem importância para a função prostática. Diante disso concluiu que a próstata humana continha quatro zonas anatômicas, com conceitos histológicos, biológicos e sistemas ductais distintos: Zona Periférica (ZP), Zona Central (ZC), Zona de Transição ZT e Estroma Fibromuscular anterior. A ZP corresponde a 70% da próstata glandular, sendo esta a zona de maior incidência de carcinomas; a ZC corresponde a 25% da próstata glandular; a ZT a 5% da próstata glandular, sendo este local exclusivo do desenvolvimento de HPB; e o estroma fibromuscular anterior, uma região inteiramente não glandular constituída por tecido conjuntivo e muscular denso (Figura 1) (McNEAL, 1981a; 1981b; McNEAL *et al.*, 1988; SROUGI; DALL’OGLIO; ANTUNES, 2010).

Figura 1: Esquemas da divisão anatômica da próstata proposta por McNeal em quatro regiões: zona de transição, zona central, zona periférica e estroma fibromuscular anterior.



Fonte: McNEAL *et al.*, 1988; CHUNG; SOMMER; BROOKS, 2012 (traduzidos por ALVES, 2018).

Histologicamente, a próstata é composta de epitélio glandular, arranjado em ácinos e ductos, e de estroma, constituído por tecido fibromuscular e uma matriz protéica (CHUNG; SOMMER; BROOKS, 2012; LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011; SROUGI; DALL’OGLIO; ANTUNES, 2010). É encapsulada por um tecido conjuntivo denso não modelado, conhecido como tecido fibroelástico rico em músculo liso e muito vascularizado, contendo septos que penetram na glândula e a dividem em lóbulos ou zonas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

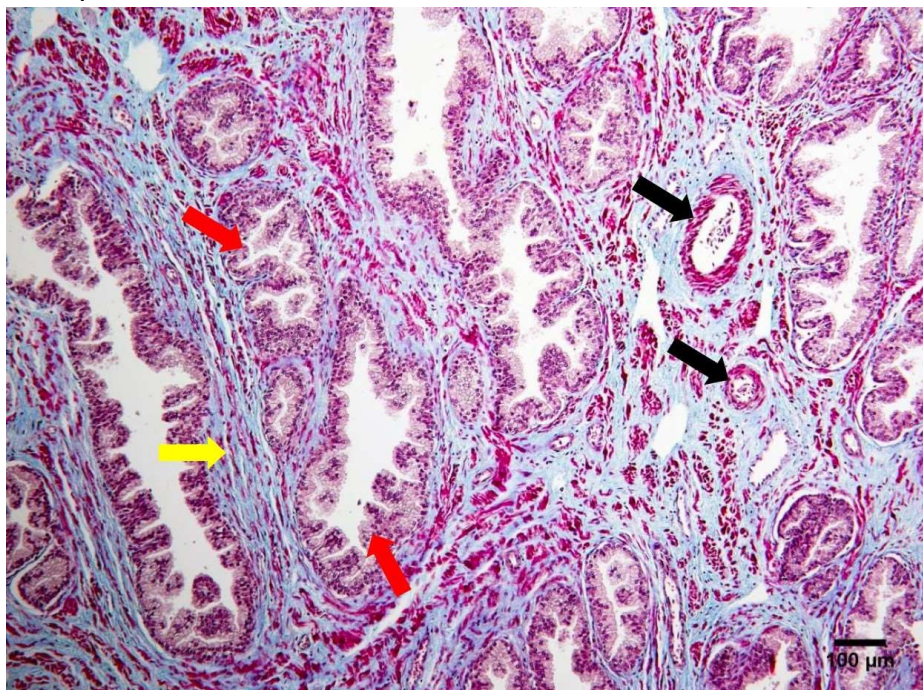
A estrutura prostática constitui-se por um conjunto de 30 a 50 glândulas tubuloalveolares ramificadas, formadas por um epitélio cuboide ou pseudoestratificado colunar, dependendo do nível de atividade secretora. Cada glândula é circundada por um estroma fibromuscular e tem um sistema de ductos ramificados que desembocam na uretra prostática (CHUNG; SOMMER; BROOKS, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

As glândulas estão organizadas em três regiões distintas: glândulas da mucosa, da submucosa e ramificadas compostas periféricas, denominadas glândulas principais. Morfologicamente, as glândulas da mucosa são mais curtas, estão associadas à mucosa uretral e são as únicas que frequentemente apresentam um

crescimento anormal, causando a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB). As da submucosa são intermediárias e estão dispostas perifericamente às glândulas da mucosa. As glândulas principais são maiores e apresentam um quantitativo maior e uma maior probabilidade de transformação maligna (CORMACK, 2003; GARTNER; HIATT, 2003; KIERSZENBAUM, 2008).

O epitélio glandular prostático apresenta quatro tipos celulares: células secretoras, basais, neuroendócrinas e transicionais. Cada uma destas com características específicas. As células secretoras são aquelas em maior quantidade no epitélio glandular, com morfologia colunar, margens não definidas, citoplasma abundante, núcleo basal e com grânulos secretores. São responsáveis pela produção da enzima fosfatase ácida e do Antígeno Prostático Específico (PSA), além de apresentarem uma grande quantidade de receptores de androgênio (SROUGI; DALL'OGGIO; ANTUNES, 2010) (Figura 2).

Figura 2: Fotomicrografia mostrando a composição histológica da próstata: o epitélio, formado pelos ácinos (setas vermelhas) e ductos (setas pretas) e o estroma (setas amarelas)



Fonte: ALVES, 2018.

As células basais apresentam-se em menor número, estando localizadas junto à membrana basal dos ácinos, com formato arredondado, citoplasma escasso e margens bem definidas. Essas células são as precursoras das células secretoras e sua proliferação tem papel relevante no desenvolvimento da HPB e na neoplasia

prostática maligna (SROUGI; DALL'OGGIO; ANTUNES, 2010).

As células neuroendócrinas são em menor número do epitélio prostático e estão dispersas entre as células epiteliais dos ácinos e ductos. Mesmo que sua função ainda não seja totalmente conhecida, sabe-se que apresentam a capacidade de secretar peptídeos como: serotonina, hormônio tireoestimulante, calcitonina e somatostatina, que possivelmente tem papel regulador no crescimento, desenvolvimento, proliferação, diferenciação e secreção de células epiteliais (BOSTWICK; CHENG, 2008; SROUGI; DALL'OGGIO; ANTUNES, 2010). Por fim, as células transicionais que estão localizadas nos ductos excretórios próximos à luz da uretra e podem dar origem às neoplasias epiteliais da próstata (SROUGI; DALL'OGGIO; ANTUNES, 2010).

O estroma prostático contribui com mais de 45% do peso da glândula, composto por tecido conjuntivo com fibras colágenas, fibras elásticas, fibroblastos, células musculares lisas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. As células epiteliais dos ácinos e ductos apoiam-se sobre uma membrana basal formada por colágeno do tipo IV e V, glicosaminoglicanos, polissacarídeos e glicolípidios. A membrana basal representa uma interface entre as células epiteliais e o estroma propriamente dito, constituído por colágeno tipo I e III, matriz proteica e células especializadas (fibroblastos, células musculares e neuroendócrinas). Os fibroblastos e as células musculares lisas são os tipos celulares predominantes (SROUGI; DALL'OGGIO; ANTUNES, 2010).

2.2 LESÕES TUMORAIS PROSTÁTICAS

As alterações tumorais na próstata podem ser caracterizadas histologicamente como malignas e benignas e a maioria dos tumores progride lentamente ao longo de anos – por vezes décadas – de modo que boa parte dos pacientes convive com a doença por muito tempo antes do surgimento dos sintomas.

2.2.1 Hiperplasia Prostática Benigna

A HPB é um problema frequentemente observado em homens com mais idade o que afeta negativamente a qualidade de vida e resulta em considerável intervenção médica e despesas (WEI; CALHOUN; JACOBSEN, 2005). A HPB é um diagnóstico

histológico definido como um aumento no número total de células epiteliais estromais, glandulares, músculo liso e tecido conjuntivo dentro da zona de transição (ZT) da próstata (CHUGHTAI *et al.*, 2016). Essa alteração pode causar o surgimento de nódulos prostáticos de tamanhos variados que, por sua vez, podem levar à obstrução prostática benigna e à obstrução da saída da bexiga. Embora a HBP isoladamente não exija necessariamente um tratamento, as obstruções causadas pelo seu crescimento estão frequentemente associadas a sintomas do trato urinário inferior, que podem exigir tratamento (FOO, 2019).

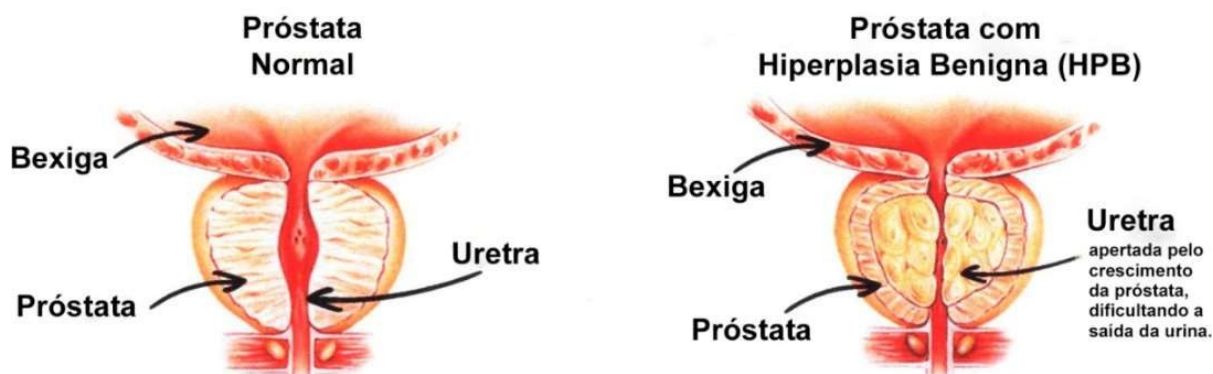
A prevalência de HBP diagnosticada histologicamente mostra uma elevação de aproximadamente 8% em homens de 31 a 40 anos, para 40 a 50% em homens de 51 a 60 anos e para mais de 80% em homens com mais de 80 anos. Espelhando as mudanças na HBP, a prevalência e gravidade dos sintomas do trato urinário inferior em homens tem a idade como um dos fatores determinantes (MADERSBACHER; SAMPSON; CULIG, 2019).

Os dados atuais mostram que a fisiopatologia da HPB está associada ao aumento relacionado à idade da, diidrotestosterona (DHT) (via atividade da 5 α -redutase na testosterona), estrogênio (via atividade da aromatase na testosterona) e fatores de crescimento celular prostático (LIAO *et al.*, 2012; MADERSBACHER; SAMPSON; CULIG, 2019; VUICHOUD; LOUGHLIN, 2015).

Algumas outras comorbidades de caráter imunológicos e metabólicos associados a HBP incluem: inflamação crônica de baixo grau, resistência à insulina e dislipidemia (DE NUNZIO; PRESICCE; TUBARO, 2016; MADERSBACHER; SAMPSON; CULIG, 2019; LEISEGANG *et al.*, 2022). Já do ponto de vista clínico, esta afecção está intimamente associada à síndrome do trato urinário inferior (STUI), caracterizada por hesitação urinária, fluxo urinário fraco, intermitência urinária, esvaziamento incompleto da bexiga e gotejamento pós-terminal (CHUGHTAI *et al.*, 2016).

Para diagnosticar a HPB, é imprescindível uma série de avaliações, como: análise de sintomas prostáticos, exame do toque retal, dosagem do PSA sérico, ultrassonografia transretal e abdominal e a biópsia prostática. No entanto, é relevante destacar que, assim como no caso do CaP, o diagnóstico final dessa hiperplasia é determinado somente pela análise histopatológica, Figura 3 (ZAMBRA, 2016).

Figura 3: Aspectos comparativos entre próstata normal e próstata hiperplásica



Fonte: <https://www.urologia-jau.com.br/hiperplasia-prostatica->

2.2.2 Câncer de próstata

O CaP é o segundo câncer mais comum em homens em todo o mundo, segundo dados do banco GLOBOCAN da Organização Mundial da Saúde (OMS), com uma estimativa de 1.6000.000 casos e 366.000 mortes anuais (FERLAY *et al.*, 2015).

No Brasil, o CaP também é o mais comum, desconsiderando o de pele, estimam-se 71.730 casos novos para cada ano do triênio 2023-2025. Esse valor corresponde a um risco estimado de 67,86 casos novos a cada 100 mil homens correspondendo a aproximadamente 23% de todos os cânceres diagnosticados nos homens no país. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CaP ocupa a primeira posição no país em todas as Regiões brasileiras, com um risco estimado de 77,89/100 mil homens e na Região Nordeste; de 61,60/100 mil homens (INCA, 2022).

As manifestações clínicas do CaP estão frequentemente ausentes no momento do diagnóstico. O comportamento clínico varia de um tumor assintomático, microscópico e bem diferenciado detectado pela triagem, que pode nunca se tornar clinicamente significativo, até o rastreamento mais raro detectado ou o câncer de alto grau clinicamente sintomático, agressivo, que causa metástases, morbidade e morte. No momento do diagnóstico, 78% dos pacientes têm câncer localizado e o envolvimento de linfonodos regionais está presente em 12% e 6% têm metástases à distância (TAPLIN; SMITH, 2022).

A maioria das neoplasias malignas de próstata são classificadas como adenocarcinomas, que são neoplasias que tem início em um tecido epitelial ou glandular, mas ainda podem ser encontrados carcinomas de pequenas células,

tumores neuroendócrinos (exceto carcinomas de pequenas células), carcinomas de células transicionais e sarcomas (YANG, 2019).

Alguns tumores da próstata crescem e metastatizam rapidamente, mas a maioria cresce lentamente. De fato, estudos de autópsia mostram que muitos homens mais velhos que venham a morrer de outras causas também tiveram CaP que nunca os afetou durante suas vidas (ZELEFSKY; MORRIS; EASTHAM, 2019).

Dos vários fatores de risco de CaP conhecidos, os mais importantes são idade, etnia, fatores genéticos e possivelmente fatores dietéticos. O CaP tem uma das relações mais fortes entre a idade que qualquer outra malignidade humana. O CaP diagnosticado clinicamente raramente ocorre antes dos 40 anos, mas a incidência aumenta rapidamente a partir de então, atingindo o pico entre as idades de 65 e 74 anos. Casos de CaP para homens com idades entre 35 a 44 anos, 45 a 54 anos, 55 a 64 anos, 65 a 74 anos, 75 a 84 anos e 85 anos ou mais entre 2011 e 2015 foram 0,5%, 9,0%, 32,7%, 38,8%, 15,1% e 3,9%, respectivamente no mundo (SARTOR, 2022).

A prevalência de malignidade com base no exame histológico da próstata de homens sem evidência clínica de CaP é muito maior do que a taxa de doença diagnosticada clinicamente (DELONGCHAMPS; SINGH; HAAS, 2006). Embora as taxas de prevalência relatadas para CaP oculto tenham variado substancialmente em diferentes estudos, a prevalência aumentou de forma significativa com a idade em todos os estudos conforme Tabela 1 (SARTOR, 2022). A variabilidade entre os relatórios pode refletir diferenças nas técnicas patológicas ou diferenças geográficas devido a fatores ambientais ou étnicos.

Tabela 1: Porcentagem de índice de incidência de câncer de próstata no mundo

IDADE	PORCENTAGEM (%)
20 a 30 anos	2 a 8 com câncer oculto
31 a 40 anos	9 a 31
41 a 50 anos	3 a 43
51 a 60 anos	5 a 46
61 a 70 anos	14 a 70
71 a 80 anos	31 a 83
81 a 90 anos	40 a 73

Fonte: Fatores de risco para câncer de próstata (SARTOR, 2022)..

O CaP é mais comum em homens pretos que em brancos ou hispânicos, talvez relacionado a uma combinação de fatores dietéticos e/ou genéticos (PLATZ *et al.*, 2000). As taxas de incidência média anual para homens na faixa dos 70 anos por 100 mil habitantes são de aproximadamente 1.600, 1.000 e 700 para afro-americanos, brancos e asiáticos-americanos, respectivamente. Em uma série multi-institucional de mais de 12.000 casos, 8,3% dos homens negros e 3,3% dos homens brancos tinham menos de 50 anos de idade (SARTOR, 2022).

Uma meta-análise de dados de pacientes individuais de 8.452 pacientes com CaP metastático resistente à castração tratados em nove estudos randomizados de fase III usando docetaxel não encontrou diferença na sobrevida global mediana entre homens afro-americanos e americanos brancos (21,0 versus 21,2 meses). Na análise multivariável ajustada para fatores de risco estabelecidos, o resultado combinado mostrou os melhores resultados na população afro-americana (razão de risco [HR] para morte 0,81, IC 95% 0,72-0,92) (PALLER; WANG; BRAWLEY, 2019).

A neoplasia maligna da próstata tem um forte componente herdado. Homens com histórico familiar de CaP em ambos os lados da família, particularmente aqueles com um parente de primeiro grau diagnosticado com idade <65 anos, apresentam risco aumentado (BARBER *et al.*, 2018). Além disso, ter uma história familiar de outros cânceres potencialmente hereditários (por exemplo, câncer de mama diagnosticado com idade <50 anos, câncer de mama masculino, câncer colorretal, câncer de ovário, câncer de pâncreas, melanoma) também pode aumentar o risco de CaP. Homens com histórico familiar de câncer de mama também estão em maior risco de CaP (BRATT *et al.*, 2016; MUCCI *et al.*, 2016).

Uma alta ingestão de carne vermelha, gordura, laticínios e ovos foi associada a um risco aumentado de CaP (BASHIR; MALIK, 2015). A carne é rica em gordura saturada e colesterol, e os laticínios também são ricos em gorduras saturadas. No entanto, isso não implica necessariamente que a gordura animal seja um fator de risco para CaP. Outros aspectos precisam ser considerados. Por exemplo, altos níveis de consumo de carne vermelha também podem significar um menor consumo de alimentos vegetais e pobres em fibras. Os produtos lácteos também contêm cálcio e outras substâncias, como o zinco, que podem estar associadas ao aumento do risco de CaP. A maneira como os alimentos são preparados também é outra consideração importante (CHUNG; HORIE; CHIONG, 2019). Masuda *et al.* (2013) encontraram um risco significativamente aumentado de CaP e doença de alto grau na biópsia entre

homens obesos e com sobrepeso no Japão. Estudo no Paquistão também encontrou risco aumentado de CaP para homens obesos com índice de massa corporal > 25. No entanto, outros estudos não encontraram associação com índice de massa corporal e risco de CaP. Estudos mostraram que o exercício aeróbico suprime a progressão de tumores de próstata e metástases em modelos animais e aumenta os resultados bioquímicos do crescimento do CaP em humanos (KANG *et al.*, 2022)

Fumar pode aumentar o risco de CaP, pois o tabaco é conhecido por afetar os níveis de esteróides e por conter vários agentes cancerígenos (FOWKE *et al.*, 2015). Fumantes tiveram aumento do nível de testosterona e androsterona e pode estar envolvido na progressão do câncer. Recentemente, foi realizada uma meta-análise que mostrou forte relação do tabagismo com seu início e progressão. Além disso, também mostrou que tabagismo foi associado com mortalidade e incidência de doenças (MALIK *et al.*, 2018).

2.2.3 Estadiamento tumoral

Um sistema de estadiamento é uma maneira padrão para descrever o grau de disseminação do câncer. Para o CaP, o sistema de estadiamento mais utilizado é o sistema TNM American Joint Committee on Cancer (AJCC), que foi atualizado mais recentemente em 2018.

Os principais estágios do CaP variam de I (1) a IV (4). Alguns estágios são divididos ainda mais (A, B). Como regra, quanto menor o número, menor o desenvolvimento tumoral. Um número mais alto, como o estágio IV, significa que o câncer já apresenta metástase e, dentro de um estágio, uma letra anterior significa um estágio inferior. Embora o desenvolvimento do câncer em cada pessoa seja particular em virtude de fatores como o tipo da mutação, estado nutricional, condição imunológica e outros fatores, cânceres com estágios semelhantes tendem a ter uma perspectiva quanto ao prognóstico semelhante e geralmente os protocolos de terapêutica são semelhantes (KLEIN, 2021).

O escore de gleason complementa o estadiamento TMN e serve para nortear o tratamento. Para se obter o escore total da classificação de Gleason, que varia de 2 a 10, o patologista gradua de 1 a 5 as duas áreas mais freqüentes do tumor e soma os resultados. Quanto mais baixo o escore de Gleason, melhor será o prognóstico do paciente. Escores entre 2 e 4 significam que o câncer provavelmente terá um

crescimento lento. Escores intermediários, entre 5 e 7, podem significar um câncer de crescimento lento ou rápido e este crescimento vai depender de uma série de outros fatores, incluindo o tempo decorrido após o diagnóstico. Escores mais altos da escala, entre 8 e 10, significam um câncer de crescimento muito rápido (Tabelas 2 e 3) (SMITH *et al.*, 2021).

Tabela 2: Estadiamento tumoral TNM para o câncer de próstata

Estágio	T	N	M	PSA	Grupo histológico
I	cT1a-cT2a ou pT2	N0	M0	< 10	1
IIA	cT1a-cT2a ou pT2	N0	M0	≥ 10 e < 20	1
	cT2b/cT2c	N0	M0	< 20	1
IIB	T1/T2	N0	M0	< 20	2
IIC	T1/T2	N0	M0	< 20	3 ou 4
IIIA	T1/T2	N0	M0	≥ 20	1-4
IIIB	T3/T4	N0	M0	Qualquer	1-4
IIIC	Qualquer	N0	M0	Qualquer	5
IVA	Qualquer	N1	M0	Qualquer	Qualquer
IVB	Qualquer	Qualquer	M1	Qualquer	Qualquer

Fonte: Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica 2022.

Tabela 3: Grupos histológicos na classificação de Gleason no câncer de próstata

Grupo	Gleason score	Padrão Gleason
1	≤ 6	$\leq 3+3$
2	7	3+4
3	7	4+3
4	8	4+4, 3+5 ou 5+3
5	≥ 9	4+5, 5+4 ou 5+5

Fonte: Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica 2022.

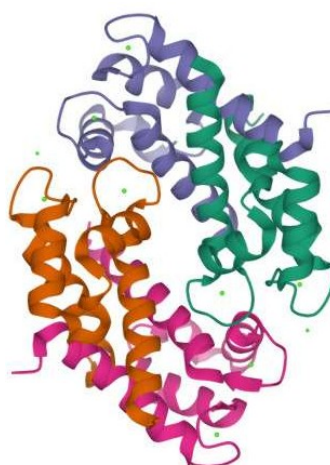
2.3 BIOMOLÉCULAS RELACIONADAS ÀS ALTERAÇÕES PROSTÁTICAS

Os marcadores são substâncias com características principalmente proteicas, localizadas no próprio tecido alterado ou também no sangue e em outros fluidos biológicos. Essas substâncias podem ser produzidas pelo próprio organismo, em resposta ao surgimento de alterações, como por exemplo as neoplasias. Como marcador laboratorial clássico para avaliações prostáticas temos o Antígeno prostático específico (PSA) que é uma glicoproteína expressa por tecido prostático normal ou neoplásico (RODRIGUES; SALES, 2013).

2.3.1 Calprotectina

A partir de 1983 a calprotectina (CP) começou a ser descrita como uma proteína presente no citoplasma de neutrófilos. Posteriormente, foi encontrada em monócitos, queratinócitos, tecido muscular e infiltrados de macrófagos teciduais. Os níveis protéicos de calprotectina podem aumentar 100 vezes durante condições inflamatórias, sendo desta forma um marcador de fase aguda. O primeiro membro identificado da família desta proteína foi purificado do cérebro bovino e chamou-se “S-100”, proteína cujo nome deriva da sua solubilidade em uma solução 100% saturada de sulfato de amônio. Existem ainda muitas controvérsias na nomenclatura atribuída a calprotectina, contudo, S100A8/S100A9 e MRP8/14 são os três sinônimos mais utilizados (KRUZLIAK *et al.*, 2014) (Figura 4).

Figura 4: Estrutura molecular da calprotectina



Fonte: <https://www.rcsb.org/pages/about-us/index>

A calprotectina (CP) é uma proteína de 36KDa, constituída de duas cadeias pesadas e uma leve (FAGERHOL, 1996), ligante de cálcio e zinco da família S-100, com grande expressão no citoplasma de células envolvidas no processo de defesa do organismo, como nos neutrófilos, monócitos e células dentríticas. Como um mediador necessário da resposta do sistema imune inato, a CP aumenta a afinidade da ligação de neutrófilos ao endotélio vascular por meio dos receptores de integrina CD11b/CD18 e ativa leucócitos circulantes servindo como um receptor para os produtos de glicação avançada (HEJL *et al.*, 2018; KOTZE *et al.*, 2015).

A CP pertence a família das proteínas S100 e é formada por um complexo de duas proteínas: a S100A8 (também conhecida como Calgranulina A ou MRP8) e S100A9 (denominada de Calgranulina B ou MRP14) (FOELL *et al.*, 2004; HEJL *et al.*, 2017). A CP Apresenta-se em várias condições patológicas agudas e crônicas, como também, em condições oncológicas (SILVA, 2015).

A CP possui diversas funções tanto intracelular como extracelular. Nas funções intracelulares está envolvida na ativação da NADPH-oxidase neutrofílica (KERKHOFF *et al.*, 2012) e na modulação do citoesqueleto durante o processo de migração dos fagócitos (SHABANI *et al.*, 2018). As funções extracelulares incluem a ação pró-inflamatória, antimicrobiana e antifúngicas (SOHNLE *et al.*, 1996), quimiotaxia, regulação da atividade de metaloproteinase de matriz (MMP) e apoptose de linhas de células tumorais (GEBHARDT *et al.*, 2006). Alguns estudos afirmam que a CP estimula o recrutamento de leucócitos e promove a produção de citocinas e quimiocinas, além de regular a adesão e migração de células leucocitárias. Quando os neutrófilos e monócitos são ativados, eles respondem secretando a CP no fluido extracelular, desta forma mostra-se como um potente reagente de fase aguda com um aumento de mais de 100 vezes durante condições inflamatórias (FICO *et al.*, 2018).

É um componente da resposta imunológica inata produzida em condições fisiológicas por células mieloides, mas em condições patológicas podem ser expressas por células epiteliais (KERKHOFF *et al.*, 2012) estando associada ao processo de indução da apoptose celular, ao recrutamento de monócitos e é liberada em consequência a ruptura da célula (SMITH *et al.*, 2012; FICO *et al.*, 2018). Tratando-se de uma proteína presente em processos inflamatórios, a CP se relaciona muito bem com a análise histopatológica, pois consegue refletir as condições de migração celular, possibilitando a avaliação do grau e o tipo de inflamação estabelecida

(NEUBAUER; DUDKOWIAK, 2010). Embora os mecanismos precisos pelos quais CP exibe atividade indutora de apoptose contra várias células tumorais não tenham sido totalmente compreendidos, parece mais provável que isso seja devido à sua capacidade de se ligar e quelar metal bivalente de sinalização mediada por receptores de superfície celular (YUI *et al.*, 2002; YUI; NAKATANI; MIKAMI, 2003). Embora os receptores que mediam a apoptose induzida por CP permaneçam indefinidos, linhas de evidência demonstram que o receptor multiligante para produtos finais de glicação avançada (RAGE) é o receptor potencial envolvido nesta função (GEBHARDT *et al.*, 2008; TUROVSKAYA *et al.*, 2008).

Apesar do elevado número de publicações que mostra a CP exercendo atividade de morte celular contra várias linhagens de células tumorais por meio de diferentes mecanismos citotóxicos, sua atividade e mecanismo(s) de ação contra células de CaP humano (LNCaP) ainda permanecem obscuros (SATTARI; PAZHANG; IMANI, 2014).

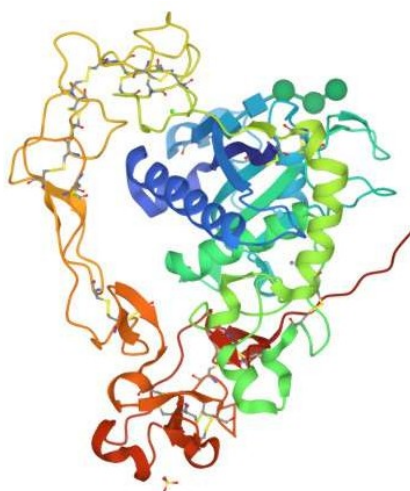
Por se tratar de uma proteína amplamente expressa em neutrófilos, esta se relaciona muito bem com a análise histopatológica, pois reflete as condições de migração leucocitária possibilitando consequentemente a avaliação do grau e o tipo de inflamação estabelecida (NEUBAUER; DUDKOWIAK, 2010).

2.3.2 ADAM 10

As proteínas ADAM, que compreendem a associação de um domínio de integrina e outro metaloprotease, são uma família de mais de 30 proteases glicosiladas ancoradas à membrana, dependentes de zinco (Zn^{2+}) envolvidas em processos relacionados à interface célula-célula, célula-matriz extracelular e secreção de TNF- α (fator de necrose tumoral α), um importante imunomodulador. Desempenham também um papel importante na proliferação celular, migração, invasão e angiogênese, e relacionam-se à metástase de tumores humanos (SAHA *et al.*, 2019).

A ADAM10 (Figura 5) é uma enzima de processamento de TNF que cliva o pro-TNF, uma proteína precursora ligada à membrana, além de estar associada à modificação proteolítica de componentes da superfície celular e da MEC. Além de seu homólogo estrutural a ADAM17, essa proteína é uma das mais estudadas da família ADAM (SEEGAR *et al.*, 2017).

Figura 5: Estrutura molecular da ADAM10



Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/6BE6>

A modificação proteolítica da ADAM10 está relacionada com a capacidade de eliminação de uma infinidade de substratos que incluem moléculas de adesão celular, como por exemplo as caderinas. Para a maioria desses substratos, a eliminação mediada por ADAM10 é um pré-requisito para a ocorrência subsequente da proteólise (WETZEL; SEIPOLD; SAFTIG, 2017).

A atividade de ADAM10 é regulada por uma série de mecanismos diferentes, incluindo controle transcricional e translacional. A região promotora de ADAM10 contém vários locais de ligação de fator de transcrição resultando em sua transcrição. Estes incluem sítios de ligação para os fatores de transcrição SP1 e USF, e a proteína de ligação X-box (XBP) -1, bem como um elemento responsivo ao ácido retinóico (SAHA *et al.*, 2019).

Desregulação na atividade ADAM10 vem sendo associada a diferentes doenças humanas, incluindo distúrbios autoimunes e neoplásicos. O papel central do ADAM10 nessas doenças revela a potência da administração de fármacos direcionadas a ADAM10 como uma opção terapêutica futura (WETZEL; SEIPOLD; SAFTIG, 2017).

Estudos revelaram que a ADAM10 foi superexpressa em uma variedade de tumores. Além disso, o silenciamento de ADAM10 inibiu significativamente o crescimento celular e a metástase em tecidos prostáticos (BINDER; WARD, 2021).

As ADAMs podem desempenhar um papel na formação/progressão do tumor

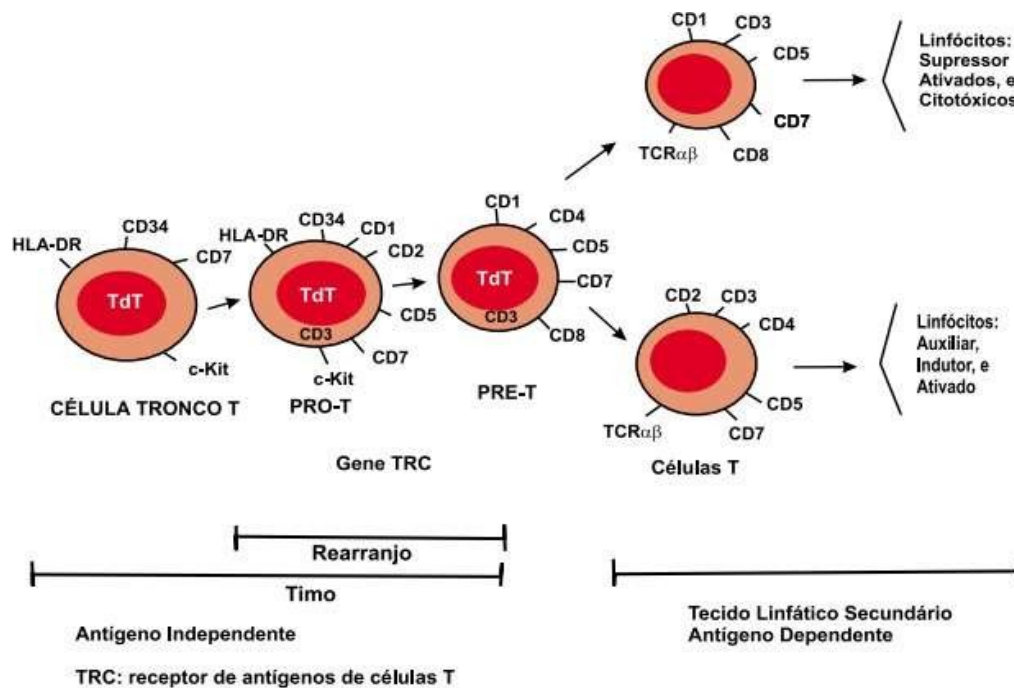
por meio de suas capacidades proteolíticas e/ou adesivas. As ADAMs específicas liberam vários fatores de crescimento e citocinas causalmente envolvidas na estimulação do crescimento, migração e formação/progressão do câncer. ADAM-10 pode liberar Fator de Crescimento Epidermal (EGF) favorecendo a progressão tumoral, enquanto o bloqueio da ADAM 10 pode diminuir o crescimento e invasividade de neoplasias prostáticas (SAHIN *et al.*, 2004).

ADAM10 foi estudada para clivar Trop-2 em células cancerosas. O Trop-2 é um transdutor de sinal transmembranar monomérico proteolítico expresso em células epiteliais em diversos estágios da diferenciação celular. Estudos demonstraram que o processamento proteolítico de Trop-2 pela ADAM10, conduz correspondentemente à disseminação metastática (TREROTOLA *et al.*, 2021).

2.3.3 CD3 E CD20

As células possuem em suas estruturas de membrana proteínas específicas passíveis de identificação por anticorpos sintetizados em laboratório, chamados de anticorpos monoclonais. Estudos realizados observaram que grupos de diferentes anticorpos monoclonais, reconheciam o mesmo antígeno celular presente em mais de uma célula, sejam estas células normais, células malignas ou mesmo células de linhagens evolutivas. Esses antígenos de diferenciação celular reconhecidos por grupos de anticorpos monoclonais acabaram sendo denominados do inglês *cluster of differentiation* (CD). Laboratorialmente foram reconhecidos experimentalmente em torno de 170 diferentes tipos de CD (Figura 6), conhecidos por CD1, CD2, CD3, CD4 e tantos outros CDs (NAOUM, 2001).

Figura 6: Apresentação de expressão de antígenos de superfície (CDs) durante a maturação de linfócitos T



Fonte: Naoum (2001)

O receptor de células T (TCR), associado à várias subunidades CD3, formam um complexo de membrana integral multimérica, conhecido como complexo TCR-CD3, que é essencial para o bom funcionamento e desenvolvimento de células T. O TCR é um heterodímero consistindo em uma cadeia TCR α e TCR β ligados entre si através de uma ponte dissulfureto. Cada cadeia possui uma imunoglobulina extracelular, um domínio transmembrana helicoidal e uma região citosólica muito curta. O domínio Ig de ambas as cadeias se formam conjuntamente o "domínio de ligação ao ligante" que interage com o péptido antigênico ligado ao complexo de histocompatibilidade maior (MHC), resultando em ativação das células T, que requer ainda a associação de TCR com CD3. As cadeias CD3 invariantes estão presentes como heterodímeros CD3 δ e CD3 γ e um homodímero CD3 $\zeta\zeta$ (SHARMA; LENSINK; JUFFER, 2014).

Cada subunidade CD3 possui um domínio extracelular que interage com o domínio extracelular do TCR. Embora as estruturas tridimensionais dos domínios extracelulares dos dímeros TCR e CD3 foram resolvidos individualmente, muitas questões permanecem em aberto quanto às características estruturais da organização do complexo TCR-CD3 (SHARMA; LENSINK; JUFFER, 2014).

Alguns estudos já demonstram que padrões distintos de infiltração de células imunes no microambiente tumoral estão associados à agressividade da doença em diversos tipos de neoplasias (HORN *et al.*, 2016; WIKBERG; LING; LI, 2017). A caracterização da composição do infiltrado celular no microambiente tumoral mostra uma maior abundância das células inflamatórias no estroma do CaP do que no estroma benigno, observando um aumento células B (expressando CD20), T (expressando CD3) e macrófagos M1 e M2, indicando um papel biológico complexo para infiltração (ANDERSEN *et al.*, 2021).

É muito comum ser observado um infiltrado linfoplasmocitário dentro da próstata e isto está ligado à dediferenciação do epitélio prostático criando um ambiente potencialmente neoplásico, com múltiplas vias desreguladas que alteram o microambiente tumoral e proporcionam um ambiente altamente proliferativo para o CaP (SCIARRA *et al.*, 2021).

CD20 é uma molécula de superfície embebida na membrana que desempenha um papel no desenvolvimento e diferenciação de células B em plasmócitos. Aparece após HLA-DR, TdT, CD19 e Expressão de CD10 (NAEIM *et al.*, 2013).

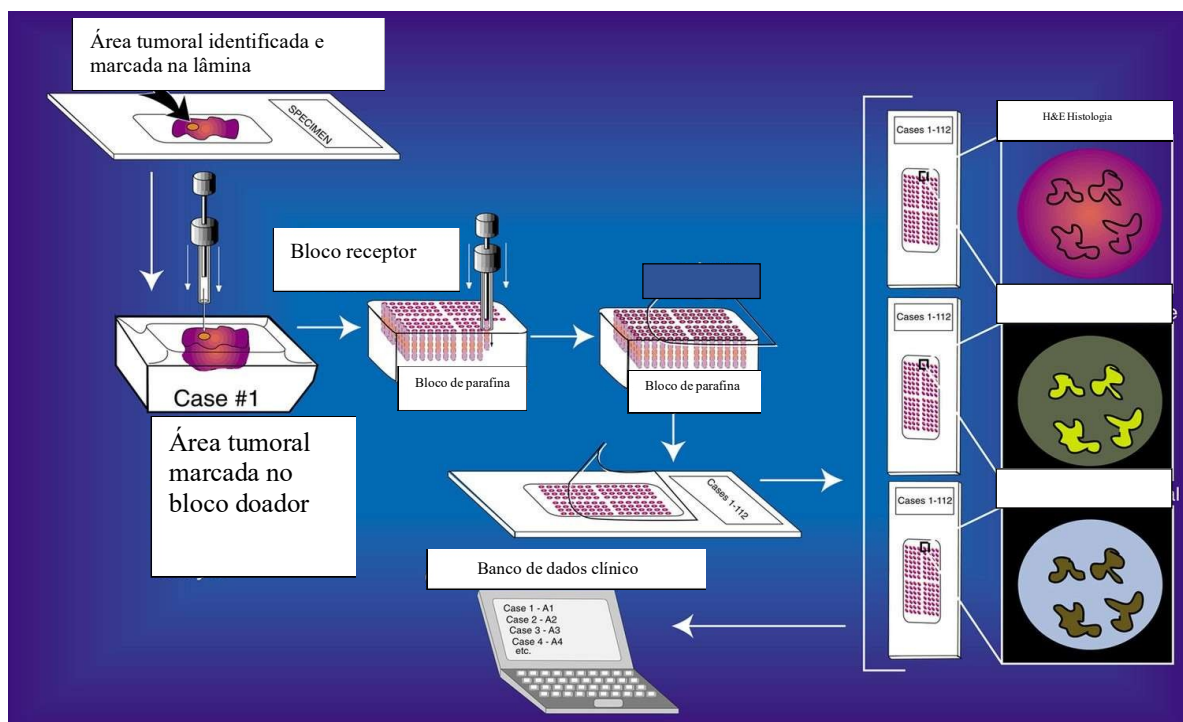
2.4 TISSUE MICROARRAY

O *Tissue Microarray* (TMA) é uma técnica relativamente nova que foi descrita em 1998 com ampla aceitação pela literatura mundial e pode ser usada para superar problemas significativos. Trata-se da construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais obtidos de dezenas ou centenas de blocos de parafina originais que permite a realização de pesquisas em uma escala muito maior e com custos bem mais baixos (KONONEN *et al.*, 1998).

É um método para análise de alto rendimento de biomarcadores de tecido, comumente usado na pesquisa translacional do câncer. A forma cilíndrica e o pequeno diâmetro da amostra retirada do bloco doador maximizam o número de amostras que podem ser retiradas de um bloco doador e minimizam o dano tecidual. Este último é importante para os patologistas, pois agora eles podem ceder aos pesquisadores acesso ao material e, ao mesmo tempo, reter os blocos de tecido (LEIGHTON *et al.*, 2018) (Figura 7).

Entre as várias aplicações do método destaca-se: avaliação da sensibilidade e da especificidade de novos anticorpos de imuno-histoquímica ou novas sondas de Fish/Cish desenvolvidos nos laboratórios ou comerciais. É possível, ainda, analisar comparativamente diferentes clones de anticorpos, distintos protocolos de reação ou diferentes sistemas de amplificação, pesquisa em larga escala de fatores prognósticos ou preditivos das neoplasias, uniformização das reações nos grandes estudos retrospectivos e até validação ao nível protéico da hiperexpressão ou hipoexpressão gênica identificada nos estudos feitos pela análise da quantificação do DNA complementar (DEY, 2018).

Figura 7: Processo de montagem do TMA



Fonte: <https://www.geneticistinc.com/blog/tissue-microarray-an-evolving-diagnostic-and-research-tool>

A utilidade prognóstica para TMAs foi demonstrada em vários cânceres humanos, como mama, bexiga urinária e câncer de rim (MOCH *et al.*, 2009; NOCITO *et al.*, 2001; TORHORST *et al.*, 2001).

2.5 ENSAIOS QUIMILUMINESCENTES

A quimiluminescência (QL) é o processo de emissão de luz como produto ou um dos produtos de uma reação química definida pela primeira vez por Wiedemann

em 1888. Existe uma diferenciação entre a QL e o fenômeno de emissão de luz devido a um aumento de temperatura, a incandescência, que seria um processo físico, não químico, decorrente da emissão de radiação. Portanto, a QL pode ser definida como uma reação fria que envolve a formação de um estado eletrônico excitado a partir de uma complexa sequência reacional altamente exotérmica (MA *et al.*, 2017; RODA, 2011; ZHAO *et al.*, 2021).

Os átomos ao absorverem energia, fazem transições entre seus níveis energéticos que são responsáveis pela excitação dos elétrons em orbitais moleculares ocupados de mais alta energia (HOMO, *highest occupied molecular orbitals*) para os orbitais desocupados de mais baixa energia (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbitals*). As partículas-ondas que transitam entre os orbitais HOMO e LUMO emitem luz e são chamadas de fótons. O processo de emissão de luz através deste fenômeno é denominado luminescência, que pode ser classificada de acordo com o tipo de estímulo energético em quimiluminescência, fotoluminescência, bioluminescência, sonoluminescência, mecano ou triboluminescência, radioluminescência e termoluminescência (MA *et al.*, 2017).

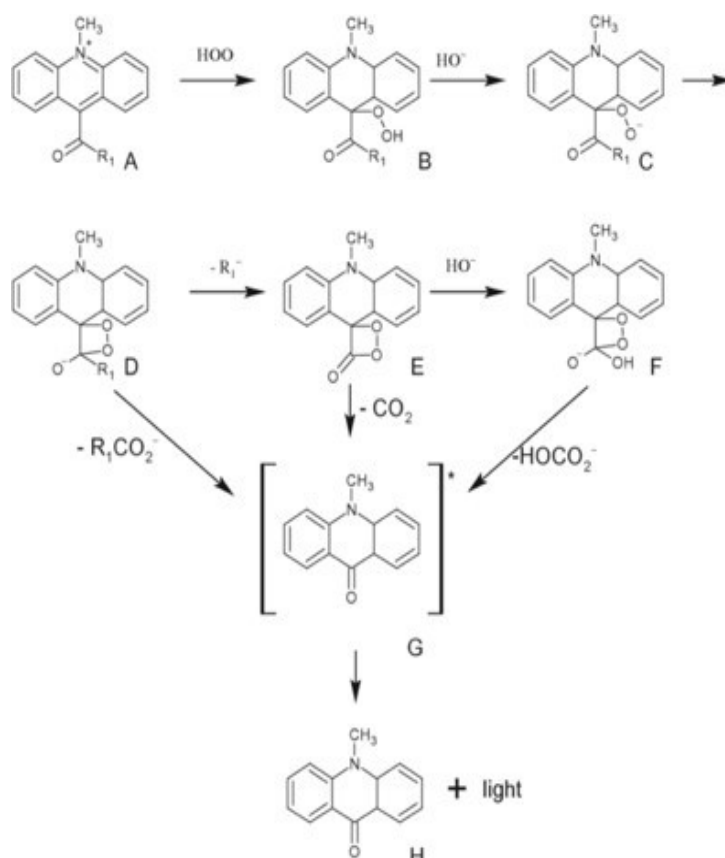
As substâncias quimiluminescentes, tais como lofina, lucigenina, etanodioato de bis, pirogalol, luciferina luminol, isoluminol e os derivados da acridina podem ser detectadas na faixa de fentomoles ou atomoles (10^{-15} a 10^{-18} mol), com sensibilidade superior aos ensaios espectrofotométricos (10^{-6} a 10^{-9} mol) e fluorimétricos (10^{-9} a 10^{-12} mol) (ZHAO *et al.*, 2021).

Devido a possibilidade de detecção ultrassensível, os ensaios de QL tem sido empregado em análises laboratoriais que requerem uma alta sensibilidade, como a determinação de citocinas, fatores de crescimento e proteínas relacionadas a processos patológicos específicos. Outras vantagens podem ser apontadas como a rapidez do teste, toxicidade inferior comparada à oferecida por radioisótopos, não agressão ao meio ambiente, amplo campo de aplicações analíticas e especificidade (RODA, 2011; WEEKS *et al.*, 1983).

A acridina ($C_{13}H_9N$) é um composto orgânico aromático, estruturalmente relacionado ao antraceno com grupos centrais substituídos por nitrogênio. Os sais de acridina podem ser estimulados para produzir luz na presença de peróxido de hidrogênio em meio alcalino diluído e na ausência de um catalizador (WEEKS *et al.*, 1983). O mecanismo de QL dos derivados de acridina foi elucidado por Weeks e colaboradores em 1983. O éster de acridina (EA), em especial, oxida rapidamente

com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), devido a adição de íons de hidroperóxido ao anel acridina no carbono 9, seguido por clivagem da ligação éster fenólica (Figura 9). Esta sequência de reações leva a formação de N-metilacridona, que em estado excitado comporta-se como um composto emissor de fótons de curto período (aproximadamente 5 segundos) a 470 nm (ZHAO *et al.*, 2021).

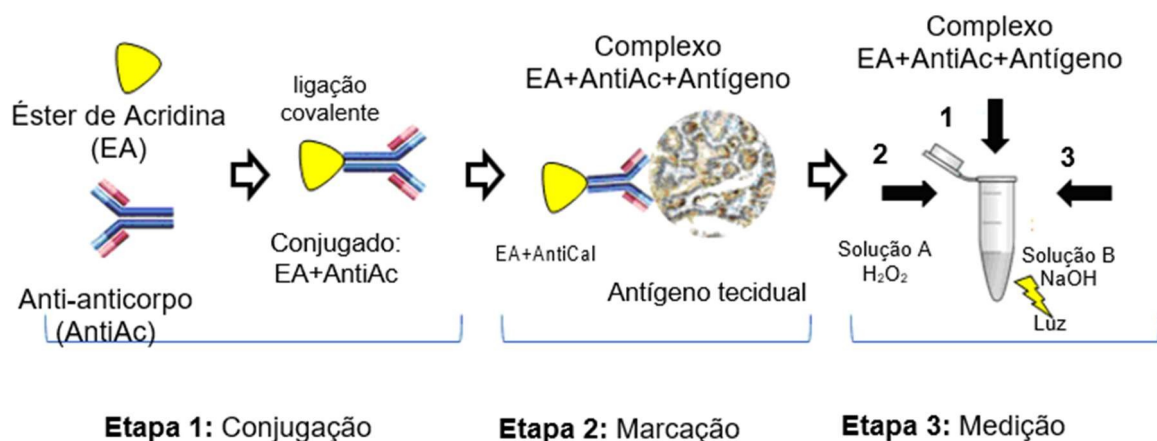
Figura 8: Esquema de reação quimiluminescente dos ésteres derivados de acridina



Fonte: RODA, 2011

Ensaio imunoluminescente apresentam elevada sensibilidade e estabilidade analítica. Estes se baseiam na detecção da emissão de luz, decorrente da reação entre o antígeno e anticorpo marcados por compostos quimioluminescente. O EA é capaz de se ligar covalentemente a anticorpos de amostras sorológicas e teciduais, produzindo compostos de alta quimioluminescência que podem ser captados e quantificados por equipamentos capazes de transformar a luz emitida em impulsos elétricos (MA *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2021).

Figura 9: Esquema de ensaio imunoquimiluminescente com éster de acridina



Fonte: Adaptado de Araújo Filho *et al.*, 2011

2.6 APLICAÇÕES DA QUIMILUMINESCÊNCIA NA SAÚDE

A QL possui aplicações diversas em química analítica, principalmente, na área da análise por injeção em fluxo, cromatografia de coluna líquida e sistemas de separação por eletroforese capilar, bem como em imunoenaios (GARCIA-CAMPAÑA *et al.*, 2003).

Dentre os inúmeros benefícios da utilização dos métodos luminescentes podemos citar: limite de detecção ultrasensível, testes rápidos e um amplo campo de aplicações analíticas, toxicidade inferior comparada à oferecida por radioisótopos, não agressão ao meio ambiente e especificidade (FERREIRA; ROSSI, 2002; KRICKA, 2003). A quimioluminescência tem também como grande vantagem ser um sistema frio uma vez que a energia na forma de luz é produzida diretamente de uma reação química, sem passar por um estágio intermediário envolvendo calor (GÁMIZ-GRACIA *et al.*, 2009).

A aplicação da QL como instrumento analítico depende da acoplagem da substância de interesse a um dos elementos participantes da reação quimiluminescente ou ao produto no estado excitado. A concentração da amostra desconhecida será proporcional à produção de luz total emitida ou a um parâmetro físico associado à luminescência, tal como cor ou polarização da luz emitida (CAMPBELL; HALLET; WEEKS, 1985).

Algumas análises laboratoriais baseadas em princípios quimiluminescentes têm sido desenvolvidas para dosagens que requerem uma alta sensibilidade, como a

determinação de lectinas, fator de crescimento epidérmico e de crescimento endotelial vascular (Brustein *et al.*, 2012). Dentre a grande variedade de testes já disponíveis comercialmente estão aqueles utilizados na avaliação de função tireoidiana, dosagem de PSA (Antígeno prostático específico), fertilidade, marcadores tumorais, monitoramento de drogas terapêuticas, hepatite, proteínas específicas e esteróides (SILVA *et al.*, 2017).

Devido à necessidade de substituir os marcadores radioisotópicos que estavam se tornando poucos populares devido à sua curta meia vida, ao perigo potencial à saúde e aos problemas quanto aos dejetos gerados, o éster de acridina foi introduzido em imunoensaios (WEEKS *et al.*, 1983). Desde então o éster de acridina tem sido foco de pesquisas para ampliar sua aplicação nas mais diversas áreas de Biotecnologia (ADAMEZYK *et al.*, 2001).

Após conjugado a diversas moléculas, o éster de acridina tem sido empregado na preparação de sondas citoquímicas e histoquímicas. Assim como o éster de acridina, outros compostos, como o luminol e isoluminol, também são utilizados como marcadores em imunoensaios quimiluminescentes (KRICKA, 2003).

Em nosso laboratório, foi testada a aplicação dos ensaios quimiluminescentes utilizando o éster de acridina conjugado à lectina concanavalina-A em lesões mamárias (CAMPOS *et al.*, 2006), e recentemente também estão sendo testados ensaios imunoquimiluminescentes em lesões de mama e pele.

3 JUSTIFICATIVA

Em termos de incidência, o CaP mostra-se como a segunda neoplasia maligna mais frequente em homens no mundo. Foram estimados 1.280 mil casos novos, o equivalente a 7,1% de todos os valores de cânceres considerados. Esse valor corresponde a um risco estimado de 33,1/100 mil homens. As maiores taxas de incidência de CaP encontram-se na Austrália e Nova Zelândia e nos países europeus (Norte e Leste) (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018).

No Brasil, ocorreram em 2017, 15.391 óbitos de CaP. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CaP ocupa a primeira posição no país em todas as Regiões brasileiras, com um risco estimado de 72,35/100 mil homens, e na Região Nordeste de 65,29/100 mil homens (INCA, 2022).

Na região nordeste o CaP mostra-se como o mais prevalente entre os homens com cerca de 40,7% de todas as tumorações. O estado de Pernambuco segue a tendência regional e nacional e mostra esta neoplasia como a de maior incidência entre os indivíduos do sexo masculino se excluídas as neoplasias de pele não melanomas. O principal fator de risco é a idade e sua incidência aumenta significativamente a partir dos 50 anos (INCA, 2022).

Deste modo, torna-se imperativo avanços do conhecimento científico nesta área. O estudo dos mecanismos moleculares inerentes e a identificação de novos marcadores revestem-se da maior importância para o aparecimento de novas formas de prevenção e tratamento das lesões neoplásicas, diminuindo a sua mortalidade e morbidade e aumentando a qualidade de vida dos pacientes.

A busca por novos biomarcadores prognósticos e preditivos nas lesões prostáticas é uma área de considerável interesse porque os pacientes respondem de forma diferente ao tratamento.

Neste contexto, o presente projeto de pesquisa buscou desenvolver um método de identificação imunoquimiluminescente de marcadores prognósticos para neoplasias da próstata a fim de se buscar possíveis marcadores com valor preditivo para um melhor prognóstico para o desenvolvimento de tais lesões.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar possíveis biomarcadores prognósticos, a partir da detecção imunoquimiluminescente de biomoléculas teciduais em lesões tumorais de próstata.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1** Evidenciar o perfil sócio-epidemiológico dos pacientes com Adenocarcinoma prostático (CaP) e hiperplasia benigna (HPB);
- 4.2.2** Estabelecer correlações entre os diferentes estágios clínicos e histopatológicos (estadiamento de Gleason) dos pacientes com CaPe seus respectivos perfis de expressão das biomoléculas-alvo.
- 4.2.3** Validar as biomoléculas CD3, CD20, calprotectina e ADAM10 como potenciais marcadores prognósticos para o estudo das lesões prostáticas escolhidas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAS

Foram selecionadas amostras teciduais de 140 pacientes adultos, com diagnóstico confirmado de HPB (n = 90), CaP (n = 30) e 20 amostras de próstata sem lesões, regularmente atendidos num serviço particular de Urologia, no município de Serra Talhada, estado de Pernambuco, no período de outubro de 2021 a outubro de 2022 com a prévia autorização e anuência dos responsáveis pelo setor.

O critério de inclusão dos pacientes foi o diagnóstico confirmado de HPB ou CaP estabelecido por meio de achados clínicos e histopatológicos de acordo com os critérios da classificação de Montreal (2012).

Como critérios de exclusão foram dispensados aqueles pacientes que não se enquadraram com os objetivos da pesquisa e por conseguinte não assinaram o TCLE.

Como controles foram utilizadas amostras da contraparte normal de tecido prostático (n = 20) de pacientes que se submeteram a biópsia investigativa, mas não foi identificado nenhuma alteração ao nível histopatológico.

As amostras teciduais, obtidas através de biópsia (pinça Prof. Medina para biópsia 3 mm), foram embebidas em formalina a 10% tamponada, num volume final com aproximadamente 20 vezes o volume do material até o momento do processamento histológico.

5.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Integração do Sertão (FIS), CAAE: 51280521.4.0000.8267, sob Ofício nº 4.992.041 CEP/FIS (ANEXO I). As amostras de tecido foram obtidas após a anuência do paciente ou responsável legal através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO II).

5.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

As lâminas para montagem histológica foram quimicamente lavadas e desengorduradas com solução detergente. Após a limpeza, foi aplicada uma fina camada de resina extraída das folhas de Babosa (Aloe vera) garantindo a aderência

e evitando o desprendimento do tecido durante os procedimentos de coloração. Após a microtomia dos blocos de parafina, os cortes histológicos obtidos (5 µm) foram desparafinizados, hidratados e submetidos as técnicas de coloração hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de Masson (TM), ácido periódico de Shiff (PAS) e azul de alcian (AB). Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em etanol 95%, diafanizadas em xilol e montadas com lamínula e Entellan®.

5.4 TÉCNICA DE TISSUE MICROARRAY

Instrumentos de disposição manuais foram usados para obter núcleos de tecido dos blocos doadores. Foi utilizado uma agulha oca para extrair núcleos de tecido e depois injetá-los no bloco de parafina receptor. Os núcleos de tecido são cilíndricos e têm diâmetros de 0,6 mm a 2 mm, em nosso estudo utilizamos o de 2,0 mm. O número máximo de amostras por bloco receptor é igual a 80 quando núcleos de 2,0 mm são incorporados em um bloco de 25 mm x 45 mm. Uma planilha foi usada para registrar a colocação de cada amostra de tecido na grade de coordenadas XY do bloco receptor. Este processo permitiu a análise paralela de amostras de dezenas de pacientes. Uma vez que o bloco receptor foi preenchido, o bloco foi cortado com um micrótomo para gerar lâminas de 4 µm de espessura para análise. Os TMAs foram fabricados conforme descrito anteriormente (KONONEN *et al.*, 1998) com pequenas modificações (MIRLACHER; SIMON, 2010).

5.5 ENSAIO IMUNOQUIMIOLUMINESCENTE

A conjugação do éster de acridina (EA) com o anticorpo anticalprotectina foi realizada de acordo com o protocolo de conjugação desenvolvido por Weeks *et al.* (1983) e utilizando o kit Acridinium Ester Labeling Worksheet (Enzo® Life Sciences Catalog nº. ADI-907-001, USA). Para conjugação foram incubados 100 µL do anticorpo anti-calprotectina com 1 µL da solução de éster de acridina (EA) por 1h a 25° C, sob agitação rotativa constante. Para separação do conjugado (anticorpo-EA) dos demais constituintes (anticorpo não conjugado e EA-livre) a amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, por meio de uma coluna de Sephadex G-25 (10 x 1 cm) previamente incubada com tampão fosfato sódico (PBS), pH 7,2. Durante a eluição foram coletadas 15 alíquotas de 1 mL. O mesmo procedimento foi realizado

com o anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD20 e ADAM 10.

A quantidade de proteína das alíquotas foi determinada por avaliação da densidade óptica, através da leitura da absorbância na faixa de 280 nm, em espectrofotômetro modelo Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosences, USA), sendo consideradas as amostras com valores superiores a 50 nanômetros. Após a detecção dos picos, foi realizado um pool de proteínas com as frações conjugadas e realizada a dosagem de proteína por meio do método de Lowry (CAMPOS *et al.*, 2011).

A quimiluminescência do conjugado presente nas amostras foi mensurada pelo luminômetro tubo único módulo 9200-001 (Turner BioSystems, USA). Para desencadeamento da quimiluminescência é necessária a adição sequencial de 50 µL de uma solução 0,5% H₂O₂ e 0,1 N de ácido nítrico (solução A) a 50 µL da amostra, seguida de alcalinização rápida do meio a partir da adição de 50µL de NaOH a 0,25 N (solução B). As frações correspondentes a picos de proteínas e de quimiluminescência foram reunidas e usadas em todo este trabalho.

Para a análise dos tecidos, as lâminas histológicas (0,3 x 0,3 x 8 x 10⁻⁴ cm) foram incubadas com 100 µL do anticorpo conjugado ao EA durante 2 horas a 4^o C, posteriormente foram lavadas em PBS (20 mergulhos durante 5 minutos) e imersas em PBS por mais 5 minutos. Após a lavagem a amostra tecidual foi transferida para uma placa de elisa opaca com 100 µL de PBS. O estudo foi realizado em triplicata e os valores de URL dos tecidos marcados foram determinados através do luminômetro, seguindo o mesmo protocolo utilizado na conjugação do anticorpo ao EA descrito anteriormente. O grupo controle foi realizado de biopsias que não foram encontradas nenhuma alteração após o diagnóstico histopatológico.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações de distribuição entre variáveis foram realizadas através de métodos paramétricos Anova de fator único, Teste de Tukey e o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foi considerado indicativo de significância estatística um valor de P menor que 0,05. Para estas análises foi utilizado o software OriginPro SR4 versão 8.0 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA).

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO 1

IMMUNOCHEMILUMINESCENT DETECTION *IN SITU* OF BIOMARKERS IN PROSTATE TUMOURS.

Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado^{a,d}, Ian Porto Gurgel do Amaral^b, Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo^c, Pauliana Valéria Machado Galvão^d, Ana Paula Fernandes da Silva^a, Breno Gusmão Ferraz^d, José Wesley Silva Bezerra^d, Luiz Bezerra de Carvalho Jr^a, Mario Ribeiro de Melo-Junior^e.

a: Instituto Keizo Asami (iLIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil,

b: Centro de Biotecnologia (CBiotec), Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba (UFPB), Paraíba, Brazil.

c: Departamento de microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil,

d: Universidade de Pernambuco. Campus Serra Talhada, Pernambuco, Brazil, e: Departamento de Patologia, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

Abstract

To follow the evolution of tumors using valuable biomarkers detection is important for the treatment of a cancer patient. Therefore, in cancer studies simple and fast techniques capable to identify and classify them have been proving very useful. This study presents an immunochemiluminescence method to specifically quantify Calprotectin, ADAM-10, CD-20, and CD-3 in neoplastic prostate and normal (control) tissues. Antibodies against these proteins were conjugated with acridine ester and used to evaluate their status in benign prostatic hyperplasia (BPH; n=90), prostatic adenocarcinoma (CaP; n=30) and normal tissues (controls; n=20). These results were also compared with the Gleason classification, standard classification for prostate tumors. The chemiluminescence emitted as an expression of all these four proteins were statistically significant higher in CaP than BPH and control. Furthermore, higher values were also observed whereas Gleason score increased.

Keywords: Prostatic cancer; Tissues; Chemiluminescence; Acridine Ester

1 Introduction

Prostatic tumor lesions are the most frequent pathology in 106 countries worldwide, mainly in the Americas and Africa [1]. In Brazil, aside from non-melanoma skin tumors, prostate cancer (CaP) occupies the first position in incidence with an estimated risk of 72.35 per 100 thousand cases in the Northeast Region [2]. On the other hand, benign prostatic hyperplasia (BPH) is the most prevalent urologic disease in elderly men and its proportion increases as the patient becomes older [3]. In view of this, a need to expand and improve strategic actions to control these diseases are essential highlighting early detection and prognostic markers [4]. The currently established prognostic markers for tumor lesions range from macromolecules [5] to immunobiological inputs [6,7]. Clinical aspects such as Gleason Grade, tumor extent in biopsies or biochemicals such as prostate-specific antigen (PSA) are also used [8]. Although there are many prognostic tools for studying the pathophysiology of these lesions, there are still several molecular aspects to be clarified in relation to the progressiveness and aggressiveness of prostate tumors [9].

In our laboratories, high-sensitive and specific procedures based on chemiluminescence have been investigated to detect markers in tissues (*in situ*): breast lectins [10, 11], prostate antibody [12], breast antibody [13], skin lectins [14], prostate lectins [15], liver lectins [16] and so on [17].

Furthermore, studies have been attempted to propose new tissue markers such as calprotectin (also known as the binding proteins S100A8 and S100A9), ADAM 10, CD20 and CD3 in patients affected by prostatic tumors [18,19,20].

The higher expression of calprotectin and ADAM 10 has been correlated with malignant neoplasms in several types of cancers such as breast, liver, thyroid, colon, lung, and prostate. Prostate tumors show an increased expression of calprotectin which may be indicative of advanced stages of these tumors associated with a poor prognosis [21]. Moreover, the overexpression of ADAM 10 is correlated with proliferation, migration, and invasion, in addition to inhibiting apoptosis of prostate tumor cells [22]. CD20 and CD3 molecules are associated with inflammatory processes, which contribute to significantly alter the tumor microenvironment. It has been reported that about 86% of men who develop CaP show signs of inflammation on biopsy [23,24]. Therefore, these proteins are shown to be potential predictors of worsening of the clinical condition, since studies have shown association with prostate

tumor progression [25,26].

This study aimed to correlate by immunochemiluminescence the expressions of calprotectin, ADAM 10, CD20 and CD3 in prostate tumor samples from patients diagnosed with BHP and CaP comparing to controls (samples of uninjured prostate).

2 Materials and methods

2.1 Samples

Prostate tissue samples were collected from 140 adult patients aging 67.7 years with a confirmed diagnosis of BPH (n = 90), CaP (n = 30) and 20 samples of uninjured prostate (controls), regularly seen at a private Urology Service in the city of Serra Talhada, State of Pernambuco, Brazil, from October 2021 to May 2022, with prior authorization and consent of those responsible for the sector. These diagnoses were previously established as well as the Gleason score by JWSB. The inclusion criteria of patients were established through clinical and histopathological findings and by signing the informed consent form. As an exclusion criterion, those patients who did not accept to participate in the research. As controls, samples of normal counterpart prostate tissue (n = 20) were collected from patients undergoing investigative biopsy, but no histopathological changes were identified. It is important to stress that these patients lived in the backland region of Brazilian Pernambuco State called "Sertão". Sociodemographic data showed a predominantly brown/black population according to self-declaration of skin color: brown /blacks (78.57%) and whites (21.43%). Tissue samples obtained by biopsy (Automatic Biopsy Gun for Tru-Cut 2mm Biopsy Needles) were immediately soaked in 10% buffered formalin in a final volume about 20 times the volume of the material until histological processing. This research was previously approved by the Ethics Committee of Faculdade de Integração do Sertão (CAAE: 51280521.4.0000.8267) and tissue samples were collected after the consent of the patient or legal guardian by signing the Free and Informed Consent Form.

2.2 Tissue microarray TMA technique

A hollow needle was used to extract tissue cores from donor blocks and then inject them into the recipient paraffin block. Cylindrical tissue cores had a diameter of 0.6 mm to 2 mm (2.16 mm³). The maximum number of samples per receiver block was

equal to approximately 80 when 2.0 mm cores were incorporated into a 25 mm x 45 mm block. A spreadsheet was used to record the placement of each tissue sample on the XY coordinate grid of the receptor block. This process allowed parallel analysis of samples from dozens patients. Once the receptor block was filled, the block was cut with a microtome to generate 4 μ m thick slides for analysis. As soon as tissues were collected, they were fixed in 10% buffered formalin and then embedded in paraffin. TMAs were manufactured as previously described [27] with minor modifications [28].

2.3 Antibodies conjugation

Anti-Calprotectin (S100A8/A9, mouse monoclonal antibody; Catalog T-1024, BMA BIOMEDICALS), anti-CD3 (clone 1H4, Rabbit monoclonal (Catalog ZRB1011, Sigma- Aldrich), anti-ADAM10 (A-3 mouse monoclonal antibody (Catalog sc-48400 - Santa Cruz Biotechnology, Inc) and anti-CD20 (rabbit monoclonal antibody; Catalog SAB5701569, Sigma-Aldrich) were conjugated to Acridinium Ester (AE) (Labeling Worksheet kit; Enzo[®] Life Sciences Catalog no. ADI-907-001, USA) according to Weeks *et al.* (1983). Briefly: the antibodies (100 μ L) were incubated with 1 μ L of AE solution for 1h at 25°C, under constant rotating agitation. To separate the conjugates (AE-antibodies) from the other constituents (non-conjugated and AE-free antibodies), the samples were submitted to molecular exclusion chromatography, using a Sephadex G-25 column (10 x 1 cm) previously incubated with sodium phosphate buffer (PBS), pH 7.2. During the elution, 15 aliquots of 1 mL were collected. The amount of protein in the aliquots was determined by evaluating the absorbance at 280 nm, in an Ultrospec 2100 pro model spectrophotometer (Amersham Biosences, USA). The chemiluminescence (expressed in Relative Light Units; RLU) of the conjugates were measured by a single tube luminometer module 9200- 001 (Turner BioSystems, USA). To trigger chemiluminescence 50 μ L of a 0.5% H₂O₂ was sequentially added to 0.1 N nitric acid solution (solution A) to 50 μ L of sample, followed by rapid alkalization by addition of 50 μ L of 0.25 N NaOH (solution B).

2.4 Immunohistochemiluminescence using Antibodies conjugated to AE

For the analysis of tissue chemiluminescence the histological slides (0.3x0.3x8x10⁻⁴ cm) were separately incubated with 100 μ L of each EA-conjugated

antibody for 2 h at 4°C, then washed in PBS (20 dips for 5 minutes) and immersed in PBS for an additional 5 min. After washing, the tissue samples were transferred to a polypropylene tube (1.5 mL) with 100 µL of PBS. The study was performed in triplicate and the RLU values of the labeled tissues were determined using the luminometer, following the same protocol used in 2.3. The average area of 3 cm².

2.5 Statistical analysis

RLU data were analyzed for normal distribution and homoscedasticity using Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. Differences of average values among the groups were analyzed using Kruskal-Wallis followed by Conover test for *post-hoc* analysis. All statistical tests were performed in R software version 4.2.1 and were considered significant when p-value was below 0.05. Table 1 presents the analysis of the relationship between the CaP tissues chemiluminescence and Gleason score. Five groups were organized in terms of score and patterns of Gleason.

Table 1 ISUP Prostate Cancer Grade Groups

GRADE GROUP	GLEASON SCORE	GLEASON PATTERN
1	6	3 + 3
2	7	3 + 4
3	7	4 + 3
4	8	4 + 4, 3 + 5, 5 + 3
5	9 or 10	4 + 5, 5 + 4, 5 + 5

3 Results

The AE-conjugated antibodies were eluted from the Sephadex G-25 at the 4-5th fraction (peaks where protein and chemiluminescence were concurrent). These eluates were collected and used throughout this work.

The protein expression levels were measured by immunohistochemiluminescence from the anti-Calprotectin and anti-CD3 conjugated to AE is shown in Figure 1; whereas those for anti-ADAM10 and anti-CD20 is in Figure2.

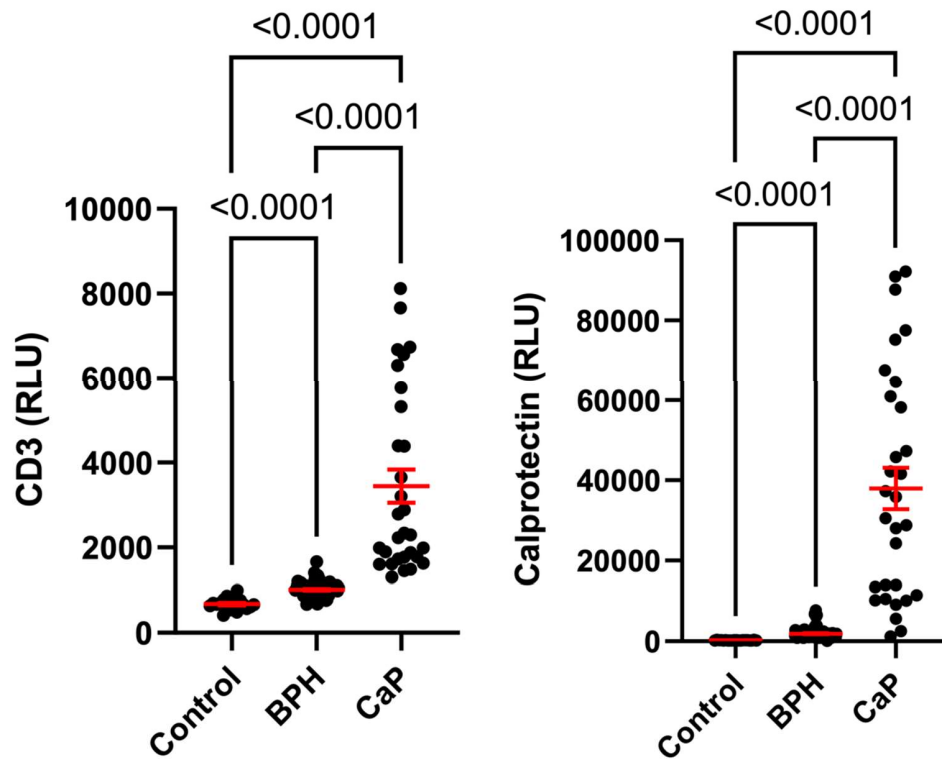


Figure 1: Immunochemiluminescent detection of CD-3 and calprotectin in prostate tissues of patients with BPH, CaP and controls. *The bracket indicates the value of p (statistical significance) between the analyzed groups, while the whiskers show the mean $\pm$ standard error of the group.

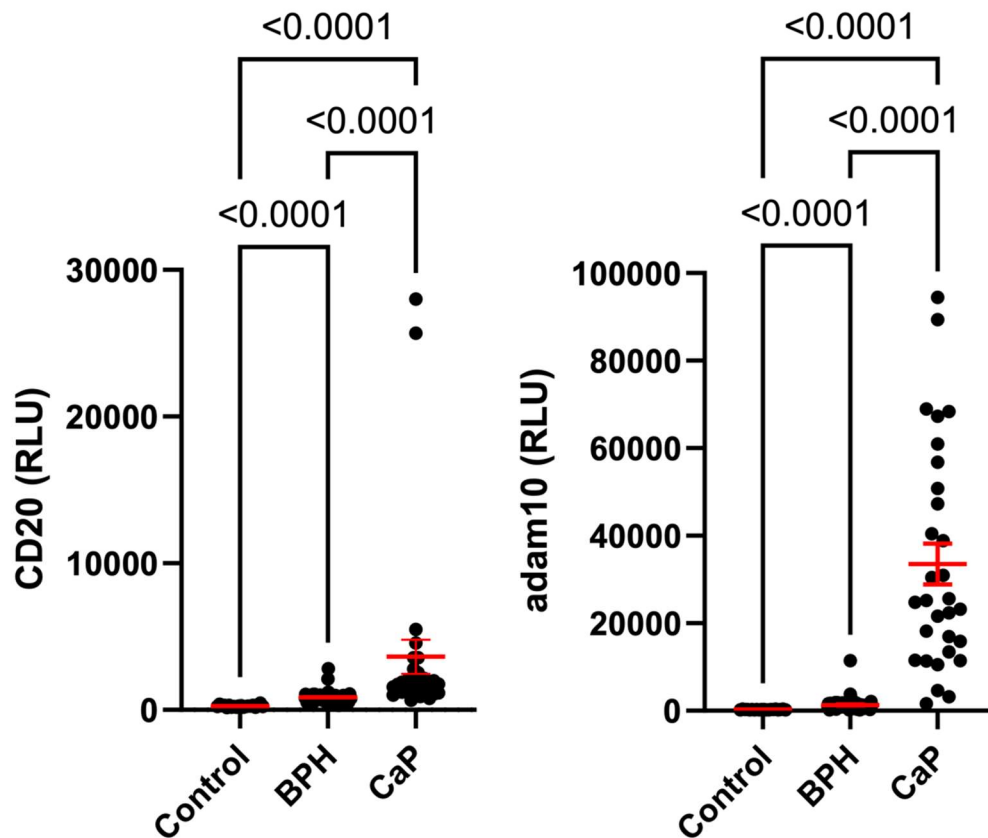


Figure 2: Immunochemiluminescent detection of CD-20 and ADAM-10 in prostate tissues of patients with BPH, CaP and controls. *The bracket indicates the value of p (statistical significance) between the analyzed groups, while the whiskers show the mean $\pm$ standard error of the group.

These results in terms of mean $\pm$ standard error for CaP, BPH and control, respectively, are as follows: CD3 = 3,448 $\pm$ 393, 1,015 $\pm$ 16 and 675 $\pm$ 28; Calprotectin = 37,962 $\pm$ 5,203, 1,899 $\pm$ 149 and 268 $\pm$ 12; CD-20 = 3,627 $\pm$ 1,170, 857 $\pm$ 31 and 264 $\pm$ 16 and Adam-10 = 33,566 $\pm$ 4,657, 1,304 $\pm$ 127 and 279 $\pm$ 13.

Figure 3 compares the CaP tissues immunochemiluminescence and Gleason grade.

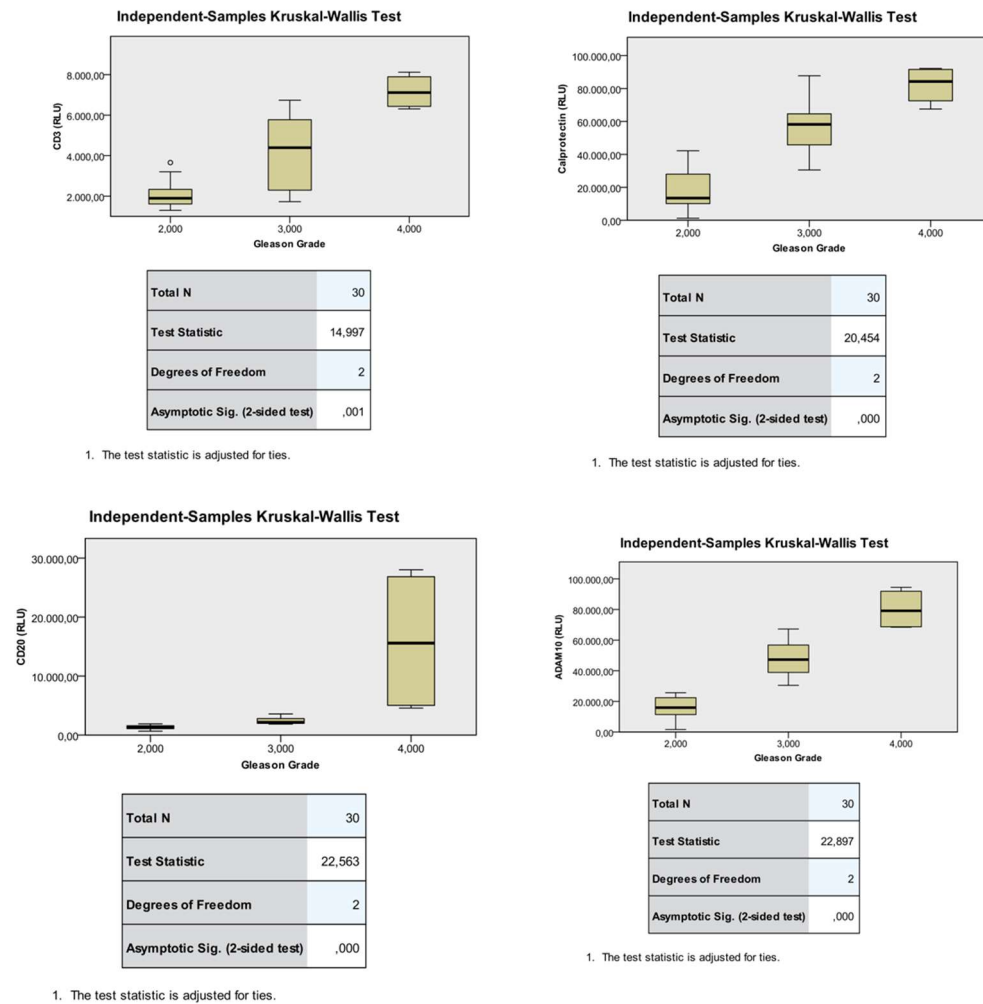


Figure 3: Immunochemiluminescence results, expressed as RLU, of CD3, Calprotectin, CD20 and Adam10 in sample prostate tumors in comparison with Gleason grade

4 Discussion

Chemiluminescent assays have been widely used as a quantitative approach in recent years [11]. The method has great advantages, such as, high sensitivity and stability of the reagents, low biological risk comparing to those based on radioisotopes and easy- to-perform protocols [13-30]. Among this analysis it is important, it is proposed an immunochemiluminescent method to quantify the status of proteins (CD3, Calprotectin, CD-20 and ADAM10) in prostate tissues diagnosed with BPH, CaP and normal as control.

For this purpose, it was used prostate samples from 90 patients with BHP, 30 with CaP and 20 controls, totalizing 140 specimens.

The present work was based on other chemiluminescent analysis carried out in tissues (solid chemiluminescence) previously reported. Among them it is worthwhile to draw attention to those evaluating the glycophenotype [15] and Galectin-3 [12] in prostatic neoplasm. AE was covalently linked to the antibodies [29] and the rapid conversion of acridine derivatives to their pseudobases after alkalization by NaOH addition yielded measurable light.

The chemiluminescent detection of CD3 was higher in tissues with CaP when compared to those with BPH and controls (Figure 1A), corroborating other studies that also showed a significant increase in CD3 expression in malignant neoplastic tissues when compared with tissues with benign neoplasia as well as in normal tissue [31]. Else, this increased expression would be associated with a higher Gleason score. Patients with metastatic cancers had higher levels of CD3 lymphocytes on their prostate specimens obtained either from prostatectomies, needle biopsies, or transurethral resection compared to those who did not metastasize [31]. Higher levels of CD3-3 labeled T cells in tumor epithelial areas are also associated with higher risk of recurrence [32]. It seems plausible that there is a general association of higher levels of T lymphocytes with adverse outcomes in prostate cancer. In addition, significant increase in CD3 cell infiltration in BPH has been reported comparing to normal prostate [33].

This study also demonstrated that the expression of Calprotectin was significantly more intense in tissues with adenocarcinoma, when comparing the expression obtained in tissues with hyperplasia and in normal tissues. Calprotectin is released by activated granulocytes and acts similarly to cytokines, binding to cell surface receptors that trigger signaling pathways involved in inflammatory processes. This protein also plays critical roles in numerous cellular processes, including cell cycle progression, survival, proliferation, differentiation, and migration [34]. Under normal conditions, human serum Calprotectin concentration is very small, increasing in inflammatory diseases and many types of cancer, including prostate cancer. Therefore, the detection of this protein in prostate tissues can be considered a significant marker for diagnostic purposes. More recently, upregulation of Calprotectin expression has been reported in human cancers, such as lung, gastric colon, prostate,

breast, and skin cancer, with high expression in cancer cells [35]. Furthermore, its subunits, S100A8 and S100A9, have been clearly recognized as new prognostic candidates that play important roles in regulating tumor cell growth, invasion, and metastasis [36]. Our results corroborated these findings as we observed a higher expression of Calprotectin. Tissues diagnosed with prostatic adenocarcinoma showed about 15 -fold and 100-fold times higher than BPH and normal tissues, respectively). It was also noticed that the labelling in patients with a higher Gleason score was significantly more intense (data not shown). Chronic inflammation within the prostate is linked to dedifferentiation of the prostate epithelium and pro- tumorigenesis with multiple dysregulated pathways that alter the tumor microenvironment and provide a highly proliferative environment for CaP [33,37].

The higher expression of CD-20 (Figure 2A), protein produced by B cells, was also found significantly higher in malignant tumor tissues than in BPH and normal tissues, corroborating previous report [32]. Different patterns of immune cells infiltration in the tumor microenvironment are associated with the aggressiveness of the disease under several types of neoplasm [38,39]. The immune cells composition of the tumor microenvironment of the CaP stroma has been shown a greater abundance of inflammatory cells compared to benign stroma, namely, an increase in regulatory B, T cells and M1 and M2 macrophages [31]. It is important to notice that among patients presenting persistent inflammation, the prostatic stroma shows an influx of multiple immune cells, such as CD3+ T cells, CD20+ B cells, macrophages, natural killer cells (NK), mast cells and macrophages [40, 41].

Regarding ADAM-10, our study also showed a significantly higher expression in tissues with adenocarcinoma when compared with those with prostatic hyperplasia and in normal tissue (approximately 100-fold when we compared the control tissue). It was also found an increase of about 6-fold times when comparing the expression in benign neoplasm group and the control group. Other studies have shown that ADAM-10 expression levels were higher in cancers than in morphologically normal tissues or corresponding benign tumors, and in many primary tumors. This high expression has been associated with aggressive disease features and a worse prognosis [42,43]. ADAM-10 plays a significant role in the proliferation of the prostate epithelium, and that by blocking the activity of ADAM-10 or reducing its expression, there is a decrease in signaling and cell division [44]. Based on these data one can assume that ADAM-10 plays a role in prostate epithelial cell signaling. Furthermore, ADAM-10 has a

significant influence on cell adhesion, cell migration, protein lysis, intracellular signal transduction and generation, in addition to favoring in tumorigenesis [45,46]. The overexpression of ADAM-10 promoted proliferation, migration and invasion and inhibited apoptosis in cultured adenocarcinoma cells, whereas elimination of ADAM-10 or administration of ADAM-10 inhibitor led to the opposite effect [46].

CaP under microscopical analysis presents variable differentiations that can be classified according to Gleason score [47]. This parameter is widely employed to correlate the pathological stage and prognosis. The most frequent or predominant histological grade in the analysis appears first. The second most frequent histological type is mentioned in second place. Score 7 (3+4 or 4+3) is intermediate, which corresponds to “moderately undifferentiated” tumors. Scores from 8 to 10 translate to more aggressive tumors, with a greater degree of undifferentiation, correlating to tumors with greater potential to cause metastasis.

The results presented in the present work provide satisfactory data and contribute to the quantification of proteins present in prostatic tumors, showing immunochemiluminescence to be an important tool in the analysis of prognostic and predictive biomarkers in prostatic neoplastic tissues.

Acknowledgments

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES), for financial support.

References

- [1] American Cancer Society. Terceira Edição. Cancer Atlas. 2019. Disponível em https://canceratlas.cancer.org/wpcontent/uploads/2019/10/ACS_CA3_Book.pdf
- [2] Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Câncer de próstata. [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2022. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/>
- [3] D.D.N.R. de Carvalho, M.R.A. Dergan, P.A.V Lima, T.F. da Silva, L. de Jesus Pereira, N.K.C. Tavares, F. de Souza Orlandi, Estratégias de cuidado para idosos com hiperplasia prostática benigna: uma revisão integrativa da literatura, Research, Society

and Development 11 (2022), e17511118310.

- [4] S. Brönimann, B. Pradere, P. Karakiewicz, M. Abufaraj, A. Briganti, S.F. Shariat, An overview of current and emerging diagnostic, staging and prognostic markers for prostate cancer, *Expert Rev Mol Diagn* 20 (2020), 841-850.
- [5] A.D.A. Chistiakov, V.A. Myasoedova, A.V. Grechko, A.A. Melnichenko, A.N. Orekhov, New biomarkers for diagnosis and prognosis of localized prostate cancer, *Seminars in Cancer Biology* 52 (2018), 9-16.
- [6] M.J. Duffy, "Biomarkers for prostate cancer: prostate-specific antigen and beyond", *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 58 (2020), 326-339.
- [7] P. Porzycki, E. Ciszkowicz, Modern biomarkers in prostate cancer diagnosis, *Cent European J Urol.* 73 (2020), 300-306.
- [8] H.M. Koh, H.J. Lee, D.C. Kim, High expression of S100A8 and S100A9 is associated with poor disease-free survival in patients with cancer: a systematic review and meta- analysis, *Translational Cancer Research* 10. (2021), 3225-3235.
- [9] E. S.R. Eggener, R.B. Rumble, A.J. Armstrong, T.M. Morgan, T. Crispino, P. Cornford, T. van der Kwast, D.J. Grignon, A.J. Rai, N. Agarwal, E.A. Klein, R.B. Den, H. Beltran, Molecular Biomarkers in Localized Prostate Cancer: ASCO Guideline, *Journal of Clinical Oncology* 38 (2020), 1474-1494.
- [10] L.M. Campos, C.L.B. Cavalcanti, J.L. Lima-Filho, L.B. Carvalho Jr, E.I.C. Beltrao, Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker, *Biomarkers* 11 (2006), 480-484.
- [11] V.P. Brustein, C.L. Cavalcanti, M.R. de Melo-Junior, M.T. Correia, E.I. Beltrão, L.B. Carvalho-Jr, Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases, *Appl Biochem Biotechnol* 166 (2012), 268-275.
- [12] J.L. Araújo-Filho, M.R. Melo-Junior, E.I. Beltrão, L.R. de Lima, C.B. Antunes, L.B. de Carvalho Jr, Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate, *Int J Clin Exp Pathol.* 6 (2013), 1861-1867.
- [13] M.J. de Melo Rêgo, M.F. Cordeiro, C.D.E.L. Cavalcanti, L.B. de Carvalho JunioR, E.I. Beltrão, Immunohistochemiluminescence detection: a quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation, *Dis Markers.* 34 (2013), 373-7.
- [14] L.R. Lima, M.F. Bezerra, S.M. Almeida, L.P. Silva, E.I. Beltrão, L.B. Carvalho Júnior, Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with

acridinium ester, *Dis Markers* 35 (2013), 149-154.

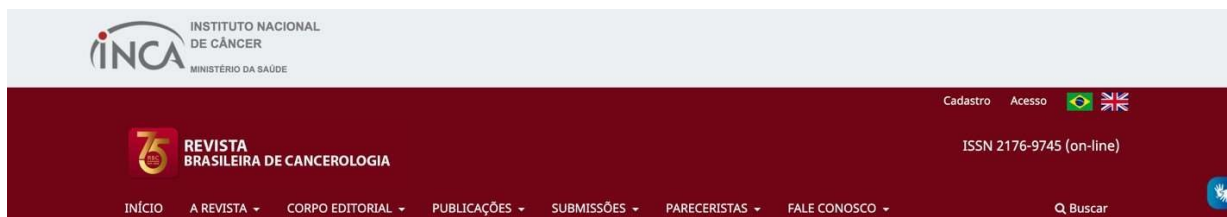
- [15] L.P.B.G. Silva, S.M.V. Almeida, L.R.A. Lima, C.L.B. Cavalcanti, M.M.M. Melo Lira, M.P.C. Silva, E.I.C. Beltrão, L.B. Carvalho Jr, Evaluation of glycophenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay, *Int J Clin Exp Pathol.* 15 (2014), 3800-3808.
- [16] G.A.F. Nascimento, L.R.A. de Lima, A.S. A. Pereira, C.L.B. Cavalcanti, M.R. de Melo Junior MR, M.E.C. Chaves, L.B. de Carvalho Junior, Chemiluminescent detection of glycode alterations in hepatic granulomatous lesions of experimental schistosomiasis, *Int J Clin Exp Pathol.* 10 (2017), 8599-8604.
- [17] L.R.A. Lima, L.P.B.G.Silva, S.M.V. Almeida, T.B. Cahú, E.I.C.Beltrão, L.B. Carvalho Júnior, Lectin-carbohydrate complex evaluation by chemiluminescence, *Analytical Biochemistry* 548 (2018), 91-95.
- [18] A. Jukic, L. Bakiri, E.F. Wagner, H. Tilg, T.E. Adolph, Calprotectin: from biomarker to biological function, *Gut* 70 (2021), 1978-1988.
- [19] Y. Cheng, L. Lin, X. Li, A. Lu, C. Hou, Q. Wu, ADAM10 is involved in the oncogenic process and chemo-resistance of triple-negative breast cancer via regulating Notch1 signaling pathway, CD44 and PrPc, CD44 e PrPc, *Cancer Cell International* 21 (2021), 1-15.
- [20] S.T. Ryan, J. Zhang, D.N. Burner, M. Liss, E. Pittman, M. Muldong, C.A. Jamieson, Neoadjuvant rituximab modulates the tumor immune environment in patients with high risk prostate cancer, *Journal of translational medicine* 18 (2020), 1-11.
- [21] A. M. Åberg, S. H. Bergström, E. Thysell, L. A. Tjon-Kon-Fat, J. A. Nilsson, A. Widmark, M. Lundholm, High monocyte count and expression of S100A9 and S100A12 in peripheral blood mononuclear cells are associated with poor outcome in patients with metastatic prostate cancer, *Cancers* 13 (2021), 2424 - 2438.
- [22] C. Cai, M. Zhang, L. Liu, H. Zhang, Y. Guo, T. Lan, Y. Xu, P. Ma, S. Li, ADAM10-cleaved ephrin-A5 contributes to prostate cancer metastasis, *Cell Death Disease* 13 (2022) 453-463.
- [23] G. Taverna, E. Pedretti, G. Di Caro, E.M. Borroni, F. Marchesi, F. Grizzi, Inflammation and prostate cancer: friends or foe?, *Inflammation Research* 64 (2015), 275-286.
- [24] K.S. Sfanos, S. Yegnasubramanian, W.G. Nelson, A.M. De Marzo, The

inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development, *Nature Reviews Urology* 15 (2018), 11-24.

- [25] J.R. Woo, M.A. Liss, M.T. Muldong, K. Palazzi, A. Strasner, M. Ammirante, C.A. Jamieson, Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue, *Journal of translational medicine* 12 (2014), 1-9.
- [26] P. Bindal, S.A. Jalil, L.M. Holle, J.M. Clement, Potential role of rituximab in metastatic castrate-resistant prostate cancer, *Journal of Oncology Pharmacy Practice* 25 (2019), 1509-1511.
- [27] J. Kononen, L. Bubendorf, A. Kallionimeni, M. Bärklund, P. Schraml, S. Leighton, O. P. Kallionimeni, Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens, *Nature medicine*, 4 (1998), 844-847.
- [28] M. Mirlacher, R. Simon, Recipient block TMA technique, In *Tissue Microarrays* (2010), 37-44.
- [29] I. Weeks, I. Beheshti, F. McCapra, A.K. Campbell, J.S. Woodhead, Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassay, *Clinical chemistry* 29 (1983), 1474-1479.
- [30] L.J. Kricka, Clinical applications of chemiluminescence, *Analytica Chimica Acta* 500 (2003), 279-286.
- [31] E. Richardsen, R.D. Uglehus, J. Due, C. Busch, L.T. Busund, The prognostic impact of M-CSF, CSF-1 receptor, CD68 and CD3 in prostatic carcinoma, *Histopathology* 53 (2008), 30-38.
- [32] N. Ness, S. Andersen, A. Valkov, Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer, *Prostate* 74 (2014), 1452-1461.
- [33] A. Sciarra, A. Gentilucci, I. Silvestri, Androgen receptor variant 7 (AR-V7) in sequencing therapeutic agents for castration resistant prostate cancer: a critical review, *Medicine* 98 (2019) e15608-1516.
- [34] F. Shabani, A. Farasat, M. Mahdavi, N. Gheibi, Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer, *Inflammation Research* 67 (2018), 801-812.
- [35] H.M. Koh, H.J. Lee, D.C. Kim, High expression of S100A8 and S100A9 is associated with poor disease-free survival in patients with cancer: a systematic review and meta- analysis, *Translational Cancer Research*, 10 (2021), 3225-3235.

- [36] G. Srikrishna, S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy, *J Innate Immun* 4 (2012), 31-40.
- [37] C. De Nunzio, G. Kramer, M. Marberger, The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation, *Eur Urol.* 60 (2011), 106-117.
- [38] M.L. Wikberg, A. Ling, X. Li, Neutrophil infiltration is a favorable prognostic factor in early stages of colon cancer, *Hum Pathol* 68 (2017), 193-202.
- [39] T. Horn, J. Laus, A.K. Seitz, The prognostic effect of tumour- infiltrating lymphocytic subpopulations in bladder cancer, *World J Urol* 34 (2016), 181-187.
- [40] H.F. Bahmad, M. Jalloul, J. Azar, M.M. Moubarak, T.A. Samad, D. Mukherji, W. Abou-Kheir, Tumor microenvironment in prostate cancer: toward identification of novel molecular biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapy development, *Frontiers in Genetics* 12 (2021), 652747.
- [41] S.L. Shiao, G.C. Chu, L.W. Chung, Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment, *Cancer Lett.* 380 (2016), 340-348.
- [42] N. Rocks, G. Paulissen, M. El Hour Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer, *Biochimie* 90 (2008), 369-379.
- [43] A. Kobayashi, K. Watabe, Critical role of ADAM15 in tumor progression: targeting multiple factors for metastasis promotion, *Future Oncol* 4 (2008), 351-354.
- [44] T. Maretzky, F. Scholz, B. Koten, E. Proksch, P. Saftig, K. Reiss, *The Journal of Investigative Dermatology* 128 (2008), 1737-1746.
- [45] P.J. Dempsey, Role of ADAM10 in intestinal crypt homeostasis and tumorigenesis, *Biochimica et Biophysica Acta Mol Cell Res*, 1864 (2017), 2228-2239.
- [46] C. Cai, M. Zhang, L. Liu, H. Zhang, Y. Guo, T. Lan, Y. Xu, P. Ma, S. Li, ADAM10-cleaved ephrin-A5 contributes to prostate cancer metastasis, *Cell Death Dis.*, 12 (2022) 453-464.
- [47] G.J.L.H. van Leenders, T.H. van der Kwast, D.J. Grignon, A.J. Evans, G. Kristiansen, C.F. Kweldam, G. Litjens, J.K. McKenney, J. Melamed, N. Mottet, G.P. Paner, H. Samaratunga, I.G. Schoots IG, J.P Simko, T. Tsuzuki, M. Varma, A.Y. Warren, T.M. Wheeler, S.R. Williamson, K.A. Iczkowski, ISUP Grading Workshop Panel Members. The 2019 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Grading of Prostatic Carcinoma, *Am J Surg Pathol.* (8) 2020, e87-e99.

6.2 ARTIGO 2 (SUBMETIDO A REVISTA BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA)



Análise Do Perfil Epidemiológico E Fatores De Risco Associados à Lesões Tumorais Prostáticas Em Pacientes Do Sertão De Pernambuco, Brasil

Analysis Of The Epidemiological Profile And Risk Factors Associated With Prostatic Tumor Lesions In Patients In The Semiarid Of Pernambuco, Brazil

Análisis Del Perfil Epidemiológico Y Factores De Riesgo Asociados A Las Lesiones Tumorales Prostáticas En Pacientes Del Semi Arido De Pernambuco, Brasil

Epidemiologia E Fatores De Risco Em Lesões De Próstata

Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado^{1,2} (marcos.machado@upe.br; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0002-4631-0309>);

Priscila Maria de Barros Rodrigues² (priscila.barros@upe.br; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0002-6151-6188>);

Pauliana Valéria Machado Galvão² (pauliana.galvao@upe.br; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0002-4418-218X>);

José Wesley Bezerra^{2,3} (wesley.bezerra@upe.br; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0002-7747-8462>);

Mario Ribeiro de Melo Júnior⁴ (mariormj@gmail.com; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0003-2373-2970>)

Luiz Bezerra de Carvalho Júnior⁵ (lbcjbr@gmail.com; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0002-9517-8359>).

¹Doutorando em Biologia Aplicada à Saúde, pelo Instituto Keizo Asami (iLIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil

²Professor da Universidade de Pernambuco (UPE)- Campus Serra Talhada, Serra Talhada-PE, Brasil.

³Doutorando em Ciências Biomédicas, Instituto Universitário Italiano de Rosário (IUNIR), Rosário, Argentina.

⁴Professor da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Patologia, Recife- PE, Brasil.

⁵Professor do Instituto Keizo Asami (iLIKA), Recife-PE, Brasil

Endereço para correspondência: Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado. Rua Joaquim Alves de Magalhães, 223 – AABB. Serra Talhada (PE), Brasil. CEP 56912-150.

RESUMO

Introdução: Alterações tumorais na próstata são caracterizadas por apresentarem progressão lenta ao longo de anos, sendo seus principais fatores de risco: Idade, cor da pele, histórico familiar e alimentação. **Objetivo:** Analisar o perfil sócio-epidemiológico de pacientes com Adenocarcinoma prostático (CaP) e Hiperplasia prostática benigna (HPB), atendidos no município de Serra Talhada, no sertão de Pernambuco (Brasil) entre 2021-2022. **Metodologia:** Estudo descritivo transversal, realizado a partir dos dados clínicos obtidos de 120 homens de um serviço privado de Urologia do Município de Serra Talhada (PE). **Resultados:** Dos 120 pacientes, 90 foram diagnosticados com HPB e 30 com CaP. A média de idade foi de 67,4 anos ($\pm 7,2$ anos). Com relação a autodeclaração de cor, observou-se que, mais de 70% dos que apresentaram alguma das neoplasias prostáticas se autodeclararam como pardos ou negros. Quanto aos hábitos etilistas, 46,66% dos pacientes com CaP e 52,22% daqueles diagnosticados com HPB relataram hábitos etílicos. No que se refere ao tabagismo 56,66% do grupo CaP e 47,77% do grupo HPB relataram uso de cigarro. A maioria dos pacientes com CaP (63,33%) apresentaram histórico familiar de doença neoplásica. No grupo de pacientes com CaP, no estadiamento patológico escore de Gleason foi observado uma ocorrência significativa (86,2%) do escore 7 que mostra tumores ainda in situ, sendo 56,66% com 7(3+4) e 30% com 7(4+3). **Conclusão:** Os resultados obtidos podem contribuir para o avanço da medicina personalizada, na consideração dos fatores de risco, diagnóstico precoce e prognóstico de neoplasias prostáticas.

Palavras-chaves: Neoplasias da Próstata, Hiperplasia Prostática, Fatores de Risco, Perfil epidemiológico

ABSTRACT

Introduction: Tumor changes in the prostate are characterized by slow progression over years, and their main risk factors are: Age, skin color, family history and diet. **Objective:** This article aims to analyze the socio-epidemiological profile of patients with prostatic adenocarcinoma (CaP) and benign prostatic hyperplasia (BPH), treated in the municipality of Serra Talhada, in the hinterland of Pernambuco (Brazil) between 2021-2022. **Methodology:** A descriptive cross-sectional study, based on clinical data obtained from 120 men from a private Urology service in the municipality of Serra Talhada (PE). **Results:** Of the 120 patients, 90 were diagnosed with BPH and 30 with PCa. The mean age was 67.4 years (± 7.2 years). With regard to self-declaration of color, it was observed that more than 70% of patients who presented any of the prostatic neoplasms were individuals self-declared as brown or black. Regarding drinking

habits, 46.66% of patients with PCa and 52.22% of those diagnosed with BPH reported frequent consumption of alcoholic beverages. With regard to smoking, 56.66% of the CaP group and 47.77% of the HPB group reported using cigarettes. Most patients with PCa (63.33%) had a family history of neoplastic disease. In the group of patients with prostatic carcinoma, in the pathological staging Gleason score, a significant occurrence (86.2%) of the score 7 was observed, with 56.66% with 7(3+4) and 30% with 7(4+3). **Conclusion:** The results obtained may contribute to the advancement of personalized medicine, in the consideration of risk factors, early diagnosis and prognosis of prostatic neoplasms.

Key words: Prostatic Neoplasms, Prostatic Hyperplasia, Risk Factors, Health Profile

RESUMEN

Introducción: Las alteraciones tumorales en la próstata se caracterizan por una lenta progresión a lo largo de los años, y sus principales factores de riesgo son: la edad, el color de la piel, los antecedentes familiares y la dieta. **Objetivo:** Analizar el perfil socioepidemiológico de pacientes con Adenocarcinoma de Próstata (CaP) e Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), atendidos en el municipio de Serra Talhada, en el interior de Pernambuco (Brasil) entre 2021-2022. **Metodología:** Estudio transversal descriptivo, basado en datos clínicos obtenidos de 120 hombres de un servicio privado de Urología del municipio de Serra Talhada (PE). **Resultados:** De los 120 pacientes, 90 fueron diagnosticados de HBP y 30 de CaP. La edad media fue de 67,4 años ($\pm 7,2$ años). En cuanto a la autodeclaración de color, se observó que más del 70% de los que tenían alguna de las neoplasias prostáticas se declararon morenos o negros. En cuanto a los hábitos de bebida, el 46,66% de los pacientes con CaP y el 52,22% de los diagnosticados con HBP informaron hábitos de bebida. Con respecto al tabaquismo, el 56,66% del grupo CaP y el 47,77% del grupo HPB reportaron consumo de cigarrillo. La mayoría de los pacientes con CaP (63,33%) tenían antecedentes familiares de enfermedad neoplásica. En el grupo de pacientes con CaP, en el puntaje de Gleason de estadificación patológica se observó una ocurrencia significativa (86,2%) del puntaje 7, que muestra tumores aún in situ, 56,66% con 7(3+4) y 30% con 7(4+3). **Conclusión:** Los resultados obtenidos pueden contribuir al avance de la medicina personalizada, considerando los factores de riesgo, el diagnóstico precoz y el pronóstico del cáncer de próstata.

Palabras Clave: Neoplasias de la Próstata, Hyperplasie de la prostate, Factores de Riesgo, Perfil epidemiológico

INTRODUÇÃO

A população idosa no Brasil vem em um crescimento exponencial e segundo informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) deve alcançar o patamar superior a 66 milhões até o ano de 2050¹. Isto mostra o aumento na probabilidade de inúmeras manifestações patológicas prostáticas, incluindo alterações neoplásicas e não neoplásicas, uma vez que um dos fatores de risco para o surgimento dessas alterações é a idade².

As alterações tumorais na próstata são caracterizadas por apresentarem uma progressão lenta ao longo de anos. A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é um tipo de alteração tumoral não maligna com prevalência estimada em 8% na faixa etária de 31 a 40 anos, 40 a 50% entre 51 a 60 anos e 80% em homens com mais de 80 anos. Espelhando as mudanças na HBP, a prevalência e gravidade dos sintomas do trato urinário inferior em homens tem a idade como um dos fatores determinantes³.

Já o câncer de próstata (CaP) é uma doença muito associada ao envelhecimento, visto que pessoas acima de 50 anos são mais propensas a desenvolverem⁴. A idade é de fato o maior fator de risco para desenvolvimento desta doença, mas não se pode descartar fatores como: etnia, onde os indivíduos da raça negra são mais afetados, fatores genéticos e possivelmente fatores dietéticos (dieta pobre em vegetais, ingestão de gordura animal, hábitos tabagistas e etilistas)⁵⁻⁸. O CaP é o segundo mais comum em homens no mundo, com mais de 1,2 milhão de casos e 358.000 mortes anuais, segundo dados da Organização Mundial da Saúde⁹.

No Brasil, 71.730 novos casos desse tipo de câncer por cem mil habitantes foram estimados para o biênio 2023-2025, com aproximadamente 15.841 mortes. Já a prevalência de HPB é de 10% aos 30 anos e se aproxima de 90% em indivíduos com mais de 80 anos de idade. Cerca de 5% a 20% dos homens são submetidos a intervenções cirúrgicas para o alívio das manifestações clínicas da doença¹⁰.

Diante do exposto, este artigo tem como objetivo analisar o perfil sócio-epidemiológico e fatores de risco de pacientes com CaP ou HPB, atendidos no município de Serra Talhada, localizado no sertão de Pernambuco (Brasil) entre 2021- 2022.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo transversal, que foi realizado a partir dos dados obtidos de 120 pacientes do sexo masculino em serviços privados de urologia do Município de Serra Talhada (PE). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Institucional da

Faculdade de Integração do Sertão (FIS), sob o número do parecer 4.992.041, conforme resolução de nº 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Foram analisados os dados clínicos de pacientes que apresentaram tumorações na próstata com relação a idade, autodeclaração de cor, histórico familiar, hábitos tabagistas e hábitos etilistas. E nos casos de carcinoma foram avaliados os estadiamento patológico (Score de Gleason).

As frequências absolutas e relativas foram calculadas para as variáveis categóricas, enquanto as medidas de tendência central e variabilidade foram calculadas para as variáveis numéricas. A associação entre as variáveis sociodemográficas e os desfechos investigados (HPB e CaP) foram avaliadas empregando o teste qui-quadrado de Pearson e, quando este não foi possível, o teste exato de Fisher. O nível de significância estatística considerado foi de 0,05. As análises estatísticas foram realizadas empregando o programa R, versão 4.2.2.

RESULTADOS

A população do estudo foi constituída por 120 pacientes, dos quais 90 foram diagnosticados com HPB e 30 foram diagnosticados com CaP. A média de idade dos pacientes foi de 67,4 anos ($\pm 7,2$ anos). A faixa etária de 60-69 anos é a que apresentou mais casos, seja de CaP (53,3%) ou de HPB (57,0%), conforme a Tabela 1. Observou-se ainda que 81,7% dos 120 pacientes diagnosticados com alguma lesão prostática se encontravam entre 60 e 79 anos.

No que se refere a questão de autodeclaração de cor, foi demonstrado que 81,7% dos pacientes que apresentaram alguma das neoplasias prostáticas eram indivíduos autodeclarados como pardos ou pretos. Os indivíduos autodeclarados como brancos apresentaram 13,3% e 20,0% de prevalência para Cap e HPB, respectivamente (Tabela 1).

Quanto aos hábitos de consumo de álcool extraídos dos prontuários, embora tenha sido observado uma maior incidência de etilistas entre os pacientes com HPB (52,0%), não foram encontradas diferenças significantes entre a frequência de indivíduos etilistas e não-etilistas quando comparados entre os pacientes com HPB e CaP de acordo com a Tabela 1.

Em relação aos hábitos tabagistas, observou-se que houve uma maior ocorrência de CaP (56,7%) em indivíduos fumantes, contudo, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes fumantes com HPB e CaP.

Tabela 1: Perfil epidemiológico dos fatores de risco para tumorações prostáticas de pacientes atendidos em um serviço de Urologia do município de Serra Talhada-PE no período de 2020 a 2021.

Variáveis analisadas		Adenocarcinoma n = 30	HPB n = 90	P
Idade	Menor que 60 anos	0 (0,0%)	12 (13,3%)	0,078*
	60 – 69 anos	16 (53,3%)	51 (56,7%)	
	70 – 79 anos	12 (40,0%)	22 (24,4%)	
	80 anos ou mais	2 (6,7%)	5 (5,6%)	
Cor da pele	Branco	4 (13,3%)	18 (20,0%)	0,7**
	Pardo	16 (53,3%)	47 (52,2%)	
	Negro	10 (33,3%)	25 (27,8%)	
Hábito Etílico	Sim	14 (46,7%)	48 (53,3%)	0,5**
	Não	16 (53,3%)	42 (46,7%)	
Hábito Tabagista	Sim	17 (56,7%)	47 (52,2%)	0,4**
	Não	13 (43,3%)	43 (47,8%)	

*Teste exato de Fisher; **Teste qui-quadrado de Pearson

O presente estudo avaliou 30 pacientes com diagnóstico de CaP, observando-se que a maioria (63,33%) apresentava casos de neoplasia maligna prostática no histórico familiar até os ascendentes de 2º grau como demonstrado na Figura 1.

A Figura 2 apresenta o escore de Gleason realizado em todas as amostras diagnosticadas com CaP. Foi observado uma maior ocorrência significativa do escore 7 (86,2%) entre os tumores analisados, tendo o score 7(3+4) apresentado uma maior frequência (56,66%), o que indica um escore intermédio, que corresponde aos tumores “moderadamente indiferenciados”.

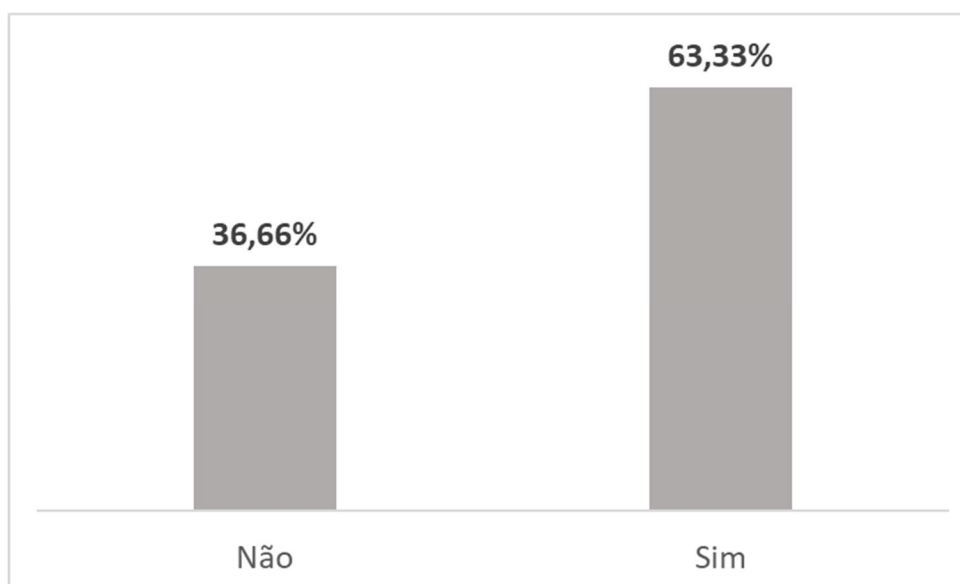


Figura 1: Relação do histórico familiar e diagnóstico de Adenocarcinoma Prostático de pacientes atendidos em um serviço de Urologia no município de Serra Talhada-PE no período de 2020 a 2021

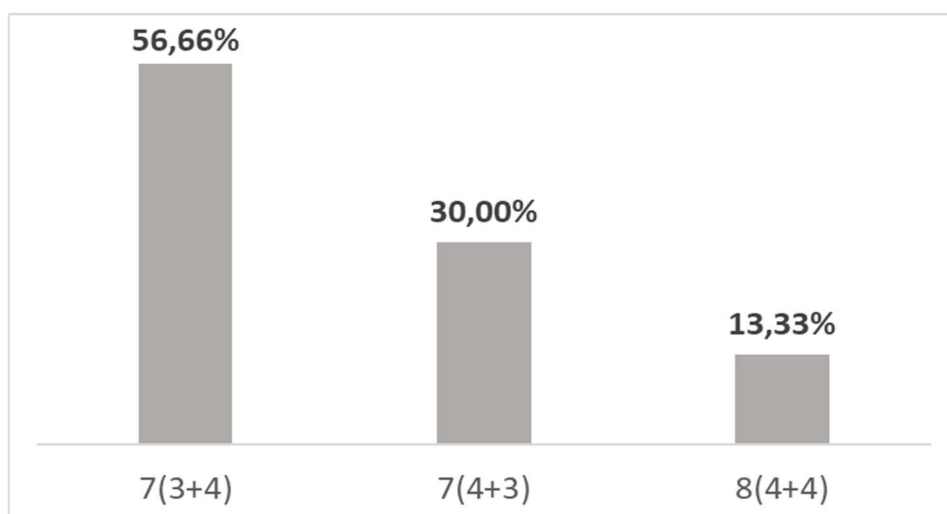


Figura 2: Relação do escore de Gleason de pacientes atendidos em um serviço de Urologia no município de Serra Talhada-PE no período de 2020 a 2021

DISCUSSÃO

Estudos da Sociedade Americana de Câncer mostram que cerca de 60% dos casos de neoplasia maligna da próstata são diagnosticados em homens com 65 anos ou mais e se mostra raro em homens com menos de 40 anos. A idade média dos homens no momento do diagnóstico é de cerca de 66 anos¹¹. Dados nacionais do Instituto nacional do câncer (INCA) também vão na mesma direção, corroborando com nossos resultados².

Assim como demonstrado em nosso estudo, o aumento do volume da próstata causada pela hiperplasia prostática benigna, ocorre bem mais na velhice. A prevalência dessa doença é superior a 70% entre os homens acima de 60 anos, enquanto a HPB raramente causa problemas antes dos 40 anos, nos idosos, os sintomas afetam a vida diária e a qualidade de vida desses indivíduos^{12,13}.

Diferentes cores de pele apresentam riscos diferentes para o desenvolvimento do CaP, isso se dá por uma combinação de fatores dietéticos e/ou genéticos. Negros têm maiores chances de desenvolver câncer de próstata, seguido pelos brancos, latinos, asiáticos e por último, os indígenas. Em comparação com os indivíduos brancos, negros têm 1,6 vezes mais chances de ter câncer de próstata e 2,4 vezes mais chances de morrer por esse tipo de câncer¹⁴⁻¹⁶. Nosso estudo corrobora com esses dados já estabelecidos na literatura.

O consumo de álcool pode aumentar o risco de câncer por meio de seu metabólito oxidado acetaldeído, que é cancerígeno para os seres humanos, mas também pode diminuir o risco de câncer por outros mecanismos, como o aumento da sensibilidade à insulina através do aumento dos níveis de adiponectina^{17,18}.

Uma meta-análise baseada em 235 estudos que incluíram mais de 117.000 casos não conseguiu identificar uma relação consistente entre a ingestão de álcool e câncer de próstata¹⁹. Já outros estudos sugeriram haver evidências acumuladas de que o consumo de álcool está associado ao câncer de próstata²⁰. Embora as meta-análises até o momento tenham se concentrado no risco geral de câncer de próstata, um estudo mostrou que o consumo excessivo de álcool estava associado ao aumento do risco de doença de alto grau, mas não teve associação com o risco de câncer de próstata de baixo grau²¹.

Em nossos resultados não foram observados uma relação direta entre o uso de álcool e o desenvolvimento do CaP, reforçando, a condição inconclusiva no que se refere a relação entre o consumo de álcool e o surgimento de tumorações prostáticas, corroborando também com um estudo anterior de ressonância magnética que demonstrou não haver associação entre exposição ao álcool e câncer de próstata^{22,23}.

O tabagismo é a principal causa de morte por câncer, mas a relação entre tabagismo e o CaP permanece controversa; alguns estudos não indicam associação, enquanto outros sugerem um risco elevado entre fumantes^{22,24}.

No que tange o efeito do consumo de tabaco na incidência de câncer de próstata ainda é motivo de debate. No entanto, a associação entre tabagismo e mortalidade por câncer de próstata parece ser robusta. Duas meta-análises que avaliaram a associação do tabagismo com os resultados do câncer de próstata confirmaram um risco maior de morte entre os fumantes atuais

do que entre os não fumantes²⁵.

Estudos previamente publicados apresentam dados onde o consumo do tabaco pode promover a progressão do CaP por meio de mecanismos biológicos ou efeitos de tratamento mais limitados em fumantes. Tanto os estudos de coorte de base populacional quanto os estudos com pacientes sugeriram que o tabagismo possa aumentar o risco de progressão e morte do CaP^{7,26}.

Este estudo mostrou que a maioria dos pacientes diagnosticados com câncer de próstata apresentavam hábitos tabagista, mas não se mostra possível associar que o surgimento desta neoplasia se deu pelo uso do cigarro.

O CaP tem uma hereditariedade muito alta em comparação com a maioria dos outros cânceres, até 57% de acordo com estudos com gêmeos²⁷. Em estudos de associação genômica ampla (GWAS), mais de duzentos loci de suscetibilidade para CaP foram encontrados, embora a maioria faça apenas uma pequena contribuição para a suscetibilidade geral^{28,29}.

Conforme preconizado no Consenso do Programa Nacional de Controle do câncer de próstata, a história familiar com CaP antes dos 60 anos de idade é um marcador de importância, podendo aumentar o risco de 3 a 10 vezes em relação à população em geral e podendo refletir tanto características herdadas quanto estilos de vida compartilhados entre os membros da família³⁰. Este trabalho demonstrou que mais de 60% dos pacientes diagnosticados com CaP apresentaram histórico familiar desta neoplasia.

Neste estudo também foi possível identificar o escore de Gleason, que se respalda principalmente na extensão da doença com o risco de metástase, além de predizer o prognóstico e facilitar na escolha da terapia. Nesse contexto foi demonstrado que a maioria dos pacientes com CaP apresentaram em seu laudo histopatológico escore de Gleason 7 (86,2%), sendo destes 7(4+3) e 7(3+4) com percentual de 31,03% e 55,17% respectivamente, o que significa dizer que a maioria dos homens foram diagnosticados com risco intermediário da doença, progredindo para um estadiamento mais avançado, como é o caso do Gleason 8 (13,79%). Estes dados corroboram com dados previamente publicados que demonstraram uma prevalência de 28%, 36%, 23%, 9% e 4%

para os escores de Gleason 6, 7, 8, 9 e 10, respectivamente, quando analisou pacientes diagnosticados com CaP, atendidos em um hospital de Pernambuco³¹.

Os tumores classificados no escore 7(4+3) apresentam características e agressividade intermediárias entre os bem diferenciados e as lesões totalmente indiferenciadas. No score 7(3+4) o tumor ainda está restrito à glândula prostática (a neoplasia ainda se encontra in situ não tendo se infiltrado para os linfonodos próximos) e pode (ou não) ser sentido pelo toque retal ou visto

através da ultrassonografia transretal¹¹.

CONCLUSÕES

Nesta pesquisa observou-se o perfil epidemiológico dos pacientes com tumorações prostáticas diagnosticados em um serviço de Urologia privado do sertão de Pernambuco, mediante os resultados observou-se uma importante relação entre os fatores de risco como idade e histórico familiar com o surgimento das lesões e que o acesso a serviços de saúde para rastreamento das lesões em indivíduos que se enquadram nos grupos de risco é de suma importância. Esses resultados podem contribuir para o avanço da medicina personalizada, na consideração dos fatores de risco, diagnóstico precoce e prognóstico de neoplasias prostáticas.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Não há.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da População 2018: número de habitantes do país deve parar de crescer em 2047 [Internet]. Agência de Notícias – IBGE. 2018 [citado 24 de novembro de 2022]. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/21837-projecao-da-populacao-2018-numero-de-habitantes-do-pais-deve-parar-de-crescer-em-2047>.
2. INCA. Estatísticas de câncer [Internet]. Instituto Nacional de Câncer - INCA. 2020 [citado 22 de outubro de 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estatisticas-de-cancer>
3. Madersbacher S, Sampson N, Culig Z. Pathophysiology of benign prostatic hyperplasia and benign prostatic enlargement: a mini-review. *Gerontology*. 2019;65(5):458–64. Doi: <https://doi.org/10.1159/000496289>
4. Lowrance WT, Breau RH, Chou R, Chapin BF, Crispino T, Dreicer R, et al. Advanced Prostate Cancer: AUA/ASTRO/SUO Guideline PART II. *J Urol*. 2021;205(1):22–9. Doi: <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000001376>

5. Demuner BB, Carrijo-Carvalho LC. Avaliação de fatores de risco e antígeno prostático específico no rastreamento de câncer de próstata. *Rev Ciênc Médicas E Biológicas*. 2021;20(2):235–9. Doi: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v20i2.44049>
6. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*. 2019;10(2):63–89.
7. Darcey E, Boyle T. Tobacco smoking and survival after a prostate cancer diagnosis: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2018;70:30–40. Doi: <https://doi.org/10.14740/wjon1191>
8. Michael J, Howard LE, Markt SC, De Hoedt A, Bailey C, Mucci LA, et al. Early-life alcohol intake and high-grade prostate cancer: results from an equal-access, racially diverse biopsy cohort. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2018;11(10):621–8. Doi: <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-18-0057>
9. PAHO, WHO. Country cancer profiles 2020 [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2020 [citado 22 de outubro de 2022]. Disponível em: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=en#gsc.tab=0
10. Carvalho AL, Pinto SA, Santos WG. Glicoproteína CRISP3: um bom biomarcador para câncer de próstata? *J Bras Patol E Med Lab*. 2021;57:1–7. Doi: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20210012>
11. American Joint Committee on Cancer. Prostate. Em: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8o ed New York: Springer; 2017. Disponível em: https://www.mskcc.org/cancer-care/types/prostate/treatment?pn_mapping=pn_11&gclid=CjwKCAiAioifBhAXEiwApzCztv1NvI4zl9K5llCcDSvh22uPLwqlw2lfkDEhlpPQ_2mjZHwlHdBG2RoCigwQAvD_BwE
12. Alawamlh OAH, Goueli R, Lee RK. Lower urinary tract symptoms, benign prostatic hyperplasia, and urinary retention. *Med Clin North Am*. 2018;102(2):301–11. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.10.005>
13. Cureklibatir I, Kizilay F. Prostate Gland and its Diseases. Ege University Public Books Series; 2015. (18).
14. Darves-Bornoz A, J. Park, Katz A. Prostate Cancer Epidemiology. Em: *Prostate Cancer: Diagnosis and Clinical Management*. Chichester: Wiley Blackwell; 2014.
15. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention [Internet]. Genebra: WHO; 2020 [citado 24 de novembro de 2022]. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer->

Reports/World-Cancer- Report-Cancer-Research-For-Cancer-Prevention-2020

16. Sartor AO. Risk factors for prostate cancer [Internet]. UpToDate. 2022 [citado 18 de março de 2022]. Disponível em: https://www.uptodate.com/contents/risk-factors-for-prostate-cancer?search=Risk%20factors%20for%20prostate%20cancer&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1
17. Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, Ghissassi FE, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens—Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol.* 2009;10(11):1033–4. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70326-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70326-2)
18. Brien SE, Ronksley PE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. *BMJ.* 2011;342:d636. Doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.d636>
19. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer.* 2001;85(11):1700–5. Doi: 10.1054/bjoc.2001.2140.
20. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer.* 2015;112(3):580–93. DOI:10.1038/bjc.2014.579
21. Zuccolo L, Lewis SJ, Donovan JL, Hamdy FC, Neal DE, Smith GD. Alcohol consumption and PSA-detected prostate cancer risk—A case-control nested in the ProtecT study. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2013;132(9):2176–85. Doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.27877>
22. Larsson SC, Carter P, Kar S, Vithayathil M, Mason AM, Michaëlsson K, et al. Smoking, alcohol consumption, and cancer: A mendelian randomisation study in UK Biobank and international genetic consortia participants. *PLoS Med.* 2020;17(7):e1003178. Doi: <https://doi.org/10.1371>
23. Brunner C, Davies NM, Martin RM, Eeles R, Easton D, Kote-Jarai Z, et al. Alcohol consumption and prostate cancer incidence and progression: A Mendelian randomisation study. *Int J Cancer.* 2017;140(1):75–85. Doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.30436>
24. De Nunzio C, Andriole GL, Thompson Jr IM, Freedland SJ. Smoking and prostate cancer: a systematic review. *Eur Urol Focus.* 2015;1(1):28–38. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.euf.2014.10.002>

25. Foerster B, Pozo C, Abufaraj M, Mari A, Kimura S, D'Andrea D, et al. Association of smoking status with recurrence, metastasis, and mortality among patients with localized prostate cancer undergoing prostatectomy or radiotherapy: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2018;4(7):953–61. Doi: doi:10.1001/jamaoncol.2018.1071
26. Gansler T, Shah R, Wang Y, Stevens VL, Yang B, Newton CC, et al. Smoking and Prostate Cancer–Specific Mortality after Diagnosis in a Large Prospective Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(6):665–72. Doi: <https://doi.org/10.1158/1055-9965>
27. Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA.* 2016;315(1):68–76. Doi: doi:10.1001/jama.2015.17703
28. Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Berndt SI, Conti DV, Schumacher F, Han Y, et al. A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat Genet.* 2014;46(10):1103–9. Doi: 10.1038/ng.3094
29. Conti DV, Darst BF, Moss LC, Saunders EJ, Sheng X, Chou A, et al. Trans-ancestry genome-wide association meta-analysis of prostate cancer identifies new susceptibility loci and informs genetic risk prediction. *Nat Genet.* janeiro de 2021;53(1):65–75. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00748-0>
30. Brasil. DATASUS – Ministério da Saúde [Internet]. 2022 [citado 24 de novembro de 2022]. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/>
31. Mota TR, Barros DPO. Perfil dos pacientes com câncer de próstata em hospital de referência no estado de Pernambuco. *Rev Bras Anal Clin.* 2019;50(4):334–8. Doi: DOI: 10.21877/2448- 3877.201900766

7 CONCLUSÕES FINAIS

- As proteínas ADAM10 e Calprotectina revelaram uma expressão superior a vinte vezes nas lesões malignas (CaP) que em lesões benignas (HPB), enquanto as proteínas CD3 e CD20 apresentaram uma expressão três vezes maior.
- A expressão destas proteínas no CaP, comparadas com o tecido normal, foi maior 141, 120, 13 e 5 vezes para calprotectina, ADAM10, CD20 e CD3 respectivamente.
- As expressões das proteínas, calprotectina, ADAM10, CD20 e CD3, apresentaram respectivamente taxas de 708%, 467%, 324% e 150% maior nos tecidos com HPB que nos tecidos de pacientes com próstata normal.
- O resultado da análise imunoquimiluminescente das proteínas estudadas mostra o potencial desses biomarcadores em avaliações de prognóstico e possível marcador de agravamento da doença, uma vez que se mostrou que quanto maior o escore de Gleason (indicador de agravamento) maior a expressão das proteínas estudadas. Sendo uma alternativa promissora no prognóstico das lesões

REFERÊNCIAS

ADAMCZYK, M. *et al.* Quantitative determination of noncovalently bound acridinium in protein conjugates by liquid chromatography/ electrospray ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 9, p. 670-674, 2001.

ALVES, E. F. **Análise histológica e quantitativa dos componentes acinares e estromais das zonas da próstata humana normal**. 2018. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

ANDERSEN, L. B. *et al.* Immune cell analyses of the tumor microenvironment in prostate cancer highlight infiltrating regulatory T cells and macrophages as adverse prognostic factors. **The Journal of pathology**, v. 255, n. 2, p. 155-165, 2021.

ARAÚJO FILHO, J. L. *et al.* Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 6, p. 1861-1867, 2013.

BARBER, L. *et al.* Family history of breast or prostate cancer and prostate cancer risk. **Clin Cancer Res**, v. 24, n. 23, p. 5917-5917, 2018.

BASHIR, M. N.; MALIK, M. A. Case-control study of diet and prostate cancer in a rural population of Faisalabad, Pakistan. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 6, p. 2375-2378, 2015.

BAY, N. S.; BAY, B. H. Greek anatomist herophilus: the father of anatomy. **Anat Cell Biol.**, v. 43, n. 4, p. 280-283, 2010.

BAZZICHETTO, C *et al.* PTEN as a prognostic/predictive biomarker in cancer: an unfulfilled promise? **Cancers**, v. 11, n. 4, p. 435, 2019

BINDER, M. J.; WARD, A. C. The role of the metzincin superfamily in prostate cancer progression: a systematic-like review. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 7, p. 3608, 2021.

BOSTWICK, D. G.; CHENG, L. **Urologic surgical pathology**. 2. ed. China: Elsevier Health Sciences, 2008.

BRATT, O. *et al.* Family history and probability of prostate cancer, differentiated by risk category: a nationwide population-based study. **J Natl Cancer Inst**, v. 108, n. 10, p. djw110, 2016.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 20180. Errata em: **CA Cancer J Clin.**, v. 70, n. 4, p. 313, 2020.

- BROWN, R. C. *et al.* Development and application of a novel acridinium ester for use as a chemiluminescent emitter in nucleic acid hybridisation assays using chemiluminescence quenching. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 386-394, 2009.
- CAMPBELL, A. K.; HALLET, M. B.; WEEKS, I. Chemiluminescence as an analytical tool in cell biology and medicine. **Methods in Biochemical Analysis**. 31: 317-416, 1985.
- CAMPOS, L. M. *et al.* Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**, v. 11, n. 5, p. 480-484, 2006.
- CHUGHTAI, B. *et al.* Benign prostatic hyperplasia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 16031, p. 1-15, 2016.
- CHUNG, B. I.; SOMMER, G.; BROOKS, J. D. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In: WEIN, A. J. *et al.* (eds.). **Campbell-Walsh Urology**. 10 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2012.
- CHUNG, B. H.; HORIE, S.; CHIONG, E. The incidence, mortality, and risk factors of prostate cancer in Asian men. **Prostate international**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2019.
- CORMACK, D. H. (ed.) **Fundamentos de Histologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- DE NUNZIO, C.; PRESICCE, F.; TUBARO, A. Inflammatory mediators in the development and progression of benign prostatic hyperplasia. **Nat Rev Urol**, v. 13, n. 10, p. 613-626, 2016.
- DELONGCHAMPS, N. B.; SINGH, A.; HAAS, G. P. The role of prevalence in the diagnosis of prostate cancer. **Cancer Control**, v. 13, n. 3, p. 158-68, 2006.
- DEY, P. Tissue microarray in pathology: principal, technique and applications. In: DEY, P. **Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology**. Singapore: Springer, 2018.
- FAGERHOL, M. K. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein?. **Clinical molecular pathology**, v. 49, n. 2, p. M74, 1996.
- FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.
- _____. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019

FERREIRA, E. C; ROSSI, A. V. A Quimioluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos de análise. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1003-1011, 2002.

FICO, B. G. *et al.* The comparison of acute high-intensity interval exercise vs. continuous moderate-intensity exercise on plasma calprotectin and associated inflammatory mediators. **Physiology & Behavior**, v. 183, p. 27-32, 2018.

FOELL, D. *et al.* Phagocyte-specific calcium- binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. **Clinica Chimica Acta**, v. 344, n. 1-2, p. 37-51, 2004.

FOO, K. T. What is a disease? What is the disease clinical benign prostatic hyperplasia (BPH)?. **World Journal of Urology**, v. 37, 1293-1296, 2019.

FOWKE, J. H. *et al.* Associations of body mass index, smoking, and alcohol consumption with prostate cancer mortality in the Asia Cohort Consortium. **Am J Epidemiol**, v. 182, p. 381e9, 2015.

FUJIKAWA, S. *et al.* Natural history of human prostate gland: morphometric and histopathological analysis of Japanese men. **Prostate**, v. 65, n. 4, p. 355-364, 2005.

GÁMIZ-GRACIA, L. *et al.* Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 640, n. 1-2, p. 7-28, 2009.

GARCIA-CAMPAÑA, A. M. *et al.* Detection in the liquid phase applying chemiluminescence. **Biomedical Chromatography**, v. 14, p. 166-172, 2003.

GARDINER, R. A. *et al.* Prostate Cancer - Part One: Detection. In: DE GROOT, L. J. *et al.* (eds.). **Endotext**. South Dartmouth (MA): MDText.com; 2000.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. (eds.). **Tratado de Histologia em Cores**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.

GEBHARDT, C. *et al.* S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 11, p. 1622-1631, 2006.

GNANAPRAGASAM, V. J. *et al.* Insulin-like growth factor II and androgen receptor expression in the prostate. **BJU Int.**, v. 86, n. 6, p. 731-735, 2000.

HEJL, J. *et al.* Point of care testing of fecal calprotectin as a substitute for routine laboratory analysis. **Practical Laboratory Medicine**, v. 10, p. 10-14, 2018.

HORN, T.; LAUS, J.; SEITZ, A. K. The prognostic effect of tumour- infiltrating lymphocytic

subpopulations in bladder cancer. **World J Urol**, v. 34, p. 181-187, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Censo Brasileiro de 2010. Rio de Janeiro: IBGE, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Câncer de próstata**. Brasília, DF: Instituto Nacional do Câncer, 2022.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (eds.). **Histologia Básica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KANG, J. *et al.* Tumor microenvironment mechanisms and bone metastatic disease progression of prostate cancer. **Cancer letters**, v. 530, p. 156-169, 2022.

KERKHOFF, C. *et al.* Novel insights into the role of S100A8/A9 in skin biology. **Exp Dermatol**, v. 21, p. 822-826, 2012.

KIERSZENBAUM, A. L. (ed.). **Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução à Patologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KLEIN, E. A. Prostate cancer: Risk stratification and choice of initial treatment. **UpToDate**. Waltham, Mass.: UpToDate, 2021. Disponível em: <https://www.uptodate.com>. Acesso em 30 de Agosto de 2021.

KONONEN, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med**, v. 4, n. 7, p. 844-7, 1998.

KOTZE, M. J. *et al.* Genomic medicine and risk prediction across the disease spectrum. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 52, n. 3, p. 120-137, 2015.

KRICKA, L. J. Clinical applications of chemiluminescence. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p. 279-286, 2003.

KRUZLIAK, P. *et al.* Role of calprotectin in cardiometabolic diseases. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 1, p. 67-75, 2014.

KUMAR, V. L.; MAJUMDER, P. K. Prostate gland: structure, functions and regulation. **Int Urol Nephrol**, v. 27, n. 3, p. 231-243, 1995.

LEE, C. *et al.* Regulation of prostate growth. In: CHATELAIN, C. *et al.* (eds.) **Fifth International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia**. Plymouth, UK: Health Publications, 2001.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Endocrinol Metab Clin N Am.**, v. 40, n. 3, p. 565-75, 2011.

LEIGHTON, X. *et al.* Tissue microarray analysis delineate potential prognostic role of Annexin A7 in prostate cancer progression. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. e0205837, 2018.

LEISEGANG, K. *et al.* A systematic review of herbal medicine in the clinical treatment of benign prostatic hyperplasia. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 1, p. 100153, 2022.

LIAO, C. H. *et al.* Significant association between serum dihydrotestosterone level and prostate volume among Taiwanese men aged 40-79 years. **The Aging Male**, v. 15, n. 1, p. 28-33, 2012.

LIMA, L. R. *et al.* Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester, **Dis Markers**, v. 35, p. 149-154, 2013.

LITWIN, M. S.; TAN, H. J. The diagnosis and treatment of prostate cancer: a review. **JAMA**, v. 317, n. 24, p. 2532-2542, 2017

LOTAN, T. L. *et al.* Report from the international society of urological pathology (ISUP) consultation conference on molecular pathology of urogenital cancers. I. Molecular biomarkers in prostate cancer. **Am J Surg Pathol.**, v. 44, p. e15-e29, 2020.

LOWRANCE, W. T. *et al.* Advanced prostate cancer: AUA/ASTRO/SUO guideline part I. **The Journal of Urology**, v. 205, n. 1, p. 14-21, 2021.

MA, T. *et al.* Preparation of an acridinium ester-labeled antibody and its application in goldmag nanoparticle-based, ultrasensitive chemiluminescence immunoassay for the detection of human epididymis protein 4. **Micromachines**, v. 8, n. 5, p. 149, 2017.

MADERSBACHER, S.; SAMPSON, N.; CULIG, Z. Pathophysiology of benign prostatic hyperplasia and benign prostatic enlargement: a mini-review. **Gerontology**, v. 65, n. 5, p. 458-464, 2019.

MALIK S. S. *et al.* Risk factors for prostate cancer: A multifactorial case-control study. **Current Problems in Cancer**, v. 42, n. 3, p. 337-343, 2018.

MARKER, P. C *et al.* Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Dev Biol.**, v. 253, n. 2, p. 165-174, 2003.

MASUDA, H. *et al.* Body mass index influences prostate cancer risk at biopsy in Japanese men. **Int J Urol**, v. 20, n. 7, p. 701-707, 2013.

McNEAL, J. E. *et al.* Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. **Am J Surg Pathol.**, v. 12, n. 12, p. 897-906, 1988.

McNEAL, J. E. Normal and pathologic anatomy of prostate. **Urology**, v. 17, Suppl. 3, p. 11-16, 1981a.

_____. The zonal anatomy of the prostate. **Prostate**, v. 2. N. 1, p. 35-49, 1981b.

MELO RÊGO, M. L. *et al.* Immunohistochemiluminescence detection: a quantitative tool in breast cancer HER- 2 status evaluation. **Dis Markers**, v. 34, n. 5, p. 373-377, 2013.

MIRLACHER M., SIMON M. Recipient block TMA technique Methods. **Mol Biol**, v. 664, p. 37-44, 2010.

MOCH, H. *et al.* High- throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. **The American journal of pathology**, v. 154, n. 4, p. 981-986, 1999.

MUCCI, L. A. *et al.* Familial risk and heritability of cancer among twins in nordic countries. **JAMA**, v. 315, n. 1, p. 68-76, 2016.

NAEIM, F. *et al.* Principles of Immunophenotyping. **Atlas of Hematopathology**, p. 25-46, 2013.

NAOUM, P. C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 23, p. 111-119, 2001.

NAOUN, S.; ROCHA, M.S. Marcadores tumorais utilizados no diagnóstico do câncer de próstata: antígeno prostático específico (PSA) e novas perspectivas. **Revista acadêmica Oswaldo Cruz**, ano 3, n. 12, 2016.

NASCIMENTO, G. A. F. *et al.* Chemiluminescent detection of glycode alterations in hepatic granulomatous lesions of experimental schistosomiasis. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 10, n. 8, p. 8599-8604, 2017.

NEUBAUER, K.; DUDKOWIAK, R. Fecal Markers in Inflammatory Bowel Disease. **Advances In Clinical and Experimental Medicine**, v. 19, n. 2, p. 251-255, 2010.

NOCITO, A. *et al.* Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. **The Journal of pathology**, v. 194, n. 3, p. 349-357, 2001.

- PALLER, C. J.; WANG, L.; BRAWLEY, O. W. Racial inequality in prostate cancer outcomes socioeconomics, not biology. **JAMA Oncol**, v. 5, n. 7, p. 983-984, 2019.
- PLATZ, E. A. *et al.* Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 24, p. 2009-2017, 2000.
- RODA, A. (ed.). **Chemiluminescence and bioluminescence: past, present and future**. Bologna: Royal Society of Chemistry, 2011.
- RODRIGUES, R.; SALES, C. A. Aspectos epidemiológicos e diagnósticos do carcinoma prostático. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 6, n. 1, p. 131-140, 2013.
- SAHA, N. *et al.* ADAM proteases: emerging role and targeting of the non-catalytic domains. **Cancer letters**, v. 467, p. 50-57, 2019.
- SAHIN, U. *et al.* Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. **J Cell Biol**, v. 164, p. 769-779, 2004.
- SARTOR, A. O. Risk factors for prostate cancer [Internet]. **UpToDate**. 2022]. Disponível em: https://www.uptodate.com/contents/risk-factors-for-prostate-cancer?search=Risk%20factors%20for%20prostate%20cancer&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1. Acesso em 18 de março de 2022.
- SATTARI, M.; PAZHANG, Y.; IMANI, M. Calprotectin induces cell death in human prostate cancer cell (LNCaP) through survivin protein alteration. **Cell Biology International**, v. 38, n. 11, p. 1311-1320, 2014.
- SCIARRA, A. *et al.* Androgen receptor variant 7 (AR-V7) in sequencing therapeutic agents for castration resistant prostate cancer: A critical review. **Medicine**, v. 98, n. 19, p. e15608, 2019.
- SEEGAR, T. C. M. *et al.* Structural basis for regulated proteolysis by the α -secretase ADAM10. **Cell**, v. 171, n. 7, p. 1638-1648, 2017.
- SHABANI, F. *et al.* Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. **Inflammation Research**, v. 67, p. 801-812, 2018.
- SHARMA, S.; LENSINK, M. F.; JUFFER, A. H. The structure of the CD3 $\zeta\zeta$ transmembrane dimer in lipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes**, v. 1838, n. 3, p. 739-746, 2014.
- SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer Statistics, 2021. **CA Cancer J Clin**, v. 71, p. 7, 2021.

SILVA, B. C. da *et al.* The demographic and clinical characteristics of ulcerative colitis in a Northeast Brazilian population. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 359130, 2015.

SILVA, L. P. B. G. *et al.* Evaluation of glycophenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 7, n. 7, p. 3800-3808, 2014.

SIPOS, J. A.; RINGEL, M. D. Molecular testing in thyroid cancer diagnosis and management. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 37, n. 1, p. 101680, 2023.

SOHNLE, P. G.; HAHN, B. L.; SANTHANAGOPALAN, V. Inhibition of *Candida albicans* growth by calprotectin in the absence of direct contact with the organisms. **Journal of Infectious Diseases**, v. 174, n. 6, p. 1369-1371, 1996.

SMITH, M. R. *et al.* Apalutamide and Overall Survival in Prostate Cancer. **Eur Urol**, v. 79, n. 1, p. 150-158, 2021.

SROUGI, M.; DALL'OGGIO, M.; ANTUNES, A. A. (eds.). **Hiperplasia Prostática Benigna**. São Paulo: Atheneu; 2010.

TAPLIN, M. E.; SMITH J. A. Clinical presentation and diagnosis of prostate cancer. **UpToDate**. 2022. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-and-diagnosis-of-prostate-cancer>. Acesso em 30 de outubro de 2022.

TREROTOLA, M. *et al.* Trop-2 cleavage by ADAM10 is an activator switch for cancer growth and metastasis. **Neoplasia**, v. 23, n. 4, p. 415-428, 2021,

TORHORST, J. *et al.* Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. **The American journal of pathology**, v. 159, n. 6, p. 2249-2256, 2001.

TUROVSKAYA, O. *et al.* RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 10, p. 2035-2043, 2008.

VUICHOUD, C.; LOUGHLIN, K. R. Benign prostatic hyperplasia: epidemiology, economics and evaluation. **Can J Urol**, v. 22, Supl. 1, p. 1-6, 2015.

WEEKS, I. *et al.* Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1474-1479, 1983.

WEI, J. T.; CALHOUN, E.; JACOBSEN, S. J. Urologic diseases in America Project: benign prostatic hyperplasia. **J Urol**, v. 173, n. 4, p. 1256-1261, 2005.

WETZEL, S.; SEIPOLD, L.; SAFTIG, P. The metalloproteinase ADAM10: A useful therapeutic target? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 11, p. 2071-2081, 2017.

WIKBERG, M. L.; LING, A; LI, X. Neutrophil infiltration is a favorable prognostic factor in early stages of colon cancer, **Hum Pathol**, v. 68, p. 193-202, 2017.

YANG, X. J. Interpretation of prostate biopsy. **UpToDate**. 2019. Disponível em <https://www.uptodate.com/contents/interpretation-of-prostate-biopsy>. Acesso em 15 de março de 2019.

YUI, S.; NAKATANI, Y.; MIKAMI, M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 6, p. 753-760, 2003.

YUI, S. *et al.* Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP8 and MRP14) from target cells in its apoptosis-inducing activity. **Mediators of inflammation**, v. 11, n. 3, p. 165-172, 2002.

ZAMBRA, F. M. B. **Análise imunogenética e de expressão do HLA-G em câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna**. 2016. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

ZELEFSKY, M. J.; MORRIS, M. J.; EASTHAM, J. A. Chapter 70: Cancer of the Prostate. In: DEVITA, V. T.; LAWRENCE, T. S.; ROSENBERG, S. A. (eds.). **DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology**. 11. ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2019.

ZHAO, L. Z. *et al.* A novel chemiluminescence imaging immunosensor for prostate specific antigen detection based on a multiple signal amplification strategy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 171, p. 112729, 2021.

9. APÊNDICE A - Minimally Invasive Osteosynthesis of Transtrochanteric Fractures with Dynamic Hip Screw (DHS) *

gov.br			
CORONAVÍRUS (COVID-19) ACESSO À INFORMAÇÃO PARTICIPE LEGISLAÇÃO ÓRGÃOS DO GOVERNO			
PLATAFORMA Sucupira			
ACESSO RESTRITO			
INÍCIO >> Qualis >> Qualis Periódicos			
0102-3616	REVISTA BRASILEIRA DE ORTOPEDIA (IMPRESSO)	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I	B1
0102-3616	REVISTA BRASILEIRA DE ORTOPEDIA (IMPRESSO)	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS II	B1
0102-3616	REVISTA BRASILEIRA DE ORTOPEDIA (IMPRESSO)	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III	B1



Rev Bras Ortop (Sao Paulo). 2021 Feb; 56(1): 109–113.

PMCID: PMC7895623

Published online 2020 Sep 25. doi: [10.1055/s-0040-1716758](https://doi.org/10.1055/s-0040-1716758)

PMID: [33627909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33627909/)

Minimally Invasive Osteosynthesis of Transtrochanteric Fractures with Dynamic Hip Screw (DHS) *

José André Melo Barreto Guimarães,¹ Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado,²
Pauliana Valéria Machado Galvão,² Jéssika Cristina de Lima,² Lucas dos Santos Gomes,² and
Pedro Ferreira Barreto Guimarães³

Abstract

The method presented here consists of a minimally invasive surgical technique for osteosynthesis of transtrochanteric fractures with *Dynamic Hip Screw* (DHS) 135°. It is indicated in the treatment of 31-A1 and 31-A2 fractures (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen Classification - AO) that meet the prerequisites required for using DHS. The surgery is performed, preferably, before 48 hours after the fracture. With the use of the same instruments as the traditional surgical technique and the aid of the C-arm, a closed reduction of the fracture and implantation of the DHS is performed by a 2-cm surgical incision, through dissection of the underlying tissues, with minimal bleeding and damage to the soft parts. In the immediate postoperative period, the patient is encouraged to orthostatism and walk with full load, which anticipates hospital discharge and favors early functional rehabilitation. Outpatient return is scheduled at 2, 6, 12 and 24 weeks postoperatively, with radiographic evaluation to assess fracture healing.

Keywords: femoral fractures, hip fractures, minimally invasive surgical procedures

Introduction

Transtrochanteric fracture is a type of injury that occurs in the proximal region of the femur, mainly affects the elderly, and has high rates of morbidity and mortality. Its treatment is surgical in most cases and must be performed within 48 hours after the trauma to reduce the risk of secondary injuries. Otherwise, there is a considerable increase in the risk of mortality.¹

Three aspects call attention in the management of the elderly with this diagnosis: the aging of the Brazilian population, the traditional technique widely used (since it does not allow immediate functional recovery, causing many complications in an already fragile organism) and the high costs for the public and private health systems in the treatment of such conditions.^{2 3 4}

The main argument of those who advocate the use of locked intramedullary nailing in the treatment of transtrochanteric fractures is the size of the surgical incision, which would decrease surgical trauma and postoperative pain, with better functional recovery for elderly patients. In this sense, this treatment has assumed a leading role given the aggressiveness of more traditional surgical approaches.⁴

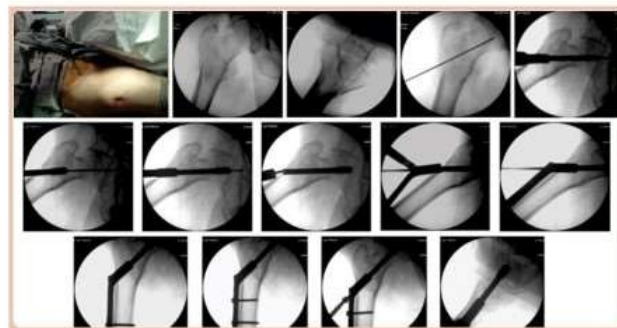
21/02/2023 10:56

Minimally Invasive Osteosynthesis of Transtrochanteric Fractures with Dynamic Hip Screw (DHS) - PMC

A great surgical trauma is harmful to the target population of these fractures, since large incisions and great tissue damage are the cause of infections, delayed consolidation and long periods of immobility.⁴ It should also be considered that in the elderly population there is a high prevalence of comorbidities and significant functional deficit,¹ and that a less traumatic technique is required for osteosynthesis of these fractures. The method presented here is a minimally invasive technique for implanting of the *Dynamic Hip Screw* (DHS) in transtrochanteric osteosynthesis.

Surgical Technique

The indications of the technique presented here coincide with the techniques proper to the DHS-135°, that is, transtrochanteric fractures classified as 31-A1 and 31-A2 (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen Classification - AO) that respect the criteria for the use of DHS: lateral cortex $\geq 20.5\text{mm}$.⁶ The technique is contraindicated in unstable fractures, classified as 31-A3 (AO), with an oblique-reverse line, and with an affected lateral wall.^{2,4} In conventional DHS instruments, the large size guide requires large incisions. They were abandoned and replaced by a transparency (template) that, when placed over the image of the C-arm, determines the angle of 135° required by the implant. Tube plates of three holes are used, fixed only in 4 cortices, through the first and third holes of the plate. Other items used in osteosynthesis are part of the standard instruments, not being modified or adapted for the application of this technique ([Figure 1](#)).



[Fig. 1](#)

Radioscopic sequence of transtrochanteric osteosynthesis. It draws attention to the size of the necessary incision.

In the operating room, after isobaric spinal anesthesia, the patient is placed on the orthopedic table with the affected limb extended and the contralateral limb flexed, giving access to the surgical arch in the lateral view ([Figure 2A](#)). Satisfactory fracture reduction should be required in both the frontal and sagittal planes, and this search for the best reduction is considered the most important point of the procedure ([Figures 2B](#) and [2C](#)).

21/02/2023 10:56

Minimally Invasive Osteosynthesis of Transtrochanteric Fractures with Dynamic Hip Screw (DHS) - PMC



Fig. 2

Positioning the patient on an orthopedic table. Anteroposterior and profile views of the fracture reduction.

Initially, the skin incision is located on the lateral side of the proximal thigh, achieved by positioning a Kirschner wire over the skin of the anterior hip ([Figure 3A](#)), verifying its position in the anteroposterior (AP) view, which should be centralized in the femoral neck ([Figure 3B](#)). The projection of this wire on the side of the thigh determines the position of the incision to be made. At this point, the wire is introduced into the skin until contact with the lateral cortex of the femur, in order to determine the height of the incision, in the sagittal plane, which must be in the center of the diaphysis.



Fig. 3

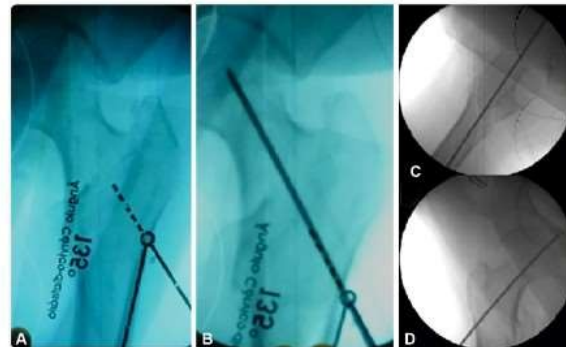
In A, projection of the anterior wire on the lateral face determines the location of the incision (red arrow). In B, radioscopic view of the centralized position of this wire in the femoral neck.

A 2-cm incision is made, using a scalpel, and involving the skin, subcutaneous tissue, and the fascia lata. The vastus lateralis muscle of the thigh will be divulsed with scissors, opening a submuscular space, both towards the greater trochanter and towards the femoral diaphysis.

21/02/2023 10:56

Minimally Invasive Osteosynthesis of Transtrochanteric Fractures with Dynamic Hip Screw (DHS) - PMC

Subsequently, the guidewire is introduced through the lateral cortex towards the neck of the femur. When the guidewire touches the lateral cortex, an AP image is made, and a transparency applied to the surgical arch monitor will determine a cervico-diaphyseal angle of 135° ([Figures 4A](#) and [4B](#)). When the wire and the template's marking are coincident, the wire is introduced to the subchondral bone of the femoral head. To assess the position of this guidewire introduced in the sagittal plane, the lateral view should be performed. The guidewire should be centered on the neck and femoral head in the AP ([Figure 4C](#)) and profile views ([Figure 4D](#)). This will determine the quality of osteosynthesis.



[Fig. 4](#)

In A, note the apposition of the template on the C-arm monitor; In B, guidewire introduced respecting the template's marking; In C and D, final position of the guidewire in profile and anteroposterior views, respectively.

The size of the sliding screw is determined using another wire, of the same length, subtracting with the extra bony part of the inserted wire. Next, the chosen sliding screw is milled and placed, which must reach 10 mm from the hip joint space. After that, remove the guidewire. In sequence, the tube-plate is placed in the skin incision in an inverted manner, that is, with the tube pointing outwards from the patient ([Figure 5A](#)) and the plaque sliding into the submuscular space opened at the beginning of the surgery ([Figure 5B](#)). With the help of the sliding screw extender, it is easily made a 180° turn on the plate, in the longitudinal axis, leaving it in the position of adaptation to the sliding screw, which will be completed with the aid of the plate impactor ([Figure 5C](#)). The holes in the femur are made to place the cortical screws and the fracture is compressed with the introduction of the compression screw. The incision is closed with a mononylon 2-0 thread, with a stitch on the fascia lata and two on the skin ([Figure 5D](#)).

21/02/2023 10:56

Minimally Invasive Osteosynthesis of Transtrochanteric Fractures with Dynamic Hip Screw (DHS) - PMC



Fig. 5

In A and B, the plate is inserted in the inverted position; in C, on the sliding screw extension, the plate is impacted; in D, surgical wound suture.

In the immediate postoperative period, 12 hours, orthostatism and walking at full load are encouraged, with assistance. Hospital discharge occurs on the first day after surgery and outpatient visits are scheduled at 2, 6, 12 and 24 weeks postoperatively. The consolidation criteria are radiological and consist of trabecular reform or bridged bone callus around the trochanteric region. Consolidation delay was defined as no radiological signs of consolidation at 6 months postoperatively and pseudarthrosis is diagnosed at 9 months postoperatively.

Final Comments

Osteosynthesis of the transtrochanteric fracture using the conventional technique (open reduction and internal fixation with DHS-135°) uses an incision that varies from 10 to 14 cm, which determines the long duration of the surgery, high aggression to the soft tissues and massive blood loss.^{3 7 8} Minimally invasive techniques, in turn, bring several benefits to orthopedics, such as: less soft tissue injury and blood loss, as well as reduced risk of infections and duration of surgery. In addition, they allow early rehabilitation, with a consequent decrease in the risk of postoperative complications.⁵

The patient operated by the technique described evolves with less pain in the immediate postoperative period, with orthostatism and gait at full load being stimulated 12 hours after the procedure. It is a technique with easy execution and high reproducibility that can contribute to help in the epidemic of fractures of the proximal femur expected in the coming decades, due to the aging of the population.

Conflito de Interesses Os autores não têm conflito de interesses a declarar.

* Trabalho desenvolvido no Hospital São Vicente, Serra Talhada, PE, Brasil.

* Work developed at the Hospital São Vicente, Serra Talhada, PE, Brazil.

Referências

1. Bottle A, Aylin P. Mortality associated with delay in operation after hip fracture: observational study *BMJ* 2006;332(7547):947–951. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
 2. Matre K, Havelin L I, Gjertsen J E, Vinje T, Espehaug B, Fevang J M. Sliding hip screw versus IM nail in reverse oblique trochanteric and subtrochanteric fractures. A study of 2716 patients in the Norwegian Hip Fracture Register. *Injury*. 2013;44(06):735–742. [PubMed] [Google Scholar]
 3. Kellam J F. Rio de Janeiro: Revinter; 2005. Tratamento cirúrgico de fraturas intertrocantericas; pp. 109–128. [Google Scholar]
 4. Shen J, Hu C, Yu S, Huang K, Xie Z. A meta-analysis of percutaneous compression plate versus intramedullary nail for treatment of intertrochanteric HIP fractures. *Int J Surg*. 2016;29:151–158. [PubMed] [Google Scholar]
 5. Thaeter M, Kobbe P, Verhaven E, Pape H C. Minimally Invasive Techniques in Orthopedic Trauma. *Curr Trauma Rep*. 2016;2(04):232–237. [Google Scholar]
 6. Hsu C E, Shih C M, Wang C C, Huang K C. Lateral femoral wall thickness. A reliable predictor of post-operative lateral wall fracture in intertrochanteric fractures. *Bone Joint J*. 2013;95-B(08):1134–1138. [PubMed] [Google Scholar]
 7. Sledge C B. Rio de Janeiro: Revinter; 2005. Quadril – Master Techniques in Orthopaedic Surgery. [Google Scholar]
 8. Sawaia R N, Belangero W D. Sistema MINUS® - Técnica Minimamente Invasiva para o tratamento das Fraturas Transtrocanterianas do Fêmur. *Rev Bras Ortop*. 2012;47(01):113–117. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
- 2021 Feb; 56(1): 109–113.
Published online 2020 Sep 25. doi: [10.1055/s-0040-1716758](https://doi.org/10.1055/s-0040-1716758)

Osteossíntese minimamente invasiva de fraturas transtrocantericas com Dynamic Hip Screw (DHS) *

Resumo

O método aqui apresentado consiste em técnica cirúrgica minimamente invasiva para osteossíntese de fraturas transtrocantericas com *Dynamic Hip Screw* (DHS) 135°. Esta técnica é indicada no tratamento de fraturas 31-A1 e 31-A2 (Classificação Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen - AO) que cumpram os pré-requisitos exigidos para o uso do DHS. A cirurgia é realizada, preferencialmente, antes de 48 horas após o acometimento da fratura. Com a utilização do mesmo instrumental da técnica cirúrgica tradicional e auxílio do arco-C, realiza-se redução incruenta da fratura e implantação do DHS por incisão cirúrgica com 2 cm, através de dissecação dos tecidos subjacentes, com mínimo sangramento e agressão às partes moles. No pós-operatório imediato, o paciente é estimulado ao ortostatismo e à deambulação com carga total, o que antecipa a alta hospitalar e favorece a reabilitação funcional precoce. O retorno ambulatorial é agendado com 2, 6, 12 e 24 semanas de pós-operatório, com avaliação radiográfica, a fim de avaliar a consolidação da fratura.

10 ANEXOS

ANEXO I

FACULDADE DE INTEGRAÇÃO
DO SERTÃO - FIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO IMUNOQUILUMINESCENTE E IMUNOHISTOQUÍMICA POR TISSUE MICROARRAY DE MARCADORES PROGNÓSTICOS PARA TUMORES E INFLAMAÇÕES PROSTÁTICAS

Pesquisador: Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51280521.4.0000.8267

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.992.041

Apresentação do Projeto:

A população idosa no Brasil vem em um crescimento exponencial e segundo informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população de idosos (pessoas com 60 anos ou mais), no país deve alcançar o patamar superior a 66 milhões até o ano de 2050. (IBGE, 2016) A esse panorama se levanta debates sobre um aumento de inúmeras manifestações patológicas prostáticas, incluindo alterações neoplásicas e não neoplásicas. O câncer de próstata que mostra-se como uma manifestação de desequilíbrio proliferativo celular muito associado a idade, visto que o envelhecimento (pessoas acima de 50 anos), é de fato o maior fator de risco para desenvolvimento desta doença, mas não se pode descartar os fatores, etnia, fatores genéticos e possivelmente fatores dietéticos. (INCA, 2019) Este câncer é o segundo mais comum em homens no mundo, com mais de 1,2 milhão de casos e 358.000 mortes anuais, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) gLOBOCAN base de dados. As taxas de câncer de próstata diferem mais de 50 vezes entre as várias populações internacionais (Siege et. al. 2020). Já quando se refere a alterações prostáticas, não neoplásicas, inúmeros fatores são responsáveis por desenvolvimento de manifestações inflamatórias as prostatites. O termo prostatite inclui doenças infecciosas (prostatite bacteriana aguda e crônica), a síndrome de dor pélvica crônica e, ainda, inflamação assintomática da próstata. As patologias inflamatórias prostáticas são uma das situações clínicas com maior impacto na atualidade, assistindo-se a um aumento do número

Endereço: Rua João Luis de Melo, 2110, 1º Andar - Tancredo Neves

Bairro: TANCREDO NEVES

CEP: 56.909-205

UF: PE

Município: SERRA TALHADA

Telefone: (87)3831-1749

E-mail: cepfis@fis.edu.br

FACULDADE DE INTEGRAÇÃO
DO SERTÃO - FIS



Continuação do Parecer: 4.992.041

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SERRA TALHADA, 23 de Setembro de 2021

Assinado por:

Lídia Pinheiro da Nóbrega
(Coordenador(a))

Endereço: Rua João Luis de Melo, 2110, 1º Andar - Tancredo Neves

Bairro: TANCREDO NEVES

CEP: 56.909-205

UF: PE

Município: SERRA TALHADA

Telefone: (87)3831-1749

E-mail: ceptis@fis.edu.br

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa Identificação de micronúcleos e ensaio imunoquimiluminescente de marcadores prognósticos para lesões tumorais prostáticas, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado, Praça Adriana Carla de Souza, 71 AABB Serra Talhada 56912-555 – [\(81\) 981611805](tel:(81)981611805) / marcoscfpm@hotmail.com

Também participa desta pesquisa: Mario Ribeiro de Melo Júnior Telefone: (81) 988523380 e-mail mariormj@gmail.com.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com os responsáveis. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Descrição da pesquisa: Em termos de incidência a neoplasia prostática mostra-se como a segunda neoplasia maligna mais frequente em homens no mundo. Foram estimados 1.280 mil casos novos, o equivalente a 7,1% de todos os valores de cânceres considerados, Identificar, utilizando a confecção do Tissue Microarray e da detecção imunoquimiluminescente biomoléculas teciduais como possíveis marcadores prognósticos para as lesões Adenocarcinoma prostático, hiperplasia benigna e prostatite não infecciosa. Identificar, a partir de imunohistoquímica por Tissue Microarray e da detecção imunoquimiluminescente biomoléculas teciduais como possíveis marcadores prognósticos para as lesões Adenocarcinoma prostático, hiperplasia benigna e prostatite não infecciosa, As coletas serão realizadas por um médico urologista e o fragmento selecionado será fixado em formalina a 10%, submetidos à rotina histológica e incluídos em parafina. De todos os tecidos, serão obtidos cortes (4 µm) montados em lâminas histológicas, coradas pela hematoxilina- eosina e analisadas por um médico Patologista confirmando a hipótese clínica de acordo com os achados histológicos.

São previstos possíveis riscos moderados diretamente associados ao procedimento médico que o participante irá realizar independente de participar ou não da pesquisa, pois o paciente já se encontra com orientação médica para realização do exame. Caso o participante venha a sentir qualquer incômodo ou dano ocasionado pela coleta de dados, a mesma será imediatamente interrompida. Os pesquisadores tem por função minimizar todos esses riscos, realizando a coleta dos dados de maneira objetiva, esclarecendo todas as dúvidas e deixando o participante a vontade. Os benefícios estão associados a possibilidades de identificar biomoléculas capazes de predizer de maneira mais fiel o prognostico das lesões prostáticas estudadas e contribuir para o melhoramento do conhecimento acadêmico sobre novos métodos de diagnósticos.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em (computador pessoal), sob a responsabilidade do pesquisador Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado, no endereço Praça Adriana Carla de Souza, 71 AABB Serra Talhada CEP 56912-555, pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, decorrentes da participação na pesquisa. Se necessário, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da FIS no endereço: R. João Luiz de Melo, 2110 - Tancredo Neves, Serra Talhada - PE, 56909-205, Tel.: (87) 3831-1472 – e-mail: faleconosco@fis.edu.br.

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Identificação imunoquimiluminescente e imunohistoquímica por tissue microarray de marcadores prognósticos para tumores e inflamações prostáticas**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão
digital
(opcional)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: