



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO E SUA ASSOCIAÇÃO
COM OS NÍVEIS DE PSA, O ESCORE DE GLEASON E A CLASSIFICAÇÃO
TUMORAL EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

MARCIO BORTH

**CHAPECÓ-SC
2023**

MARCIO BORTH

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO E SUA ASSOCIAÇÃO
COM OS NÍVEIS DE PSA, O ESCORE DE GLEASON E A CLASSIFICAÇÃO
TUMORAL EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Chapecó, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Zanini
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Sarah F. V. O. Maciel

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Av. Fernando Machado, 108 E
Centro, Chapecó, SC - Brasil
Caixa Postal 181

CEP 89802-112

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Borth, Marcio

ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS DE PSA, O ESCORE DE GLEASON E A CLASSIFICAÇÃO TUMORAL EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA. / Marcio Borth. -- 2023.

f.

Orientadora: Dr^a Daniela Zanini

Co-orientadora: Dr^a Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Chapecó, SC, 2023.

1. Câncer de Próstata; Enzimas Purinérgicas; PSA; Progressão Tumoral. I. Zanini, Daniela, orient. II. Maciel, Sarah Franco Vieira de Oliveira, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MARCIO BORTH

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO E SUA ASSOCIAÇÃO
COM OS NÍVEIS DE PSA, O ESCORE DE GLEASON E A CLASSIFICAÇÃO
TUMORAL EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, da Universidade Federal da Fronteira Sul-UFFS, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, defendido em Banca Examinadora em 10/08/2023

Aprovado em: 10/08/2023

BANCA EXAMINADORA

Daniela Zanini

Prof.^a Dr.^a Daniela Zanini - UFFS
(Orientadora)

Marcelo Zeni

Prof. Me. Marcelo Zeni – UFFS/UNOCHAPECÓ
(Avaliador - Membro externo)

Andréia Cardoso

Prof.^a Dr.^a Andréia Machado Cardoso – UFFS
(Avaliador - Membro interno)

Chapecó/SC, agosto de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida.

Agradeço aos meus pais e familiares por todo o incentivo que me foi proporcionado ao longo deste período.

Agradeço imensamente meu companheiro de vida Robson pela compreensão de todos os momentos em que não pude estar presente em sua rotina. Saiba que você é muito especial para mim, gratidão por todo apoio.

Agradeço à minha orientadora Professora Dr^a Daniela Zanini pela excelente orientação e por todos os ensinamentos, muita admiração por você.

Agradeço também à minha coorientadora Professora Dr^a Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel pela orientação.

Agradeço a todos os professores do programa de Mestrado em Ciências Biomédicas da UFFS pelos ensinamentos e trocas de experiências e a UFFS pela oportunidade.

Agradeço aos pacientes, demais pessoas e ao Hospital Regional do Oeste que contribuíram para a realização deste estudo.

RESUMO

As mudanças do perfil de morbimortalidade do câncer de próstata (CP) nas últimas décadas, têm tornado essa patologia um problema de saúde pública em vários países, inclusive no Brasil. Os processos inflamatórios e a sinalização purinérgica podem influenciar diretamente a carcinogênese da próstata, assim como a progressão tumoral. A ação enzimática das ectonucleotidases e a resposta dos tecidos aos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina assumem um papel de fundamental importância, e devem ser cada vez mais exploradas. Considerando essa inter-relação com o CP, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade da E-NTPDase e da Adenosina deaminase (ADA) em pacientes com CP e sua associação com os níveis séricos de PSA (Antígeno prostático específico), o escore de Gleason, o estadiamento tumoral e a escala da ISUP (Sociedade Internacional de Patologia Urológica) desses pacientes. Trata-se de um estudo quantitativo observacional transversal associado a uma abordagem qualitativa. Para as análises estatísticas, primeiramente, os dados foram testados quanto a sua normalidade aplicando-se o teste de Shapiro-Wilk. Após, foi utilizado o Teste t de Student e ANOVA One-way. O nível de significância utilizado foi de 0,05 e o programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 8.0.1. As amostras de linfócitos foram coletadas por punção venosa (30 mL) de 39 pacientes com diagnóstico de CP, anteriormente ao tratamento cirúrgico do tumor, e de 37 indivíduos controle, de faixa etária semelhante. Após o convite e o aceite na participação do estudo, os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a participação na mesma. A partir das análises dos resultados, foi possível observar que em relação à idade, a média foi de $66 \pm 6,72$ anos nos pacientes, e de $65,81 \pm 10,30$ nos controles ($p=0,8503$). Do grupo de pacientes, 21 (54%) apresentaram níveis séricos de PSA ≥ 4 a ≤ 10 ng/mL antes da intervenção terapêutica. Em relação ao escore de Gleason, 27 (69,2%) pacientes apresentaram escore 7. Em relação ao estadiamento clínico, 17 (43,6%) pacientes apresentaram classificação T2, e 14 (35,9%) apresentaram classificação T3. Em relação ao escore da ISUP, 19 (48,8%) pacientes apresentaram classificação ISUP 2. A atividade da E-NTPDase, para a hidrólise do ATP em linfócitos, está significativamente aumentada no grupo de pacientes com CP quando comparado com o grupo controle ($p=0,0001$). Já a atividade da E-NTPDase, para a hidrólise do ADP em linfócitos, está significativamente diminuída no grupo de pacientes com CP quando comparado com o grupo controle ($p=0,0001$). A atividade da ADA em linfócitos está diminuída em pacientes com CP quando comparado ao grupo controle ($p=0,0003$). Em relação aos níveis séricos de PSA, a hidrólise de ATP foi estatisticamente maior em pacientes com CP em relação ao grupo controle, em ambas as análises, níveis séricos de PSA < 10 ($p=0,0037$) e PSA ≥ 10 ($p=0,0001$). A hidrólise de ADP foi estatisticamente menor em pacientes com CP em relação ao grupo controle quando o PSA ≥ 10 e PSA < 10 , ambos valor de $p=0,0001$. A atividade da ADA diminuiu significativamente com o aumento dos níveis séricos de PSA em relação ao grupo controle tanto PSA < 10 ($p=0,0104$), quanto PSA ≥ 10 ($p=0,0086$). Em relação ao escore de Gleason, a hidrólise de ATP foi maior no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle em ambas as análises, Gleason < 7 ($p=0,5664$), Gleason 7 ($p=0,0001$) e Gleason > 7 ($p=0,0056$). A hidrólise de ADP foi menor no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle em ambas as análises, Gleason < 7 ($p=0,0034$), Gleason 7 ($p=0,0001$) e Gleason > 7 ($p=0,0012$). A atividade da ADA foi menor no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle em ambas as análises, Gleason < 7 ($p=0,3647$), Gleason 7 ($p=0,0171$) e Gleason > 7 ($p=0,3955$). Em relação ao estadiamento clínico, a hidrólise de ATP esteve aumentada no grupo de pacientes quando comparada ao grupo controle em ambas as análises, T1 ($p=0,1601$), T2 ($p=0,0004$), T3 ($p=0,0003$). A hidrólise de ADP esteve diminuída no grupo de pacientes quando comparada ao grupo controle em ambas as análises, T1 ($p=0,03557$), T2 e T3 ($p=0,0001$). A atividade da ADA esteve diminuída no grupo de pacientes quando comparada ao grupo controle em ambas as análises, T1 ($p=0,1877$), T2

($p=0,0303$), T3 ($p=0,0397$). Em relação a escala da ISUP, a hidrólise de ATP esteve aumentada no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle em todas as análises, ISUP 1 ($p=0,2200$), ISUP 2 ($p=0,0024$), ISUP 3 ($p=0,0192$), ISUP 4 e 5 ($p=0,0108$). A hidrólise de ADP esteve diminuída no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle em todas as análises, ISUP 1 ($p=0,0005$), ISUP 2 e ISUP 3 ambas ($p=0,0001$), ISUP 4 e 5 ($p=0,0007$). A atividade da ADA esteve diminuída no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle em todas as análises, ISUP 1 ($p=0,0832$), ISUP 2 ($p=0,0068$), ISUP 3 ($p=0,2625$), ISUP 4 e 5 ($p=0,2530$). Pela primeira vez foi possível relacionar a atividade da E-NTPDase e da ADA com os níveis séricos de PSA, o escore de Gleason, o estadiamento tumoral e os valores de ISUP em pacientes com CP. Em tempo, experimentos adicionais sobre a expressão de receptores e análises no tecido tumoral são necessários para corroborar com os resultados encontrados no presente estudo, a fim de que a modulação da sinalização purinérgica possa integrar a base de novos fármacos e protocolos terapêuticos eficientes no controle do desenvolvimento e da progressão do CP.

Palavras-chave: Câncer de Próstata; Ectonucleotidases; PSA; Progressão Tumoral.

ABSTRACT

Changes in the morbidity and mortality profile of prostate cancer (PC) in recent decades have made this pathology a public health problem in several countries, including Brazil. Inflammatory processes and purinergic signaling can directly influence prostate carcinogenesis, as well as tumor progression. The enzymatic action of ectonucleotidases and the response of tissues to nucleotides and adenine nucleoside play a fundamentally important role, and should be increasingly explored. Considering this interrelation with PC, the objective of the present study was to evaluate the activity of E-NTPDase and Adenosine deaminase (ADA) in patients with PC and its association with serum levels of PSA (Prostate Specific Antigen), the score of Gleason, tumor staging and ISUP scale (International Society of Urological Pathology) of these patients. This is a cross-sectional observational quantitative study associated with a qualitative approach. For the statistical analyses, firstly, the data were tested for normality by applying the Shapiro-Wilk test. Afterwards, Student's t test and One-way ANOVA were used. The significance level used was 0.05 and the statistical program used was GraphPad Prism 8.0.1. Lymphocyte samples were collected by venipuncture (30 mL) from 39 patients diagnosed with PC, prior to surgical treatment of the tumor, and from 37 control individuals, of similar age range. After the invitation and acceptance to participate in the study, the participants signed the Term of Free and Informed Consent to participate in it. From the analysis of the results, it was possible to observe that in relation to age, the mean was 66 ± 6.72 years in patients, and 65.81 ± 10.30 in controls ($p=0.8503$). Of the group of patients, 21 (54%) had serum PSA levels ≥ 4 to ≤ 10 ng/mL before the therapeutic intervention. Regarding the Gleason score, 27 (69.2%) patients had a score of 7. Regarding clinical staging, 17 (43.6%) patients had a T2 classification, and 14 (35.9%) had a T3 classification. Regarding the ISUP score, 19 (48.8%) patients had ISUP classification 2. E-NTPDase activity, for the hydrolysis of ATP in lymphocytes, is significantly increased in the group of patients with CP when compared to the control group ($p=0.0001$). The activity of E-NTPDase, for the hydrolysis of ADP in lymphocytes, is significantly reduced in the group of patients with CP when compared to the control group ($p=0.0001$). ADA activity in lymphocytes is reduced in patients with CP when compared to the control group ($p=0.0003$). Regarding serum PSA levels, ATP hydrolysis was statistically higher in patients with CP compared to the control group, in both analyses, serum PSA levels < 10 ($p=0.0037$) and PSA ≥ 10 ($p=0.0001$). ADP hydrolysis was statistically lower in patients with CP compared to the control group when PSA ≥ 10 and PSA < 10 , both p -value= 0.0001 . ADA activity significantly decreased with increasing serum PSA levels compared to the control group, both PSA < 10 ($p=0.0104$) and PSA ≥ 10 ($p=0.0086$). Regarding the Gleason score, ATP hydrolysis was higher in the patient group when compared to the control group in both analyses, Gleason < 7 ($p=0.5664$), Gleason 7 ($p=0.0001$) and Gleason > 7 ($p=0.0056$). ADP hydrolysis was lower in the patient group when compared to the control group in both analyses, Gleason < 7 ($p=0.0034$), Gleason 7 ($p=0.0001$) and Gleason > 7 ($p=0.0012$). ADA activity was lower in the patient group when compared to the control group in both analyses, Gleason < 7 ($p=0.3647$), Gleason 7 ($p=0.0171$) and Gleason > 7 ($p=0.3955$). Regarding clinical staging, ATP hydrolysis was increased in the patient group when compared to the control group in both analyses, T1 ($p=0.1601$), T2 ($p=0.0004$), T3 ($p=0.0003$). ADP hydrolysis was reduced in the patient group when compared to the control group in both analyses, T1 ($p=0.03557$), T2 and T3 ($p=0.0001$). ADA activity was reduced in the patient group when compared to the control group in both analyses, T1 ($p=0.1877$), T2 ($p=0.0303$), T3 ($p=0.0397$). Regarding the ISUP scale, ATP hydrolysis was increased in the patient group when compared to the control group in all analyses, ISUP 1 ($p=0.2200$), ISUP 2 ($p=0.0024$), ISUP 3 ($p=0.0192$), ISUP 4 and 5 ($p=0.0108$). ADP hydrolysis was decreased in the patient group when compared to the control group in all analyses, ISUP 1 ($p=0.0005$), ISUP 2 and ISUP 3 both ($p=0.0001$), ISUP 4 and 5

($p = 0.0007$). ADA activity was reduced in the patient group when compared to the control group in all analyses, ISUP 1 ($p=0.0832$), ISUP 2 ($p=0.0068$), ISUP 3 ($p=0.2625$), ISUP 4 and 5 ($p=0.2530$). For the first time, it was possible to relate E-NTPDase and ADA activity to serum PSA levels, Gleason score, tumor staging, and ISUP values in patients with CP. In time, additional experiments on the expression of receptors and analyzes in tumor tissue are necessary to corroborate the results found in the present study, so that the modulation of purinergic signaling can form the basis of new drugs and efficient therapeutic protocols in controlling the development and progression of CP.

Keywords: Prostate cancer; Ectonucleotidases; PSA; Tumor Progression.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Localização anatômica da próstata.....	19
FIGURA 2 - Ação conjunta dos componentes da sinalização purinérgica.....	24
FIGURA 3 - Hidrólise de ATP, ADP e a atividade da ADA em linfócitos.....	35
FIGURA 4 - Hidrólise de ATP, ADP e atividade da ADA em linfócitos, de acordo com os níveis de PSA.....	36
FIGURA 5 - Hidrólise de ATP, ADP e atividade da ADA em linfócitos, de acordo com o escore de Gleason.....	37
FIGURA 6 - Hidrólise de ATP, ADP e atividade da ADA em linfócitos, de acordo com o estadiamento clínico.....	38
FIGURA 7 - Hidrólise de ATP, ADP e atividade da ADA em linfócitos, de acordo com o ISUP.....	39

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Classificação TNM do câncer de próstata	22
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características gerais dos pacientes e controles.....	32
TABELA 2 - Classificação tumoral dos pacientes com câncer de próstata.....	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA - Adenosina deaminase

Ado – Adenosina

ADP - Adenosina difosfato

ADT - Terapia de privação androgênica

AMP - Adenosina monofosfato

ATP - Adenosina trifosfato

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

Cl⁻ - Ânion cloreto

COVID-19 - Doença de coronavírus 2019

CP - Câncer de próstata

CSF - Centro de Saúde da Família

DAMPs - Padrões moleculares associados ao dano

e5NT/CD73 - Ecto-5'-nucleotidase

E-NTPDase - Ecto-Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

ESF - Equipe de Saúde da Família

FA - Fosfatase alcalina

HClO - Ácido hipocloroso

HRO - Hospital Regional do Oeste

ISUP - Sociedade Internacional de Patologia Urológica

O₂⁻ - Ânion superóxido

O₂ - Oxigênio

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCA3 - Antígeno prostático 3

PSA - Antígeno prostático específico

PSMA - Antígeno específico da membrana prostática

SBU - Sociedade Brasileira de Urologia

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TNM - Classificação de tumores malignos

UFFS - Universidade Federal da Fronteira Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1	CÂNCER DE PRÓSTATA - BIOMARCADORES E CLASSIFICAÇÕES TUMORAIS	19
3.2	SISTEMA PURINÉRGICO E CÂNCER DE PRÓSTATA	23
4	METODOLOGIA.....	28
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	28
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	28
4.2.1	Coleta das amostras biológicas	28
4.2.2	Processamento e separação dos linfócitos.....	29
4.2.3	Dosagem de proteína.....	29
4.2.4	Determinação da atividade da E-NTPDase.....	30
4.2.5	Determinação da atividade da ADA.....	30
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	30
4.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	31
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
4.6	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	31
5	RESULTADOS	32
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	32
5.2	ATIVIDADE DA E-NTPDase E DA ADA	34
6	DISCUSSÃO.....	40
7	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	53
	APÊNDICE II - INFORMAÇÕES CLÍNICO PATOLÓGICAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CP) é reconhecido como um dos mais importantes problemas de saúde enfrentados pela população masculina, sendo um dos cânceres mais prevalentes em todo o mundo e a causa da morte de milhares de homens todos os anos (IARC, 2023). Embora a prostatectomia radical (o tratamento mais comum para o CP) atinja bons resultados gerais, a sua realização desenvolve alguns efeitos colaterais desagradáveis, tais como incontinência urinária e disfunção erétil, contribuindo para a morbidade associada a essa neoplasia (COSTELLO, 2020).

A classificação tumoral e o grau de diferenciação celular são definidos através da realização de biópsia prostática, que permite ao patologista distinguir os tumores. Atualmente, o sistema de Gleason, que enfatiza a arquitetura glandular, é o mais utilizado para prever a evolução e prever o estágio patológico do CP. Por meio desse sistema, lesões com escore de Gleason 2 a 4 (bem diferenciados) têm um comportamento mais brando, enquanto tumores com escores de 7 a 10 (indiferenciados) são mais agressivos, respondendo mal às diferentes opções de tratamento. O local mais comum de disseminação do CP é o tecido ósseo, sendo que a presença ou não de metástase óssea é um dado fundamental que direciona o protocolo terapêutico (SHARMA; MIYAMOTO, 2018).

Geralmente o CP atinge células glandulares e, nesse contexto, a literatura aponta que entre os principais mecanismos associados ao desenvolvimento deste tipo tumoral, deve-se destacar os processos inflamatórios e a expressão de receptores andrógenos - que potencializam a carcinogênese devido à intensa produção de radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (EROs). Os processos oxidativos têm a capacidade para alterar o DNA, promovendo significativas alterações celulares - a exemplo de eventos apoptóticos e mutações - que se apresentam como a base originária das doenças oncológicas (GANDAGLIA *et al.*, 2021).

Aliado a esses eventos, assim como em outros cânceres, a idade é um fator de risco importante para a ocorrência de tumores, uma vez que o desenvolvimento do CP aumenta drasticamente após os 50 anos (PERNAR *et al.*, 2018). O estudo dos mecanismos envolvidos no aumento da incidência do CP com a idade é de grande interesse, sendo importante para o entendimento desta doença. Uma explicação possível pode estar associada ao desequilíbrio entre os agentes oxidantes e os mecanismos de defesa antioxidantes em vários tecidos, incluindo a próstata, que ocorre concomitantemente ao envelhecimento e leva a um estado oxidativo e a danos ao organismo (SHUKLA *et al.*, 2020).

Apesar de algumas evidências já terem sido traçadas a respeito da fisiopatologia do CP, é fundamental que outros mecanismos relacionados à patologia sejam mais bem compreendidos, para que se realize diagnóstico precoce e seja possível expandir as opções de tratamentos menos agressivos para essa doença (OCHOA-CORTES *et al.*, 2014).

Sabe-se que nas células tumorais ocorrem alterações significativas na atividade das vias de sinalização - afetando uma extensa gama de funções celulares, desde crescimento e proliferação até apoptose, invasão e metástase (VAGHARI-TABARI *et al.*, 2021). Sob esse prisma, destaca-se a ação que os nucleotídeos e nucleosídeo extracelulares (ATP, ADP, AMP e seu metabólito adenosina) produzem em respostas a diversos processos patológicos, tais como apoptose, controle da proliferação e da diferenciação celular (BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013). Nessa linha, diversos estudos têm sugerido o envolvimento da sinalização purinérgica na fisiopatologia dos tumores, inclusive no CP (ARAÚJO *et al.*, 2005; MALDONADO *et al.*, 2008; ZANINI *et al.*, 2012; DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017; PFAFFENZELLER *et al.*, 2020).

Os linfócitos desempenham um papel importante nas respostas imunes antitumorais, são alvos diretos de algumas terapias antineoplásicas, e a composição e organização espacial das populações de células T intratumorais são prognósticos em alguns tipos de câncer (COWELL., 2020). Sabe-se, ainda, que o microambiente tumoral é rico em nucleosídeo e nucleotídeos, sendo o ATP extracelular uma importante molécula pró-inflamatória e a adenosina um componente chave - altamente imunossupressor (DI VIRGILIO *et al.*, 2016). Apesar do entendimento de muitas ações atreladas a essas moléculas, os seus efeitos na interação sistêmica tumor-hospedeiro não estão completamente compreendidos (DI VIRGILIO *et al.*, 2016).

Os níveis de nucleotídeos de adenina e adenosina circulantes, assim como as suas concentrações no microambiente tumoral, estão diretamente associados com a atividade de enzimas capazes de hidrolisar essas moléculas. Dentre essas enzimas podemos citar a: i) E-NTPDase (CD39) (Ecto-Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) que degrada ATP a ADP e ADP a AMP; ii) ecto-5'-nucleotidase (CD73) que degrada AMP a adenosina; e iii) adenosina desaminase (ADA) que degrada adenosina em inosina. Igualmente importantes, associados ao complexo sistema enzimático da sinalização purinérgica, estão os receptores purinérgicos - que constituem as famílias P1 e P2 (P2X e P2Y) (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

Nesse cenário, apesar de alguns estudos envolvendo ectoenzimas do sistema purinérgico terem sido desenvolvidos em pacientes com CP, ainda carecem estudos para elucidar como se processa a ação conjunta dos componentes da sinalização purinérgica, atentando-se os níveis de PSA, o escore de Gleason e o estadiamento tumoral nestes pacientes.

Desta forma, considerando que: 1) o CP é um problema de saúde pública mundialmente relacionado com altas taxas de incidência, morbidade e mortalidade; 2) os componentes da sinalização purinérgica podem desempenhar papel fundamental no desenvolvimento e na progressão do CP; 3) já se reconhecem alterações na atividade das enzimas do sistema purinérgico em alguns tipos de câncer, porém poucos trabalhos científicos foram realizados buscando relacionar a atividade das

ectonucleotidasas e da ADA com marcadores diagnóstico e prognósticos do CP, torna-se de fundamental importância aprofundar o conhecimento a respeito do comportamento conjunto desses fatores em indivíduos com CP, a fim de promover melhorias no diagnóstico e no tratamento dos pacientes acometidos com essa patologia, promovendo queda nas taxas de morbidade e mortalidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade das enzimas E-NTPDase e ADA, associando-as com diferentes parâmetros clínico-patológicos em pacientes com CP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização clínico-patológica do grupo amostral;
- Analisar a atividade da E-NTPDase em linfócitos de pacientes com diagnóstico de CP e em indivíduos controle;
- Avaliar a atividade da ADA em linfócitos de pacientes com diagnóstico de CP e em indivíduos controle;
- Associar a atividade das enzimas E-NTPDase e ADA com os níveis séricos de PSA, o escore de Gleason, o estadiamento tumoral e a escala da ISUP.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

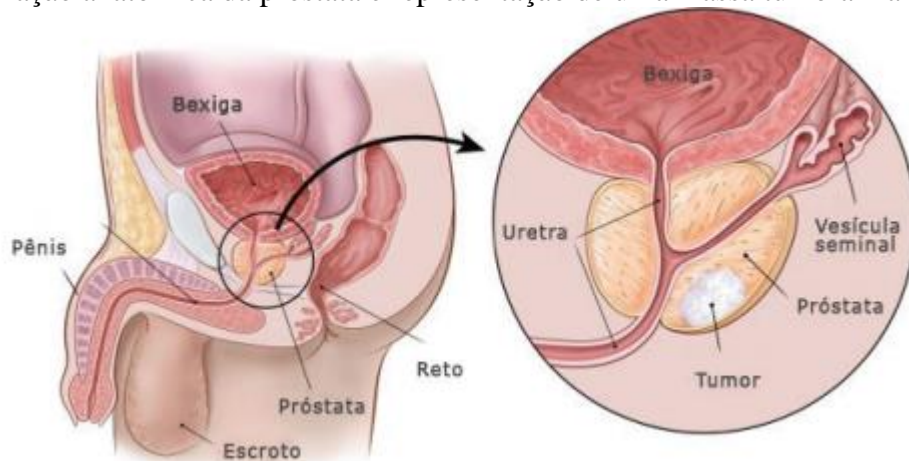
3.1 CÂNCER DE PRÓSTATA - BIOMARCADORES E CLASSIFICAÇÕES TUMORAIS

Mundialmente, o CP é tido como o segundo câncer que mais acomete os homens. A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que no ano de 2020 ele correspondia a cerca de 13,5% dos cânceres mais recorrentes no mundo (BRASIL, 2020).

O número estimado de casos novos de CP no Brasil, para o triênio de 2023 a 2025, é de 71.730, correspondendo a um risco estimado de 67,86 casos novos a cada 100 mil homens. Regionalmente, os dados mostram que a população mais afetada será a região do Sudeste; seguida do Nordeste, Centro-oeste, Sul e Norte, respectivamente (BRASIL, 2022).

Diante dos dados epidemiológicos apresentados, é importante ressaltar a fisiopatologia do CP. A próstata é uma glândula que faz parte do aparelho genitourinário masculino e é responsável por produzir o fluido que protege e nutre os espermatozoides no sêmen, podendo possuir diferentes tamanhos, de acordo com a estrutura e fisiologia de cada indivíduo (ACS, 2019). Está localizada na frente do reto e embaixo da bexiga urinária, normalmente de pequeno volume e frequentemente submetida ao risco de lesões e acometimentos de tumores. Na Figura 1 é possível verificar a posição anatômica da próstata e a representação de uma massa tumoral na glândula.

Figura 1 - Localização anatômica da próstata e representação de uma massa tumoral na glândula.



Fonte: BRASIL (2021).

Os tumores são crescimentos anormais celulares que podem estar relacionados a diversos fatores. O CP não tem uma causa exata cientificamente comprovada, entretanto existem fatores relacionados que podem favorecer o surgimento de tal tumor. A lesão se desenvolve mais comumente

em indivíduos acima dos 50 anos, sendo que mais da metade dos casos diagnosticados ocorre na faixa etária de 65 anos ou mais (BRASIL, 2020).

Além disso, as mutações genéticas hereditárias e/ou adquiridas são os fatores preponderantes para o desenvolvimento do CP. Histórico familiar, mutações no DNA, ativação de oncogenes e a síndrome metabólica estão relacionados ao maior risco de desenvolver o CP. Não bastasse, diabetes e exposição aos raios ultravioleta estão associados à maior incidência, já o tabagismo e a obesidade são capazes de aumentar a mortalidade específica, enquanto a atividade física regular pode diminuir a progressão da doença (GANDAGLIA *et al.*, 2021).

O diagnóstico do CP geralmente ocorre após o rastreio, haja vista que a doença tem curso assintomático. Quando sintomático, pode indicar mau prognóstico, já que em 6% dos casos o câncer já é metastático no momento do diagnóstico e um dos principais sintomas apresentados refere-se à dor óssea, uma vez que as metástases ósseas são as mais comuns no CP (COLLIN *et al.*, 2009).

Como dito acima, na maioria das vezes o CP possui evolução silenciosa, podendo não demonstrar sinais e sintomas em sua fase inicial. Todavia, as manifestações clínicas mais comuns são: - dificuldade de urinar, - demora em iniciar ou concluir o jato urinário, - redução do jato urinário, - necessidade de urinar diversas vezes durante o dia ou à noite e, - presença de sangue na urina. Esses sinais e sintomas são inespecíficos e é indispensável avaliação médica com objetivo de diagnóstico diferencial (BRASIL, 2021).

Segundo a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU), está indicado o rastreio para o CP através da dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA) e do exame de toque retal para todos os homens, a partir dos 50 anos, sendo que indivíduos com maior risco de desenvolvimento da doença - homens de raça negra ou com parentes de primeiro grau que tenham histórico de CP - devem iniciar o rastreio aos 45 anos (SBU, 2020).

O PSA está entre os marcadores tumorais com maior utilidade clínica conhecidos até o momento. Trata-se de uma glicoproteína, secretada no lúmen dos ductos prostáticos através das células epiteliais da próstata, cuja função é solubilizar o esperma após a ejaculação, bem como liquefazer o coágulo seminal. O ponto de corte do teste é de 4,0 ng/mL, sendo que valores superiores necessitam de avaliação adicional. O valor preditivo do teste é de 20% em pacientes com níveis plasmáticos ligeiramente elevados (entre 4,0 ng/mL e 10,0 ng/mL) e chega a até 60% quando os níveis plasmáticos ultrapassam os 10,0 ng/mL. Além disso, o valor preditivo negativo do teste chega a 85% para tumores invasivos (COLEY *et al.*, 1997; THOMPSON *et al.*, 2004).

O PSA tem sido recomendado como um alvo molecular para a terapia antineoplásica, uma vez que ele tem função fundamental nas vias de sinalização do CP, incluindo proliferação, invasão, metástase, angiogênese, apoptose, resposta imune, e regulação do microambiente tumoral (MORADI

et al., 2019). Atualmente, o PSA não pode ser considerado apenas como um guia para a presença ou ausência de CP. Sua determinação também pode ajudar o urologista a decidir sobre o tratamento mais conveniente para um paciente com hipertrofia prostática benigna, como critério de progressão da doença (COZAR *et al.*, 2020).

Além disso, o PSA é um fator chave para o acompanhamento de pacientes com adenocarcinoma de próstata em qualquer estágio que receberam tratamento (cirurgia, radioterapia ou terapias focais e/ou terapia hormonal). Serve, ainda, como guia para a identificação de recidivas bioquímicas e suspeita da existência de recidivas locais ou à distância, assim como pode ser utilizado para propor ou descartar tratamentos adjuvantes. O papel do PSA, como ferramenta de rastreamento, foi recentemente reforçado pela observação de aumento nas taxas de mortalidade e da existência de casos mais agressivos de CP naqueles países onde o uso dessa ferramenta decaiu (COZAR *et al.*, 2020).

Conjuntamente, para o rastreamento do CP, realiza-se o exame de toque retal, no qual o examinador busca por anormalidades na próstata que possam ser palpadas, tais como nódulos endurecidos. A utilização do toque retal dobra as chances de detecção de um câncer clinicamente importante (COLEY *et al.*, 1997; THOMPSON *et al.*, 2004). Infelizmente, muitos homens ainda são muito resistentes à realização desse exame, tanto que Pereira e colaboradores (2021) referem que o toque retal está ligado à transgressão da masculinidade, o que causa medo de fazê-lo.

Outros testes também vêm ganhando notoriedade para uso como biomarcadores que auxiliam no rastreamento do CP, no sentido de submeter pacientes com testes inconclusivos à biópsia ou não. Dentre eles podemos citar o Antígeno Prostático 3 (PCA3), descoberto em 1999 e que está super expresso na maioria das amostras tumorais de CP, porém não nos tecidos saudáveis ou apenas hipertrofiados. Geralmente é coletado através de amostra de urina obtida após realização do exame de toque retal. Sua indicação é para homens com testes de PSA numa faixa indeterminada (2,5 a 10,0 ng/mL) e homens com biópsias anteriores negativas, e que continuam com PSA elevado. Complementarmente, outro marcador recente trata-se do Antígeno Específico da Membrana Prostática (PSMA), cuja indicação baseia-se no auxílio para determinar a estratificação de risco do CP e, conseqüentemente, as bases do tratamento, haja vista que foi observada uma menor expressão dele em amostras com padrão de Gleason 3, do que nas com padrão de Gleason 4 (BRAVACCINI *et al.*, 2018).

Diante do exposto, cabe destacar que o monitoramento do PSA e o exame histopatológico de biópsias tumorais permanecem como padrões-ouro no diagnóstico de CP (BOERRIGTER *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o sistema de pontuação de Gleason é um método confiável para quantificar a agressividade do CP, uma vez que fornece um importante valor de referência para avaliação clínica em estratégias terapêuticas (LU *et al.*, 2022). Para se obter o escore total da classificação de Gleason, que varia de 2 a 10, o médico patologista gradua de 1 a 5 as duas áreas mais frequentes do tumor e soma

os resultados. Quanto mais baixo o escore de Gleason, melhor será o prognóstico do paciente. Escores entre 2 e 4 representam que o câncer possivelmente terá um crescimento lento. Escores intermediários, entre 5 e 7, podem significar um câncer de crescimento lento ou rápido - sendo que a velocidade de crescimento vai depender de uma série de outros fatores, incluindo o tempo durante o qual o paciente tem o câncer. Escores entre 8 e 10 representam um câncer de crescimento muito rápido (BRASIL, 2016).

O escore de Gleason também prediz a chance de disseminação do CP para outros órgãos. Para o escore de 2 a 4 há cerca de 25% de chances do câncer disseminar-se para fora da próstata em 10 anos, com dano em outros órgãos, afetando a sobrevivência. Em consonância, escore de Gleason de 5 a 7 apresenta, aproximadamente, 50% de chances desse evento ocorrer, enquanto para Gleason de 8 a 10 a probabilidade aumenta para 75% (BRASIL, 2016).

Segundo Samarutanga e colaboradores (2016), o sistema de classificação da ISUP consiste em cinco graus: grau 1 (escore de Gleason 3 + 3), grau 2 (escore de Gleason 3 + 4), grau 3 (escore de Gleason 4 + 3), grau 4 (escore de Gleason 4 + 4, 3 + 5, 5 + 3) e grau 5 (escore de Gleason 9 ou 10).

Neste sentido a classificação de Gleason é feita em função das características celulares e histológicas que constituem o tumor. As células que, embora tumorais e malignas, são mais semelhantes com as da próstata normal, mais diferenciadas e menos agressivas, são classificadas como grau 1. Aquelas que apresentam características celulares já muito distintas das normais, por isso muito mais agressivas, são classificadas como de grau 5. A classificação final do escore de Gleason é atribuída em função dos dois tipos celulares predominantes no tumor. O resultado final resulta da soma dos graus dos dois graus mais frequentes (SAMARUTANGA *et al.*, 2016).

Além da escala de Gleason, o estadiamento preciso do CP primário é importante para a seleção do protocolo terapêutico (local *versus* sistêmico) (POMYKALA *et al.*, 2019). O estadiamento TNM do CP é demonstrado no Quadro 1 que está representado abaixo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA, 2019).

Quadro 1 – Classificação TNM do câncer de próstata

<i>pT - TUMOR PRIMÁRIO:</i>
<i>pTX- Tumor primário não pode ser avaliado</i>
<i>pT0- Não há evidência de tumor primário</i>
<i>T1- O tumor é um achado histológico incidental, não é palpável ao toque retal ou visualizado por técnicas de imagenologia</i>
<i>T1a- Tumor em 5% ou menos do tecido ressecado</i>
<i>T1b - Tumor em mais de 5% do tecido ressecado</i>
<i>T1c- Tumor identificado em biópsia por agulha (PSA elevado, mas tumor não palpável ao toque e não visualizado por técnicas de imagenologia)</i>
<i>pT2- Tumor limitado à próstata</i>

<p><i>pT2a</i>– O tumor compromete até metade de um lobo, ou menos</p> <p><i>pT2b</i>– O tumor compromete mais da metade de um lobo, porém não ambos os lobos</p> <p><i>pT2c</i>– O tumor compromete ambos os lobos</p> <p><i>pT3</i>– O tumor se estende além da próstata</p> <p><i>pT3a</i>– Extensão extraprostática (unilateral ou bilateral); inclui comprometimento microscópico do colo vesical</p> <p><i>pT3b</i>– O tumor invade a(s) vesícula(s) seminal(is)</p> <p><i>pT4</i>– O tumor está fixo ou invade outras estruturas adjacentes que não a vesícula seminal: esfíncter externo, reto, músculos elevadores ou parede pélvica</p>
<p>pN - LINFONODOS REGIONAIS:</p> <p><i>pNX</i>– Linfonodos regionais não podem ser avaliados</p> <p><i>pNO</i>– Ausência de metástases em linfonodos regionais</p> <p><i>pN1</i>– Metástase(s) em linfonodo(s) regional(is)</p>
<p>pM- METÁSTASE À DISTÂNCIA (M):</p> <p><i>pMO</i>– Ausência de metástases à distância</p> <p><i>pM1</i>– Metástases à distância</p> <p><i>M1a</i>– Linfonodo(s) não regional(is)</p> <p><i>M1b</i>– Osso(s)</p> <p><i>M1c</i>– Outra(s) localização(ões)</p>

Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA (2019).

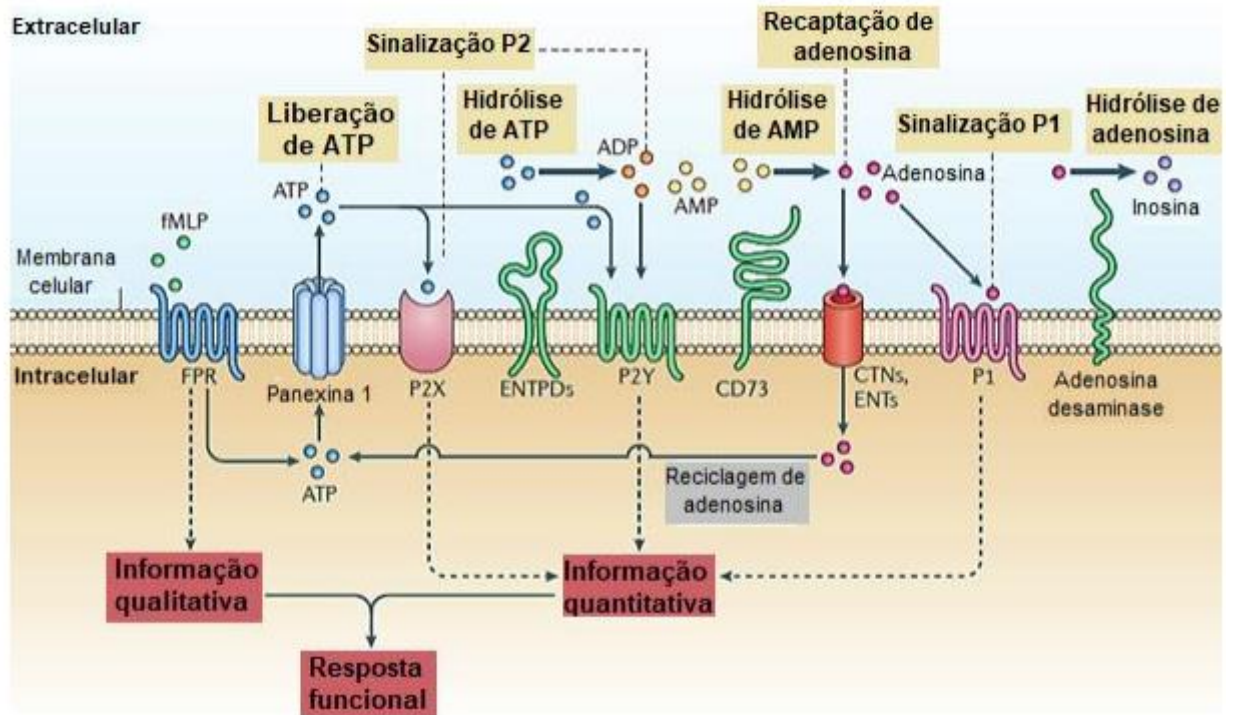
Os pacientes com CP também podem ser estratificados em grupos de: i) baixo, ii) intermediário e, iii) alto risco para a ocorrência de recidiva da doença. Para pacientes de baixo risco, uma opção de conduta terapêutica é a vigilância ativa do CP. Ainda, a braquiterapia também é uma opção para pacientes de risco de recidiva baixo ou intermediário - podendo ser utilizada como um reforço, após a radioterapia externa, para pacientes de alto risco. Já para pacientes de risco intermediário e alto, a prostatectomia radical e radioterapia devem ser consideradas. Para mais, além da radioterapia, pode ser necessário, concomitantemente, Terapia de Privação Androgênica (ADT). Finalmente, após a prostatectomia radical e dependendo de fatores patológicos, biológicos e clínicos, a radioterapia associada a ADT pode ser proposta como tratamento adjuvante ou de resgate (ACHARD *et al.*, 2021). A ADT singularmente pode ser oferecida a pacientes sem indicação de terapia definitiva, tais como pacientes com expectativa de vida limitada (BEKELMAN *et al.*, 2018).

3.2 SISTEMA PURINÉRGICO E CÂNCER DE PRÓSTATA

O sistema purinérgico é composto por moléculas sinalizadoras (ATP, ADP, AMP e adenosina (Ado)), enzimas que degradam esses nucleotídeos e nucleosídeo de adenina, além de receptores purinérgicos compostos pelas: a) família P1: (A2, A2A, A2B e A3); e b) família P2 (P2X1-7 e P2Y 1, 2, 4, 6, 12, 14) (DI VIRGÍLIO, 2012).

A fim de exemplificar a ação conjunta dos componentes da sinalização purinérgica, apresentamos a Figura 2 que dá destaque às enzimas, receptores e moléculas sinalizadoras.

Figura 2 - Ação conjunta dos componentes da sinalização purinérgica.



Fonte: Adaptado de Junger (2011).

Os sinalizadores extracelulares (especialmente ATP, ADP e Ado) participam de diferentes processos fisiopatológicos como: - estímulo ou inibição da apoptose; - proliferação, migração e diferenciação celular; - secreção de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios. Sendo assim, processos patológicos como o câncer podem ser modulados pelo sistema purinérgico (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

Nesse contexto, muitos estudos demonstram o efeito da sinalização purinérgica sobre o crescimento celular, sendo que o ATP está fortemente envolvido tanto no metabolismo celular do câncer quanto na imunidade antitumoral (DI VIRGÍLIO, 2012).

O ATP pode ser liberado das células por vias específicas e inespecíficas. Uma liberação não regulada ocorre a partir de células mortas e danificadas, enquanto a liberação ativa envolve grânulos exocíticos, microvesículas derivadas da membrana plasmática, transportadores específicos de cassete de ligação ao ATP e canais de membrana, moduladores da homeostase do cálcio 1, canais aniônicos regulados por volume e canais maxi-ânion (VULTAGGIO-POMA; SARTI; DI VIRGILIO, 2020).

Os eventos associados às etapas de proliferação de células tumorais gera um microambiente inflamatório, favorável para a liberação de Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs), visto que na tumorigênese há um processo dinâmico entre proliferação e lesão/destruição celular (DI VIRGILIO; SARTI; COUTINHO, 2020). Um desses DAMPs é o ATP e, assim, nas doenças neoplásicas esse nucleotídeo tem o papel crucial de ativar células inflamatórias, tornando-se um importante componente da sinalização purinérgica envolvido no desenvolvimento e na progressão de neoplasias (DI VIRGÍLIO, 2012).

Durante o processo inflamatório, o ATP exerce uma série de efeitos. Ele está envolvido no desenvolvimento da inflamação por uma combinação de ações como: i) a liberação de histaminas de mastócitos; ii) o aumento da síntese de prostaglandinas e; iii) a produção e liberação de citocinas de células do sistema imune (DI VIRGILIO *et al.*, 1998). A ação do ATP, durante o processo inflamatório, ocorre principalmente via ativação do receptor purinérgico P2X7, provocando apoptose celular e secreção de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo da IL-1 β e da IL-18 (BURNSTOCK, 2002; BULANOVA *et al.*, 2005, PELEGRIN E SURPRENANT, 2009).

Assim, o ATP é um dos principais componentes bioquímicos do microambiente tumoral, podendo favorecer tanto a progressão tumoral quanto a supressão tumoral - dependendo de sua concentração e da ação das ecto-nucleotidases e receptores específicos expressos por células imunes e cancerígenas.

Em relação à Ado, ela é um biomarcador de dano celular que medeia ações anti-inflamatórias, além de ser uma potente molécula imunossupressora. A Ado normalmente está presente em níveis elevados durante o desenvolvimento de tumores, e é capaz de induzir o crescimento e desenvolvimento das células cancerosas através de mecanismos como a indução de angiogênese e do estado imunossuprimido (MALDONADO *et al.*, 2012). Estudos mostram que o acúmulo de Ado contribui para a progressão tumoral e representa um promissor alvo imunoterapêutico, uma vez que já foi demonstrado que este nucleosídeo prejudica a função efetora das células T (MASTELIC-GAVILLET *et al.*, 2019). De modo controverso, a Ado também é conhecida por induzir apoptose e, nesse sentido, a inibição de ADA seria considerada uma estratégia antitumoral (CAMICI *et al.*, 2019).

As moléculas sinalizadoras referidas acima são metabolizadas por enzimas purinérgicas, a exemplo das ectonucleotidases. Aqui podemos citar os membros da família (E-NTPDase1 (CD39), 2, 3 e 8), a CD73 e a ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), que estão localizadas na superfície celular e exibem um sítio catalítico voltado para o espaço extracelular. A enzima CD39 catalisa a hidrólise de ATP e ADP em AMP, que é subsequentemente convertido em Ado pela CD73. Tanto a CD39 quanto a CD73 estão expressas em diferentes células e tecidos, podendo-se destacar a abundante expressão de CD39 nas células endoteliais e nas células musculares lisas, nas células

dendríticas e nos linfócitos (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006), e a CD73 sendo expressa no cólon, rim, cérebro, fígado, coração, pulmão e próstata (MORIWAKI *et al.*, 1999; ZIMMERMANN, 1992, 2006).

A atividade da CD39 em linfócitos é um relevante mediador da progressão tumoral, uma vez que pode desempenhar um papel imunossupressor indireto ao hidrolisar o ATP e ADP, que posteriormente serão convertido em Ado - molécula que induz a progressão de tumores (KÜNZLI *et al.*, 2011; MASSÉ *et al.*, 2015).

Uma análise *in silico* mostrou que diversos tipos de tumor têm uma correlação significativa entre uma pontuação de transição epitelial-mesenquimal e expressões de CD73 e CD39, sendo as correlações mais fortes observadas no adenocarcinoma da próstata (ISER *et al.*, 2022).

Por sua vez, a ectoenzima ADA tem como função promover a desaminação hidrolítica, na superfície celular, da Ado em inosina (ROBSON *et al.*, 2006; YEGUTKIN, 2008). A sua deficiência contribui para o desenvolvimento de patologias, devido ao aumento anormal das concentrações de Ado extracelular (MARTINS *et al.*, 2016).

A ADA desempenha um papel importante na regulação imune, especialmente na proliferação, maturação e diferenciação de linfócitos. Seu papel tem sido estudado nos processos inflamatórios e nas doenças malignas (CHEN *et al.*, 2015), uma vez que alterações na atividade da ADA já foram detectadas em pacientes com vários tipos de câncer (ZHULAI *et al.*, 2022). A baixa atividade da ADA nos linfócitos pode ser responsável pela diminuição da função imunológica celular em pacientes com câncer (CAMICI *et al.*, 2019).

Contrariamente, alguns estudos mostram que a alta atividade da ADA pode ser vantajosa para as células cancerígenas, podendo ser um mecanismo compensatório contra o acúmulo tóxico de seus substratos (CAMICI *et al.*, 2019).

Adicionalmente, a exploração das vias comuns que associam a desregulação dos receptores purinérgicos P2 a doenças urológicas pode, em última análise, auxiliar na obtenção de novas percepções mecanicistas dos processos da doença e do direcionamento terapêutico. Destaca-se, aqui, as evidências convincentes para a exploração de receptores purinérgicos P2 como biomarcadores e alvos terapêuticos em cânceres urológicos e outras doenças desse sistema. Da mesma maneira, atualmente há otimismo para terapias voltadas aos receptor P2 para o tratamento de inflamação e dor relacionadas a doenças urológicas (MAYNARD; SFANOS, 2022).

Nesse sentido, trabalhos demonstraram que o receptor P2X7 é expresso de forma anormal no CP e está relacionado aos níveis de PSA, podendo ser um biomarcador precoce desta doença. Ele é essencial na ocorrência e desenvolvimento desta patologia, influenciando principalmente a invasão e metástase de células cancerígenas por meio de genes relacionados à transição/invasão mesenquimal

epitelial e as vias de sinalização PI3K/AKT e ERK1/2. Por tudo isso, esse receptor pode ser um alvo terapêutico promissor para o CP (QIAO *et al.*, 2022).

Além do P2X7, estudos sugerem que o receptor P2X4 tem um papel fundamental no surgimento do CP e é um candidato terapêutico clinicamente útil, uma vez que inibidores desse receptor já estão disponíveis e têm o potencial de suprimir a progressão da doença (HE *et al.*, 2020). De outro vértice, a ativação do receptor purinérgico P2Y1 induziu a apoptose pela via das Caspases 3/7 e pela via de sinalização das EROs. Desta forma, é evidenciado que os ligantes recentemente sintetizados, como agonistas deste receptor, poderiam potencialmente agir como moléculas antitumorais no tratamento do CP (LE *et al.*, 2019).

Diante do exposto, é de fundamental relevância a pesquisa para compreender o envolvimento da sinalização purinérgica no CP.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), sob protocolo número: 87508918.4.0000.5564.

O presente estudo é caracterizado como quantitativo observacional transversal associado a uma abordagem qualitativa.

Com relação à seleção da amostra, ela foi realizada por conveniência e coletou-se material de 39 pacientes no período de setembro de 2021 a março de 2023. No estudo foi analisada a atividade da NTPDase, para a hidrólise do ATP e ADP, e a atividade da ADA em homens recém diagnosticados com CP, anteriormente ao início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico. O grupo controle foi composto por 37 homens, com idades semelhantes às do grupo investigado e que não apresentavam diagnóstico de CP. Os pacientes foram selecionados a partir de contato prévio dos pesquisadores com o médico cirurgião responsável pela avaliação dos pacientes no Hospital Regional do Oeste (HRO), e os pacientes selecionados foram informados pelos pesquisadores sobre os objetivos da pesquisa e sobre as intervenções que seriam realizadas caso aceitassem participar, assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Após a seleção, pacientes e controles foram contactados pelos pesquisadores para realização de uma única coleta de sangue, no volume de 30 mL, por punção venosa. As análises bioquímicas e moleculares foram realizadas nos laboratórios de pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - *Campus* Chapecó (SC). As informações de prontuário médico foram obtidas nas pastas dos pacientes arquivadas no HRO, e foram utilizadas para complementar as análises biológicas. Estas informações coletadas estão contidas no Apêndice II. A partir dessas análises, foi realizada a comparação dos resultados obtidos entre os grupos e a verificação de alterações nos sistemas biológicos avaliados devido à presença do CP.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.2.1 Coleta das amostras biológicas

Com relação à seleção da amostra, a amostragem foi feita por conveniência e, coletou-se trinta e nove (n= 39) pacientes com diagnóstico de CP, e trinta e sete (n= 37) indivíduos controle, pareados por idade, na cidade de Chapecó (SC), seguindo os critérios de inclusão e de exclusão. Logo após o

diagnóstico, os indivíduos foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo, e foram convidados a participar do mesmo, consentindo, através de assinatura do TCLE, a fornecer as informações dos laudos de exames e biópsias realizadas e dos prontuários médicos. Após, foi realizada coleta de sangue em tubos *vacutainer* com EDTA como anticoagulante (para a separação de linfócitos). A coleta de sangue dos pacientes e controles foi realizada em um único momento, após o resultado da biópsia realizada, e antes do início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico do CP no caso dos pacientes. Os linfócitos foram acondicionadas em microtubo tipo *ependorf*, armazenados em caixas específicas, identificadas e congeladas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as posteriores análises. As informações obtidas a partir dos prontuários médicos foram aquelas em relação à idade, histologia, TNM, graduação histológica (escore de Gleason), níveis séricos de PSA, escore da ISUP, história familiar de câncer e doenças crônicas.

4.2.2 Processamento e separação dos linfócitos

Para o isolamento de linfócitos, as amostras de sangue coletadas com EDTA foram diluídas em volume igual de solução salina. Posteriormente, a amostra diluída foi transferida para um tubo cônico contendo Lymphoprep (Ficoll-Histopaque) e realizou-se centrifugação a 1800 rotações por minuto (rpm), em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após a centrifugação, através da formação de um gradiente de densidade, é possível visualizar uma camada intermediária composta pelas células mononucleares (linfócitos e monócitos) entre as camadas de plasma e Ficoll. Esta nuvem de células foi cuidadosamente removida e transferida para tubo cônico limpo. Às células, foi adicionada solução salina e a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 1800 rpm. Na sequência, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 5 mL de tampão hemolítico aos linfócitos, procedendo nova centrifugação. Novamente o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL de solução salina, homogeneizando o conteúdo e realizando-se nova centrifugação por 5 minutos a 1800 rpm. Após o término desse processo, os linfócitos foram guardados em *ependorfs* contendo 600 μL de solução salina. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até a realização dos experimentos (Leal, 2005).

4.2.3 Dosagem de proteína

A quantificação dos níveis de proteína em amostras de linfócitos em indivíduos controles e pacientes foi dosada pelo método de *Comassie Blue* segundo Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando como padrão a albumina bovina.

4.2.4 Determinação da atividade da E-NTPDase

A atividade da E-NTPDase, em linfócitos, foi realizada segundo Leal e colaboradores (2005). A determinação da atividade da enzima foi realizada pela medida da quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado, usando-se um ensaio colorimétrico. Um volume de 20 uL de amostra de linfócitos foram adicionados a 160 uL do sistema de incubação da NTPDase e pré incubados por 10 minutos a 37 °C. Para a atividade da NTPDase em linfócitos, o sistema de incubação contém NaCl 1200 mM, Glicose 600 mM, KCl 50 mM, tampão de Tris-HCl 500 mM pH 7,4, CaCl₂ 50 mM e H₂O *Milli Q*. A reação foi iniciada pela adição de 20 uL de ATP ou ADP como substrato. A reação da NTPDase foi parada pela adição de 150 µL de ácido tricloroacético (TCA) 15%. O Pi liberado pela hidrólise de ATP e ADP foi dosado pelo método de CHAN e colaboradores (1986). A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 630 nm. Amostras de pacientes e controles foram analisadas em triplicatas. O controle da hidrólise não enzimática foi realizado conforme descrito para as amostras, porém sem adição de enzima. A atividade enzimática foi expressa em nmol Pi liberado/min/mg proteína.

4.2.5 Determinação da atividade da ADA

A atividade da ADA, em linfócitos, foi determinada de acordo com o protocolo já descrito por Giusti e Galanti (1974). A reação colorida, que revela a quantidade de amônia liberada pela ação da enzima, é feita segundo a reação de Chaney e Marbach (1962) que produz uma cor azul. Esta técnica baseia-se na dosagem da amônia liberada pela transformação da Ado em inosina, catalisada pela ADA. A amônia forma, na presença de fenol, em solução alcalina, um derivado indofenol que apresenta coloração azul e pode ser lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes voluntários, com idade acima de quarenta e cinco (45) anos completos, com diagnóstico realizado por médico oncologista ou urologista conforme CID 10 de CP;
- Não ter realizado a remoção cirúrgica do tumor ou iniciado o tratamento farmacológico no momento da participação no estudo;
- Os indivíduos controle selecionados foram voluntários, com idade acima de quarenta e cinco (45) anos completos, que não apresentavam diagnóstico de CP.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes que apresentavam outro diagnóstico de câncer prévio ou atual;
- Indivíduos controle que apresentavam qualquer tipo de câncer.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada com o *software GraphPad Prism* 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, os quais apresentaram distribuição normal. Os *outliers* foram analisados pelo próprio *software* e removidos apenas para a análise das variáveis que se diferenciavam dos demais dados. Sobre as variáveis do estudo, as diferenças entre pacientes com CP e indivíduos controle foram avaliadas pelo teste t de Student e teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. As diferenças entre os subgrupos para as atividades enzimáticas foram avaliadas por meio da análise de variância de um fator (ANOVA One-way). Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos realizados foram submetidos à avaliação pelo CEP da UFFS, de acordo com as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde sobre Pesquisa envolvendo seres humanos.

Para participar do estudo, os indivíduos selecionados concordaram com o exposto no TCLE (APÊNDICE I) fornecido pelos pesquisadores. Todos os participantes da pesquisa foram advertidos acerca dos riscos e benefícios trazidos pela sua participação e pelo procedimento de coleta, sendo que dados pessoais serão mantidos em sigilo e cada indivíduo será identificado por um número distinto. O material coletado ficará em posse do pesquisador responsável e será mantido em armário com cadeado, na sala da pesquisadora, nas dependências da UFFS, ou em freezer no laboratório de pesquisa, o qual apenas os pesquisadores envolvidos têm acesso. Após o período de cinco anos, os arquivos (físicos ou digitais) serão destruídos.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Pela análise do Tabela 1 podemos observar características gerais relacionadas à população amostral tais como idade, estado civil, tabagismo, diagnóstico de Covid-19, comorbidades e histórico de CP em familiares com 1º grau parentesco.

Em relação à idade dos pacientes, a média é de 66 anos, 74,3% são casados e mais de 82% dos pacientes com CP não eram tabagistas. Deste grupo de pacientes, 87,2% não tiveram diagnóstico de Covid-19 e 61,5% não apresentavam DM (Diabetes Mellitus) e nem HAS (Hipertensão Arterial Sistêmica). Outro dado relevante é que a grande maioria (84,6%) dos pacientes não apresentavam histórico de CP em parentes de 1ª grau.

Tabela 1 – Características gerais dos pacientes e controles

Características	Pacientes	Controles	Valor p
Número amostral	39	37	-
Idade			
Média	66	65,81	0,8503
Desvio padrão	±6,72	±10,30	
Estado civil			
Solteiros	6 (15,4%)	4 (10,8%)	
Casados	29 (74,3%)	29 (78,4%)	
Divorciados	2 (5,1%)	1 (2,7%)	
Viúvos	2 (5,1%)	3 (8,1%)	
Tabagismo			
Sim	7 (17,9%)	2 (5,4%)	
Não	32 (82,1%)	35 (94,6%)	
Diagnóstico de Covid-19			
Sim	5 (12,8%)	4 (10,8%)	
Não	34 (87,2%)	33 (89,2%)	
Comorbidades			
Não apresentam DM e HAS	24 (61,5%)	22 (59,5%)	
DM	0 (0%)	0 (0%)	
HAS	11 (28,2%)	13 (35,1%)	
DM e HAS	4 (10,3%)	2 (5,4%)	
Histórico de CP 1º grau de parentesco			
Sim	6 (15,4%)	1 (2,7%)	
Não	33 (84,6%)	36 (97,3%)	

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

A Tabela 2 apresenta as informações a respeito dos níveis séricos de PSA antes do tratamento oncológico, do escore de Gleason, da histologia tumoral, do estadiamento tumoral e do escore da ISUP dos pacientes envolvidos no estudo.

Tabela 2 - Classificação tumoral dos pacientes com CP

	N (%)
PSA pré-tratamento	-
<4 ng/mL	2 (5,1%)
≥4 a ≤10 ng/mL	21 (54%)
>10 a ≤20 ng/mL	14 (35,9%)
> 20 ng/mL	1 (2,5%)
Não consta em prontuário	1 (2,5%)
Graduação histológica (Gleason)	-
Gleason 6	5 (12,9%)
Gleason 7	27 (69,2%)
Gleason 8	4 (10,2%)
Gleason 9	3 (7,7%)
Histologia	-
Adenocarcinoma da próstata	39 (100%)
*TNM	-
T1c	3 (7,7%)
pT2	4 (10,3%)
pT2b	4 (10,3%)
pT2c	9 (23%)
pT3	1 (2,5%)
pT3a	7 (18%)
pT3b	6 (15,4%)
Não consta em prontuário	5 (12,8%)

*Estadiamento clínico	-
T1c	3 (7,7%)
T2	17 (43,6%)
T3	14 (35,9%)
Não consta em prontuário	5 (12,8%)
Escore da ISUP	-
ISUP 1	5 (12,8%)
ISUP 2	19 (48,8%)
ISUP 3	8 (20,5%)
ISUP 4	4 (10,3%)
ISUP 5	3 (7,6%)

*Dados relativos ao envolvimento de linfonodos regionais “N” e a presença de metástases a distância “M” não constavam em prontuário, por esse motivo foi descrito apenas o estadiamento a partir de “T”.

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

Pela análise da Tabela 2 observamos que a maioria dos pacientes participantes do estudo (54%) apresentava níveis séricos de PSA entre ≥ 4 a ≤ 10 ng/mL, antes da intervenção terapêutica. Além disso, a maioria (69,2%) dos pacientes apresentava escore de Gleason 7 e que, em relação ao estadiamento clínico, 43,6% dos pacientes apresentaram classificação T2. Já em relação ao escore da ISUP a maioria (48,8%) apresentava classificação ISUP 2.

5.2 ATIVIDADE DA E-NTPDase E DA ADA

Podemos observar, pela análise da Figura 3, a atividade das enzimas E-NTPDase e da ADA em linfócitos. A Figura 3A representa a atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ATP. Podemos observar que a hidrólise de ATP foi significativamente maior no grupo de pacientes com CP do que no grupo de indivíduos controle ($136,2 \pm 51,27$ vs. $229,2 \pm 105,97$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controles e pacientes, respectivamente), valor de $p=0,0001$. A Figura 3B representa a atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ADP. É possível observar que a hidrólise de ADP foi estatisticamente menor no grupo de pacientes com CP do que no grupo de indivíduos controle ($124,8 \pm 50,46$ vs. $60,81 \pm 75,85$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controles e pacientes, respectivamente), valor de $p=0,0001$. A Figura 3C representa a atividade da ADA. Pela análise dessa figura observamos que a atividade da ADA foi significativamente menor no grupo com CP quando comparado com o grupo controle ($190,8 \pm 104,5$ vs. $105,5 \pm 35,70$ U/mg de proteína, em controles e pacientes, respectivamente), valor de $p=0,0001$.

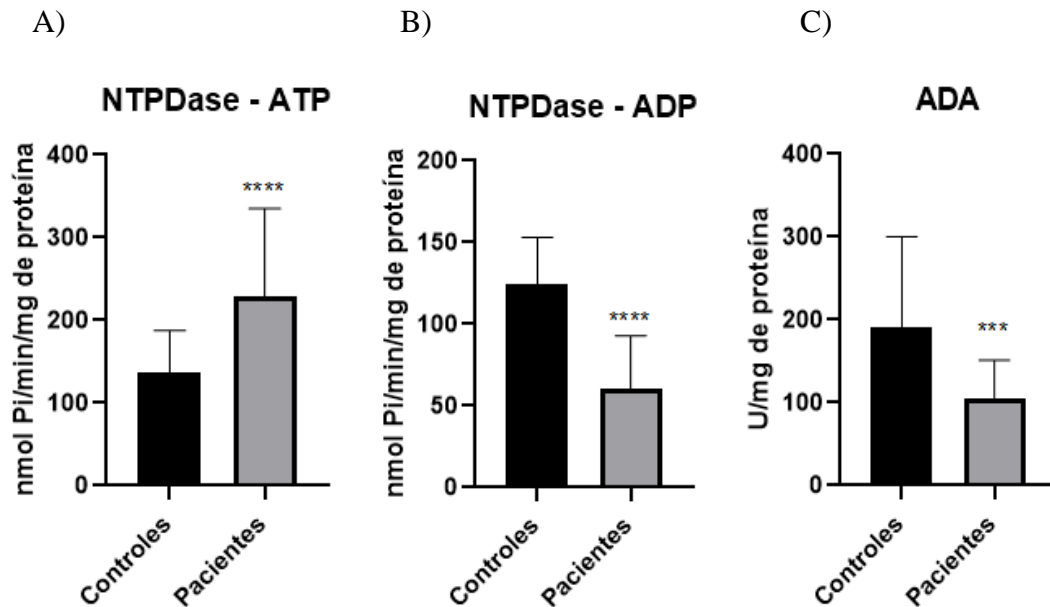


Figura 3 - Atividade das enzimas E-NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com CP. A) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ATP. B) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ADP. C) A atividade da ADA. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n= 37) para controles e (n= 39) para pacientes. *** $p \leq 0.0005$ **** $p \leq 0.00005$.

A Figura 4 apresenta os valores da atividade da E-NTPDase e da ADA, em linfócitos, de acordo com os níveis de PSA séricos. Destaca-se que o grupo controle, com base nos valores de referência da literatura, foi considerado como apresentando níveis séricos de PSA $< 4,0$ ng/mL. Pela análise da Figura 4A podemos observar que a hidrólise de ATP aumentou significativamente com o aumento dos níveis séricos de PSA (controle: $20,7,6 \pm 99,28$ nmol Pi/min/mg de proteína; PSA < 10 : $136 \pm 47,27$ nmol Pi/min/mg de proteína, valor de $p=0,0037$; PSA ≥ 10 : $251,5 \pm 6,07$ nmol Pi/min/mg de proteína), valor de $p=0,0001$. Pela análise da Figura 4B observamos que a hidrólise de ADP foi estatisticamente menor em pacientes com CP em relação ao grupo controle (controle: $124,8 \pm 50,46$ nmol Pi/min/mg de proteína; PSA < 10 : $61,14 \pm 75,85$ nmol Pi/min/mg de proteína; PSA ≥ 10 : $61,01 \pm 70,18$ nmol Pi/min/mg de proteína), valor de $p=0,0001$. Através da análise da Figura 4C é possível observar que a atividade da ADA diminuiu significativamente com o aumento dos níveis séricos de PSA (controle: $190,8 \pm 104,5$ U/mg de proteína; PSA < 10 : $109,1 \pm 83,42$ U/mg de proteína, valor de $p=0,0104$; PSA ≥ 10 : $105,1 \pm 15,59$ U/mg de proteína), valor de $p=0,0086$.

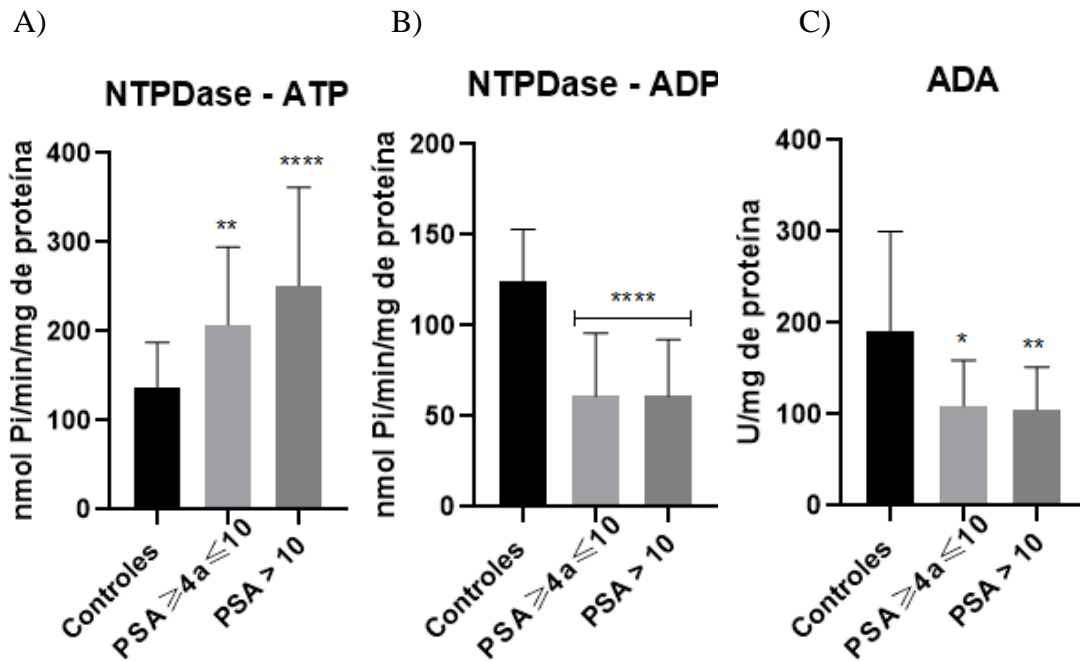


Figura 4 - Atividade das enzimas E-NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com CP e em controles de acordo com os níveis séricos de PSA. A) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ATP. B) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ADP. C) A atividade da ADA. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n= 37) para controles e (n= 39) para pacientes. * p < 0,05) **p < 0,005 ****p \leq 0.00005

A Figura 5 apresenta os valores da atividade da E-NTPDase e da ADA, em linfócitos, de acordo com o escore de Gleason. Pela observação da Figura 5A é possível notar que a hidrólise do ATP foi significativamente maior em pacientes com escore de Gleason maior ou igual a 7. Entre o grupo controle e o escore de Gleason < 7 não houve diferença estatisticamente significativa (136,2 \pm 47,27 vs. 186,7 \pm 41,65 nmol Pi/min/mg de proteína, em controles e escore de Gleason < 7, respectivamente), valor de p=0,5664. Já entre o grupo controle e escore de Gleason 7 e escore de Gleason > 7 houve diferença estatisticamente significativa (controle: 136,2 \pm 47,27 nmol Pi/min/mg de proteína; escore de Gleason 7: 234,1 \pm 107,32 nmol Pi/min/mg de proteína; escore de Gleason > 7: 247 \pm 91,81 nmol Pi/min/mg de proteína), valor de p=0,0001. Pela análise da Figura 5B é possível observar que a hidrólise de ADP foi significativamente menor em pacientes com CP quando comparado com o grupo controle. Observamos que houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos com CP, independentemente do valor de escore de Gleason. Escore de Gleason 7: 64,55 \pm 42,80 nmol Pi/min/mg de proteína, valor de p=0,0034; escore de Gleason 7: 52,94 \pm 33,91 nmol Pi/min/mg de proteína, valor de p= 0,00001; escore de Gleason > 7: 63,60 \pm 30,76 nmol Pi/min/mg de proteína), valor de p=0,0012. Analisando-se a Figura 5C observamos que a atividade da ADA foi estatisticamente menor apenas no grupo de pacientes com escore de Gleason 7 (189 \pm 138,04 vs. 102,9 \pm 42,25 U/mg de proteína, em controles e escore de Gleason 7, respectivamente), valor de p=0,0171. Já entre o grupo

controle e o escore de Gleason < 7 e escore de Gleason > 7 não houve diferença estatisticamente significativa (controle: $189 \pm 138,04$ U/mg de proteína; Gleason < 7: $73,70 \pm 15,36$ U/mg de proteína, valor de $p = 0,3647$; escore de Gleason > 7: $108,1 \pm 16,56$ U/mg de proteína), valor de $p = 0,3955$.

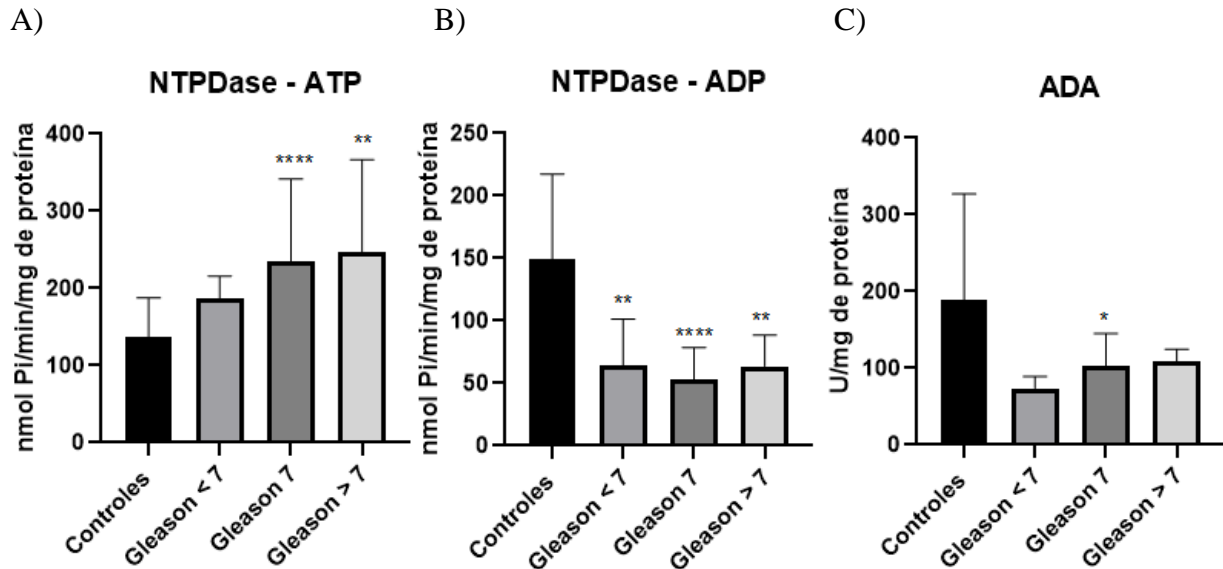


Figura 5 - Atividade das enzimas E-NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com CP de acordo com o escore de Gleason e em controles. A) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ATP. B) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ADP. C) A atividade da ADA. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 37$) para controles e ($n = 39$) para pacientes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$ **** $p \leq 0,00005$

Na Figura 6 está representada a atividade da E-NTPDase e da ADA, em linfócitos, de acordo com o estadiamento clínico dos pacientes. Pela análise da Figura 6A observamos que a hidrólise de ATP foi significativamente maior em pacientes com CP com estadiamento clínico T2 e T3 em comparação com o grupo controle (controle: $136,2 \pm 47,27$ nmol Pi/min/mg de proteína; T2: $228,2 \pm 99,28$ nmol Pi/min/mg de proteína, valor de $p = 0,0004$. T3: $238,6 \pm 18,59$ nmol Pi/min/mg de proteína, valor de $p = 0,0003$). Entre o grupo controle e o estadiamento clínico T1 não houve diferença estatisticamente significativa ($136,2 \pm 47,27$ vs. $225,1 \pm 94,74$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controles e grupo T1, respectivamente), valor de $p = 0,1601$. Pela avaliação da Figura 6B é possível observar que a hidrólise de ADP foi significativamente diminuída em pacientes com CP com estadiamento clínico T2 e T3 em comparação com o grupo controle (controle: $124,8 \pm 50,46$ nmol Pi/min/mg de proteína; T2: $52,02 \pm 33,91$ nmol Pi/min/mg de proteína, valor de $p = 0,0001$; T3: $60,53 \pm 34,91$ nmol Pi/min/mg de proteína, valor de $p = 0,0001$). Entre o grupo controle e o estadiamento clínico T1 não houve diferença estatisticamente significativa para a hidrólise de ADP ($124,8 \pm 50,46$ vs. $95,12 \pm 7,36$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controles e grupo T1, respectivamente), valor de $p = 0,3557$. Pela análise da Figura 6C podemos observar que a atividade da ADA foi estatisticamente menor em pacientes com CP

com estadiamento clínico T2 e T3 em comparação com o grupo controle (controle: $190,8 \pm 104,50$ U/mg de proteína; T2: $111,2 \pm 20,50$ U/mg de proteína, valor de $p=0,0303$; T3: $109,3 \pm 52,99$ U/mg de proteína, valor de $p=0,0397$). Entre o grupo controle e o estadiamento clínico T1 não houve diferença estatisticamente significativa ($190,8 \pm 104,50$ vs. $73,70 \pm 15,36$ U/mg de proteína, em controles e grupo T1, respectivamente), valor de $p=0,1877$.

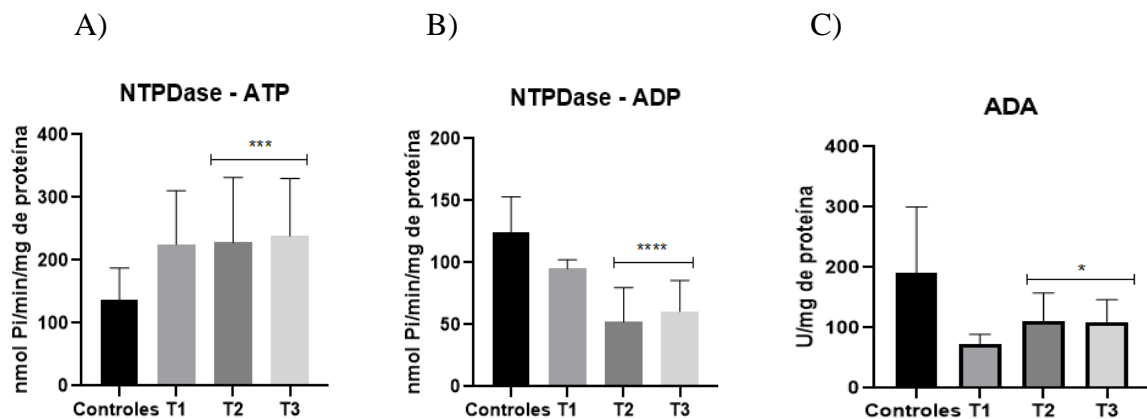


Figura 6 - Atividade das enzimas E-NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com CP de acordo com o estadiamento clínico e em controles. A) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ATP. B) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ADP. C) A atividade da ADA. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n=37$) para controles e ($n=39$) para pacientes. * $p < 0,05$ *** $p < 0,0005$ **** $p \leq 0,00005$

A Figura 7 mostra a atividade da E-NTPDase e da ADA, em linfócitos, de acordo com o ISUP dos pacientes e em controles. Pela análise da Figura 7A podemos observar que entre o grupo controle e o grupo de pacientes com ISUP 1 não houve diferença estatisticamente significativa para a hidrólise de ATP ($136,2 \pm 47,27$ vs. $214 \pm 41,65$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controles e grupo ISUP 1, respectivamente, valor de $p=0,2200$). Já entre o grupo controle e o ISUP 2, ISUP 3 e ISUP 3 e 4 houve um aumento significativo para a hidrólise de ATP (controle: $136,2 \pm 47,27$ Pi/min/mg de proteína; ISUP 2: $224,5 \pm 99,28$ Pi/min/mg de proteína, valor de $p=0,0024$; ISUP 3: $234,3 \pm 155,74$ Pi/min/mg de proteína, valor de $p=0,0192$; ISUP 4 e 5: $247 \pm 119,7$ Pi/min/mg de proteína, valor de $p=0,0108$). Pela observação da Figura 7B é possível perceber uma diminuição significativa da hidrólise do ADP para todos os ISUP quando comparado com o grupo controle (controle: $124,8 \pm 50,46$ nmol Pi/min/mg de proteína; ISUP 1: $64,55 \pm 42,80$ nmol Pi/min/mg de proteína, valor de $p=0,0005$; ISUP 2: $51,26 \pm 75,85$ nmol Pi/min/mg de proteína, valor de $p=0,0001$; ISUP 3: $67,14 \pm 5,74$ nmol Pi/min/mg de proteína, valor de $p=0,0001$; ISUP 4 e 5: $74,07 \pm 35,85$ nmol Pi/min/mg de proteína, valor de $p=0,0007$). Pela análise da Figura 7C observamos uma diminuição estatisticamente significativa apenas em pacientes

com ISUP 2 comparado com o grupo controle (controle: $190,8 \pm 104,5$ U/mg de proteína; ISUP 2: $102,6 \pm 35,70$ U/mg de proteína, valor de $p=0,0068$).

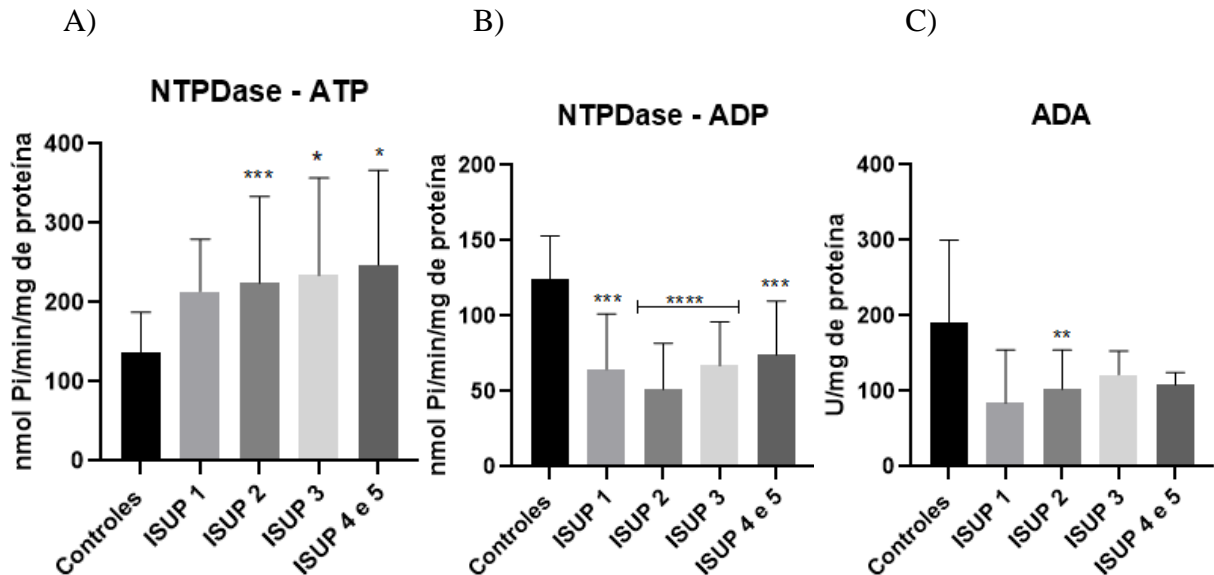


Figura 7 - Atividade das enzimas E-NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com CP de acordo com a escala da ISUP e em controles. A) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ATP. B) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ADP. C) A atividade da ADA. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n=37$) para controles e ($n=39$) para pacientes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$ **** $p \leq 0,00005$

6 DISCUSSÃO

O CP é, mundialmente, o segundo tipo de câncer mais diagnosticado e a causa mais frequente de mortes relacionadas ao câncer em homens. O CP hereditário tem a maior herdabilidade de todos os tipos de câncer grave em homens, visto que a proporção de CP atribuível a fatores hereditários foi estimada na faixa de 5-15% (VIETRI *et al.*, 2021). Vinte por cento de todos os pacientes com CP têm história familiar positiva (pelo menos 1 parente de primeiro grau com CP) e uma parcela destes pacientes tem predisposição genética (MEISSNER; JAHNEN; HERKOMMER, 2021). Além do histórico familiar e das síndromes hereditárias, os aspectos étnicos também são fortes fatores de risco para o CP. Em nosso estudo verificamos que somente 15,4% dos pacientes possuem histórico de CP em 1º grau de parentesco.

Assim como em nosso estudo em que a média de idade dos pacientes foi de 66 anos, outros estudos como o realizado por Gardani e colaboradores (2019), também observaram que os indivíduos na sexta década de vida são os mais acometidos pelo CP. Além disso, dados da OMS mostram que essa é a faixa etária de maior incidência para esse tipo tumoral.

Na metanálise de Guo e colaboradores (2020) realizada com um total de 11 estudos observacionais compreendendo 1.457.799 pacientes diagnosticados com CP, os resultados indicaram que o estado civil de solteiro (separado, divorciado, viúvo ou nunca casado) foi associado a um risco elevado de mortalidade por todas as causas, em comparação com o estado de casado, particularmente para pacientes divorciados e nunca casados. Em nossa pesquisa identificamos que a maioria dos pacientes com CP, 29 (74,3%) são casados, 6 (15,4%) são solteiros, 2 (5,1%) separados e igualmente para viúvos.

Ademais, verificamos em nosso estudo que 17,9% dos pacientes eram tabagistas. Nesse sentido, a literatura tem descrito que o tabagismo e a obesidade podem elevar à mortalidade, enquanto que a atividade física regular é capaz de reduzir a progressão da doença (GANDAGLIA *et al.*, 2021). O consumo de álcool, o tabagismo, a ingestão de carne vermelha e índice de massa corpórea (IMC) ≥ 25 -30 kg/m² revelaram uma tendência de aumento do risco do desenvolvimento do CP (CIRNE *et al.*, 2022). Paralelamente, a síndrome metabólica foi associada ao risco de desenvolver CP de alto grau (GANDAGLIA *et al.*, 2021).

Os autores Macke e Petrosyan (2022) referem que o consumo excessivo de álcool, está relacionado ao aumento do risco de CP e também está diretamente ligado à letalidade desta patologia, pois pode acelerar o crescimento de tumores de próstata e reduzir significativamente o tempo de progressão para CP metastático. Neste sentido, Oczkowski e colaboradores (2021) afirmam que o

consumo de certos nutrientes (ácidos graxos saturados e trans) e produtos alimentícios (por exemplo, produtos de carne processada) leva à interrupção da regulação hormonal da próstata, indução de estresse oxidativo e inflamação e alteração da sinalização do fator de crescimento e metabolismo lipídico, que contribuem para a carcinogênese da próstata. Estas condições podem estar associadas ao desenvolvimento de CP na nossa população estudada.

Brito-Dellan, Tsoukalas e Font (2022) referem que o câncer e a doença de coronavírus 2019 (COVID-19) têm semelhanças incomuns: ambos resultam em um risco acentuadamente elevado de trombose, níveis excepcionalmente altos de dímero D e falha da terapia de anticoagulação em alguns casos. Pacientes com câncer são mais vulneráveis à infecção por COVID-19 e têm uma taxa de mortalidade mais alta. Em nosso estudo, apenas 5 (12,8%) dos pacientes tiveram diagnóstico de COVID-19.

No que diz respeito à atividade da E-NTPDase e da ADA em linfócitos, nossos resultados demonstraram um aumento na atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ATP, uma diminuição na hidrólise do ADP e diminuição na atividade da ADA em pacientes com CP.

É extensamente referido na literatura que os nucleotídeos, especialmente o ATP, atuam como moléculas sinalizadoras endógenas de injúrias, desencadeando uma resposta do sistema imune (ZHANG; MOSSER, 2008). Estudos revelam que o ATP está envolvido em diversas funções no sistema imune: em células T, o ATP é capaz de mediar a resposta imune atuando como um agente pró-inflamatório, porque estimula a proliferação de linfócitos e potencializa a liberação de citocinas, como a IL-2 e o IFN- γ (LANGSTON et al., 2003; BOURS et al., 2006); nos monócitos circulantes, o ATP está envolvido no recrutamento destes para os tecidos alvo (VENTURA; THOMOPOULOS, 1995); nas células dendríticas, o ATP induz migração e diferenciação (LA SALA et al., 2003); nos macrófagos, estimula a produção de IL-1 β (ELSSNER et al., 2004) e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (GUERRA et al., 2003).

No processo de desenvolvimento e progressão tumoral do CP, há notavelmente um favorecimento da injúria e lesão de células prostáticas, colaborando para a liberação de grandes quantidades de ATP para o meio extracelular - as quais propiciarão o desenvolvimento de um microambiente pró-inflamatório, que é amplificado a medida que a progressão tumoral se estabelece. É evidente, também, que a maior disponibilidade de ATP extracelular favorece a atividade máxima da E-NTPDase, haja vista a presença de substrato em elevadas concentrações. Resultados similares foram observados em estudos realizados em pacientes com câncer de mama e em pacientes com neoplasia de colo uterino (ARAÚJO et al., 2005; MALDONADO et al., 2010), reforçando a relação entre o desenvolvimento de doenças neoplásicas e as alterações nas atividades das enzimas do sistema purinérgico.

A E-NTPDase apresenta-se como uma enzima indispensável na vasculatura e na superfície das plaquetas, pois limita eventos trombóticos e preserva as propriedades antitrombóticas do endotélio (MORELLO *et al.*, 2021). Em nossa pesquisa, verificamos que a atividade da E-NTPDase em linfócitos, para a hidrólise do ADP, está significativamente diminuída no grupo de pacientes com CP em relação ao grupo controle.

O aumento na hidrólise do ATP pela E-NTPDase promove a formação de ADP, que apresenta proeminente atividade pró-agregante. O estímulo das plaquetas pelo ADP leva a mudanças no formato, na agregação e na geração de TxA₂, sendo que a co-estimulação de receptores P2Y1 e P2Y12 é requerida para a indução da agregação plaquetária por esse nucleotídeo (KAHNER *et al.*, 2006). Adicionalmente, o estímulo do receptor P2X1 pelo ATP está envolvido na mudança do formato das plaquetas e ajuda a ampliar as respostas mediadas por outros agonistas (KAHNER *et al.*, 2006). A ligação do ADP nos receptores P2Y1 gera a ativação da fosfolipase A2 que ativa a geração de TxA₂. Tanto a ativação dos receptores P2Y1 quanto a ligação do ATP nos receptores P2X (principalmente o P2X1) gera mobilização e influxo de Ca²⁺, culminando em mudança no formato das plaquetas. Em conjunto, todos esses fatores levam à ativação plaquetária e à estabilização de agregados plaquetários já existentes e, frente ao exposto, podemos sugerir que os pacientes com CP envolvidos neste estudo podem estar mais suscetíveis ao desenvolvimento de processos trombóticos.

Considerando-se as propriedades pró-carcinogênicas exercidas pela Ado - entre as quais destacam-se as funções promotoras de crescimento tumoral, de estímulo à angiogênese e de redução da hipóxia tecidual, através de sua atividade vasodilatadora - (RATHBONE, 1992; SPYCHALA, 2000; GESSI; VARANI; MERIGUI, 2007), essa molécula tornou-se um importante alvo terapêutico para o câncer (LOSENKOVA *et al.*, 2020).

Em nosso estudo, observamos uma diminuição na atividade da ADA em linfócitos de pacientes com CP, fenômeno que promove um aumento dos níveis de Ado. Outros estudos, como o desenvolvido por Zanini *et al.* (2019) em pacientes com câncer de pulmão, também mostraram que a atividade da ADA estava diminuída em eritrócitos e linfócitos, propondo que o acúmulo de Ado no meio extracelular poderia favorecer a progressão do tumor. No trabalho de Mânica e colaboradores (2018) em pacientes com melanoma, os mesmos referem sabendo que a imunossupressão está intimamente relacionado ao desenvolvimento de metástases linfáticas em pacientes com melanoma, o aumento da atividade da ADA pode estar associado a processos malignos mesmo após a remoção cirúrgica do tumor. Ainda, os autores Wang, Du e Chen (2022) referem que, em geral, no contexto do câncer, o acúmulo de Ado extracelular inibe a função normal das células imunes efetoras e facilita o efeito das células imunossupressoras para propiciar a proliferação e migração de células malignas.

Em relação aos biomarcadores do CP, o PSA é o primeiro filtro no diagnóstico dessa

neoplasia, de acordo com Maestroni *et al.* (2022). Kohaar, Petrovich e Srivastava (2019) afirmam que a detecção precoce do CP é amplamente determinada pelo PSA, o qual é grandemente utilizado.

No que tange à hidrólise de ATP, ADP e à atividade da ADA, quando os pacientes com CP foram alocados em subgrupos de acordo com os níveis séricos de PSA, identificamos que os valores de PSA parecem causar significativa alteração dessa via de sinalização - hidrólise de ATP, ADP e atividade da ADA. Aparentemente, quando os níveis de PSA apresentam-se fortemente alterados (>10ng/mL) é possível associar esses valores com uma maior destruição/lesão celular e uma significativa imunossupressão dos pacientes com CP.

Uma vez que o PSA é liberado por células prostáticas e, em condições tumorais, há uma expansão clonal dessas células, pressupõe-se um aumento nos níveis séricos de PSA de acordo com o tamanho da massa tumoral no CP. Como é referido na literatura, as células de tumores sólidos estão expostas a um ambiente hipóxico, o qual favorece os processos de lesão e lise celular. Esses eventos colaboram para a externalização de moléculas para o meio extracelular, como é o caso do ATP, colaborando para o aumento dos níveis séricos desse nucleotídeo. Assim, o aumento da atividade da E-NTPDase, para a hidrólise de ATP, observada em nosso trabalho pode estar diretamente associada à maior disponibilidade de seu substrato nos pacientes com CP. Assim, a hidrólise do ATP parece estar diretamente associada aos níveis de PSA.

Conforme afirmado pelo autor Egevad e colaboradores (2019), a graduação histológica do CP é um dos parâmetros teciduais mais importantes para prever o resultado e a resposta ao tratamento. E, nesse sentido, o escore de Gleason continua sendo a base da classificação do CP. Tagai e colaboradores (2019) referem que essa classificação é um componente chave do diagnóstico do CP, pois indica a agressividade da doença. Além disso, GEYBELS e colaboradores (2016) afirmam que este escore é o melhor preditor de prognóstico dos tumores prostáticos.

Em nosso trabalho, mais de 69% dos pacientes apresentavam classificação em escore de Gleason 7. Observamos que quanto maior o escore de Gleason, maior era a hidrólise de ATP e menor era a hidrólise de ADP e a atividade da ADA. Como esse escore está associado com a agressividade da doença, podemos sugerir que indivíduos com escores mais altos apresentam uma maior disponibilidade de ATP extracelular - proveniente dos processos de destruição das células tumorais em hipóxia, uma maior disponibilidade de ADP - que favorece a formação de trombos venosos, e uma imunodeficiência ocasionada pelo incremento dos níveis séricos de Ado.

Corroborando com nossos resultados, o trabalho desenvolvido por Battisti e colaboradores (2013), evidenciou uma diminuição na atividade da ADA em plaquetas e soro no grupo de pacientes com CP com escore de Gleason maior que 7.

Fica claro em nosso trabalho que as atividades da NTPDase e da ADA também sofrem

influência do estadiamento clínico, especialmente nas classificações de T2 e T3. Identificamos em nosso trabalho que há uma associação direta entre o aumento do tamanho do tumor, a maior hidrólise de ATP e a diminuição da atividade da ADA. Nesse mesmo sentido, Mandapathil e colaboradores (2018) identificaram que a expressão de CD39 em carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço correlacionou-se positivamente com o estágio do tumor e parece predizer mau prognóstico.

Adicionalmente, corroborando com nossos achados, Battisti e colaboradores (2013) afirmam que, quando os pacientes foram subdivididos considerando a presença ou ausência da metástase, observou-se redução da atividade da ADA apenas nos pacientes com metástase. Esses resultados são interessantes e asseguram a ideia de que a Ado pode estar envolvida nos processos de progressão tumoral e na formação de metástase. Em nosso trabalho, cabe ressaltar que dados relativos ao envolvimento de linfonodos regionais e metástases a distância não constam em prontuário e os pacientes não haviam realizado a remoção cirúrgica do tumor nem iniciado tratamento farmacológico no momento da participação no estudo.

Em relação à escala da ISUP, foi possível observar que parece haver um aumento na hidrólise do ATP e uma diminuição na hidrólise do ADP quanto maior o valor da escala. Podemos sugerir que maiores valores para a escala da ISUP estão associados a um pior prognóstico, observando-se as ações do ATP, ADP e Ado nessa via de sinalização pró-tumorigênica.

Ante o exposto, a análise desses resultados, em conjunto, apresenta grande relevância para o contexto médico e de saúde pública, visto que medidas preventivas e paliativas podem ser adotadas de maneiras mais eficientes, a fim de que os pacientes com diagnóstico de CP possam apresentar uma melhor qualidade de vida e um prolongamento da sobrevida.

7 CONCLUSÃO

Pela primeira vez foi possível relacionar a atividade da E-NTPDase e da ADA com os níveis séricos de PSA, o escore de Gleason, o estadiamento tumoral e os valores de ISUP em pacientes com CP. Notavelmente, a aumento dos níveis séricos de PSA, do escore de Gleason, do estadiamento tumoral e da escala de ISUP parecem estar diretamente associados com um aumento da atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ATP, possivelmente porque todos estão correlacionados com o tamanho, progressão e invasividade tumoral. Assim, sabendo-se que o processo carcinogênico envolve eventos relacionados à lesão celular e apoptose, maiores quantidades de ATP são liberadas para o meio extracelular, aumentando a disponibilidade desse substrato para a NTPDase e, conseqüentemente, a sua atividade. Já, a diminuição da atividade da NTPDase para a hidrólise de ADP favorece a disponibilidade biológica dessa molécula, que apresenta potente atividade pró-coagulante, fato que facilitaria a ocorrência de processos trombóticos nos pacientes com CP mais avançado.

Nesse mesmo sentido, a menor atividade da ADA nos pacientes com CP mais avançado promove o acúmulo de Ado no organismo, a qual pode comprometer a vigilância imune frente ao desenvolvimento tumoral, uma vez que se conhece a ação imunossupressora dessa molécula, colaborando para a progressão do CP.

Em tempo, experimentos adicionais sobre a expressão de receptores e análises no tecido tumoral são necessários para corroborar com os resultados encontrados no presente estudo, a fim de que a modulação da sinalização purinérgica possa integrar a base de novos fármacos e protocolos terapêuticos eficientes no controle do desenvolvimento e da progressão do CP.

REFERÊNCIAS

- ACHARD, V. et al. Localized and Locally Advanced Prostate Cancer: Treatment Options. **Oncology**, v. 99, n. 7, p. 413-421, mar. 2021.
- ALIAGAS, E. et al. High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. **Mediators Inflammation**, v. 2014, feb. 2014.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Facts & Figures**. 2019.
- ARAÚJO, M. C.; ROCHA, J. B. T.; MORSCH, A. Enzymes that hydrolyze nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1740; p. 421– 426, 2005.
- BATTISTI, V. et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 3, p. 203-208, 2013.
- BEKELMAN, J. E. et al. Clinically Localized Prostate Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of an American Urological Association/American Society for Radiation Oncology/Society of Urologic Oncology Guideline. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, set. 2018.
- BIRI, H. et al. Activities of DNA Turnover and Free Radical Metabolizing Enzymes in Cancerous Human Prostate Tissue. **Cancer Investigation**, v. 17, n. 5, p. 314-319, 1999.
- BOERRIGTER, E. et al. Clinical utility of emerging biomarkers in prostate cancer liquid biopsies. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 20, n. 2, p. 219-230, feb. 2020.
- BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, mai. 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Adenocarcinoma de Próstata. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS**. Brasília, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Anais do IV congresso nacional de oncologia da associação presente de apoio a pacientes com câncer “padre tiaozinho”. **Revista Brasileira de Cancerologia**. Rio de Janeiro, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Deteção precoce do Câncer**. Rio de Janeiro, 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes Da Silva. **Estimativa 2023. Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes Da Silva. **Deteção precoce do Câncer**. Rio de Janeiro, 2021.
- BRAVACCINI, S. et al. PSMA expression: a potential ally for the pathologist in prostate cancer diagnosis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4254, 9 mar. 2018.

- BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BRITO-DELLAN, N; TSOUKALAS, N; FONT, C. Thrombosis, cancer, and COVID-19. **Support Care Cancer**, v. 30, n. 10, p. 8491-8500, oct. 2022.
- BULANOVA, E. et al. Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. **Journal immunology**, v. 174, n. 7, p. 3880-3890. 2005.
- BURNSTOCK, G; DI VIRGILIO, F. Purinergic signaling and cancer. **Purinergic Signalling**, v. 9, n. 4, p. 491-540, 2013.
- BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, p. 364-373. 2002.
- CAMICI, M. et al. Purine-Metabolising Enzymes and Apoptosis in Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 9, sep. 2019.
- CHEN, Q. et al. CD73 acts as a prognostic biomarker and promotes progression and immune escape in pancreatic cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 15, p. 8674-8686. 2020.
- CHEN, W. et al. Elevated serum adenosine deaminase levels in secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 37, n. 4, p. 540-550, aug. 2015.
- CIRNE, F, et al. Modifiable risk factors for prostate cancer in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **Prostate Cancer Prostatic Diseases**, v. 25, n. 3, p. 453-462, sep. 2022.
- COLEY, C. M. et al. Early detection of prostate cancer. Part I: Prior probability and effectiveness of tests. The American College of Physicians. **Annals of Internal Medicine**, v. 126, n. 5, p. 394-406, mar. 1997.
- COLLIN, S. M. et al. Associations of sexual dysfunction symptoms with PSA-detected localised and advanced prostate cancer: a case-control study nested within the UK population-based ProtecT (Prostate testing for cancer and Treatment) study. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 45, n. 18, p. 3254-3261, dec. 2009.
- COSTELLO, A, J. Considering the role of radical prostatectomy in 21st century prostate cancer care. **Nature Reviews Urology**, v. 17, n. 3, p. 177-188, mar. 2020.
- COZAR, J, M. et al. The role of prostate-specific antigen in light of new scientific evidence: An update in 2020. **Actas Urologicas Espanolas**, v. 45, n. 1, p. 21-29, feb. 2020.
- COWELL, L, G. The Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Potential of Adaptive Immune Receptor Repertoire Profiling in Cancer. **Cancer Research**, v. 80, n. 4, p. 643-654, feb. 2020.
- DEAGLIO, Silvia; ROBSON, Simon C. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. **Advances in Pharmacology**, v. 61, p. 301-332, 2011.
- DI VIRGILIO, F; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, p. 1-11, 2017.

DI VIRGILIO, F. et al. P2 receptors in cancer progression and metastatic spreading. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 29, p. 17-25, aug. 2016.

DI VIRGILIO, F. et al. Purinergic P2X7 receptor: apivotal role in inflammation and immunomodulation. **Drug Development Research**, v. 45, p. 207-213. 1998.

DI VIRGILIO, F. Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5441-5447, 2012.

DI VIRGILIO, F; SARTI, A, C; COUTINHO-SILVA, R. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 318, n. 5, p. C832-C835, 2020.

DI VIRGILIO, F; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 191, p. 117–123, 2015.

EGEVAD, L. et al. Evolution, controversies and the future of prostate cancer grading. **Pathology International**, v. 69, n. 2, p. 55-66, feb. 2019.

ELSSNER, Andreas et al. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 β processing and release. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 8, p. 4987-4994, 2004.

GHADERI, B. et al. Adenosine Deaminase Activity in Chronic Lymphocytic Leukemia and Healthy Subjects. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 9, n. 13, june. 2016.

GANDAGLIA, G. et al. Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer. **European Urology Oncology**, v. 4, n. 6, p. 877-892, dec. 2021.

GARDANI, C, F, F. et al. Hydrolysis of ATP, ADP, and AMP is increased in blood plasma of prostate cancer patients. **Purinergic Signalling**, v. 15, n. 1, p. 95-105, mar, 2019.

GESSI, S. et al. Elevated expression of A3 adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 17, p. 5895-5901, 2004.

GESSI, Stefania et al. Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A3 adenosine subtype. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, n. 3, p. 826-836, 2007.

GEYBELS, M, S. et al. Epigenetic signature of Gleason score and prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. **Clinical epigenetics**, v. 8, n. 97, sep. 2016.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. de M.; MENDONÇA, G. A. S. Riscos de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GUO, Z. et al. Association between Marital Status and Prognosis in Patients with Prostate Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. **Urology Journal**, v. 18, n. 4, p. 371-379, nov. 2020.

HE, J. et al. Inhibiting the P2X4 Receptor Suppresses Prostate Cancer Growth In Vitro and In Vivo, Suggesting a Potential Clinical Target. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2511, nov. 2020.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. IARC – **Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, males, all ages**. GLOBOCAN, 2023.

ISER, I, C. et al. The crossroads of adenosinergic pathway and epithelial-mesenchymal plasticity in

câncer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 82, n. 2, p. 202-213, nov. 2022.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews – Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201-212, mar. 2011.

KAHNER, B. N. et al. Nucleotide receptor signaling in platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 11, p. 2317-2326, 2006.

KOHAAR, I. et al. A Rich Array of Prostate Cancer Molecular Biomarkers: Opportunities and Challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1813-1831, apr. 2019.

KUNZLI, B. M. et al. Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 2, p. 231-241, jun. 2011.

LANGSTON, H. et al. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 2962-2970, 2003.

LA SALA, Andrea et al. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 3, p. 339-343, 2003.

LEAL, D.B. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ectodiphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p.9-15, 2005.

LE, H. T. T. et al. Synthesis and preclinical validation of novel P2Y1 receptor ligands as a potent anti-prostate cancer agente. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18938, dec. 2019.

LOSENKOVA, K. et al. Compartmentalization of adenosine metabolism in cancer cells and its modulation during acute hypoxia. **Journal of Cell Science**, v. 133, n. 10, may. 2020.

LUNKES, G, I. et al. Effect of high glucose levels in human platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 81, n. 3, p. 351-357, 2008.

LUNKES, G, I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 15, n. 109, p. 189-94, 2003.

LU, X. et al. Ultrasonographic pathological grading of prostate cancer using automatic region-based Gleason grading network. **Computerized Medical Imaging and Graphics**, v. 102, n. 7, p. 102-125, dec. 2022.

MACKE, A, J; PETROSYAN, A. Alcohol and Prostate Cancer: Time to Draw Conclusions. **Biomolecules**, v. 12, n. 3, feb. 2022.

MAESTRONI, U. et al. PSA-IgM and iXip in the diagnosis and management of prostate cancer: clinical relevance and future potential. A review. **Acta Biomedica Atenei Parmensis - Mattioli Journals**, v. 92, n. 6, jan. 2022.

MALDONADO, P, A. et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 400-406, 2008.

MALDONADO, P, A. et al. Nucleotide degrading enzymes in platelets from uterine cervical neoplasia patients treated with conization or radiotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64,

n. 7, p. 499-504, 2010.

MALDONADO, P. A; PIMENTEL, V. C.; NEGRINI, L. A. et al. Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amsterdã, v. 66, n. 1, p. 6–11, feb. 2012.

MANDAPATHIL, M. et al. Ectonucleotidase CD39 expression in regional metastases in head and neck cancer. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 138, n. 4, p. 428-432, apr. 2018.

MANICA, A. et al. High levels of extracellular ATP lead to chronic inflammatory response in melanoma patients. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 5, p. 3980-3988, may. 2018.

MARAFON, F et al. Deregulation of purinergic ectoenzyme activity in head and neck cancer promotes immunosuppression. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 8, p. 7687-7695, ago. 2022.

MARTINS, C, C. et al. Regular exercise training reverses ectonucleotidase alterations and reduces hyperaggregation of platelets in metabolic syndrome patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 454, p. 66-71, 2016.

MASSÉ, Karine; BHAMRA, Surinder; ALLSOP, Gavin; et al. Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase (Enpp) nucleotidases: cloning, conservation and developmental restriction. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 1, p. 181–193, 2010.

MASTELIC-GAVILLET, B. et al. Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor-infiltrating CD8+ T cells. **Journal of Immunotherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, oct. 2019.

MAYNARD, J. P.; SFANOS, K, S. P2 purinergic receptor dysregulation in urologic disease. **Purinergic Signalling**, v. 18, n. 3, p. 267-287, set. 2022.

MEISSNER, V, H; JAHNEN, M; HERKOMMER, K. Familiäres Prostatakarzinom und genetische Prädisposition. **Urology**, v. 60, n. 5, p. 567-575, may. 2021.

MORADI, A. et al. Beyond the biomarker role: prostate-specific antigen (PSA) in the prostate cancer microenvironment. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 38, n. 3, p. 333-346, sep. 2019.

MORELLO, S, et al. Thrombo-Inflammation: A Focus on NTPDase1/CD39. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 2223, aug. 2021.

MORIWAKI, Yuji; YAMAMOTO, T.; HIGASHINO, K. Enzymes involved in purine metabolism-a review of histochemical localization and functional implications. **Histology and Histopathology**, v. 14, n. 4, p. 1321-1340. 1999.

OCHOA-CORTES, F. et al. Potential for developing purinergic drugs for gastrointestinal diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1259–1287. 2014.

OCZKOWSKI, M. et al. Dietary Factors and Prostate Cancer Development, Progression, and Reduction. **Nutrients**, v. 13, n. 2. feb. 2021.

PELEGRIN, Pablo; SURPRENANT, Annmarie. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1b release through pyrophosphatess. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 14, p. 2114-2127. 2009.

- PENAR, C, H. et al. The Epidemiology of Prostate Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 12, dec. 2018.
- PEREIRA, K, G. et al. Factors associated with masculinity in the early diagnosis of prostate cancer: a narrative review. **Revista Nursing**, v. 24, n. 277, p. 5811-5818, june. 2021.
- PFAFFENZELLER, M, S, et al. Purinergic signaling and tumor microenvironment in cervical Cancer. **Purinergic Signalling**, v. 16, n. 1, p. 123-135, mar. 2020.
- POMYKALA, K, L. et al. Molecular Imaging for Primary Staging of Prostate Cancer. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 49, n. 4, p. 271-279, 2019, july. 2019.
- QIAO, C. et al. ATP-gated P2X7 receptor as a potential target for prostate câncer. **Human Cell**, v. 35, n. 5, p. 1346-1354, set. 2022.
- RATHBONE, Michel P. et al. Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 28, n. 7, p. 529-536, 1992.
- ROBBINS E COTRAN. Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2010.
- ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430. 2006.
- SAMARUTANGA, H. et al. From Gleason to International Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer. **Scandinavian Journal of Urology**, v. 50, n. 5, p. 525-529, oct. 2016.
- SHARMA, M; MIYAMOTO, H. Percent Gleason pattern 4 in stratifying the prognosis of patients with intermediate-risk prostate cancer. **Translational Andrology and Urology**, v. 7, n. 4, p. 484-489, sep. 2018.
- SHUKLA, S. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Status in High-Risk Prostate Cancer Subjects. **Diagnostics**, v. 10, n. 3, p. 126, feb. 2020.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA. **Próstata – Carcinoma da próstata**. 5ª edição. 2019.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. **Câncer de Próstata**. São Paulo –SP. 2020.
- SOUZA, V. DO C. G. et al. Purinergic system ecto-enzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of Chagas disease. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 4, p. 753–762, 2012.
- SPYCHALA, Jozef. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 2-3, p. 161-173, 2000.
- TAGAI, E, K. et al. Prostate Cancer Patients' Understanding of the Gleason Scoring System: Implications for Shared Decision-Making. **Journal of Cancer Education**, v. 34, n. 3, p. 441-445, june. 2019.
- THOMPSON, I. M. et al. Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 22, p. 2239–

2246, mar. 2004.

VAGHARI-TABARI, M, et al. Signaling, metabolism, and cancer: An important relationship for therapeutic intervention. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 8, p. 5512-5532, aug. 2021.

VENTURA, M. Angeles; THOMOPOULOS, Pierre. ADP and ATP activate distinct signaling pathways in human promonocytic U-937 cells differentiated with 1, 25-dihydroxy-vitamin D3. **Molecular Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 104-114, 1995.

VIETRI, M, T. et al. Hereditary Prostate Cancer: Genes Related, Target Therapy and Prevention. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3753, apr. 2021.

VULTAGGIO-POMA, V; SARTI, A, C; DI VIRGILIO, F. Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. **Cells**, v. 9, n. 11, nov. 2020.

WANG, J; DU, L; CHEN, X. Adenosine signaling: Optimal target for gastric cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 16, n. 13, sep. 2022.

WAN, H. et al. Important roles of P2Y receptors in the inflammation and cancer of digestive system. **Oncotarget**, v. 7, n. 19, p. 28736-28747, 2016.

YEGUTKIN, Gennady G. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, 2008.

YONGBO, C, D; CANÇÃO, C; YANG, S. Tumor-Suppressive Function of miR-30d-5p in Prostate Cancer Cell Proliferation and Migration by Targeting NT5E. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 33, n. 5, p. 203-211, 2018.

ZANINI, D. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, n. 1, p. 40-45, 2012.

ZANINI, D. et al. ADA activity is decreased in lymphocytes from patients with advanced stage of lung cancer. **Medical Oncology**, v. 36, n. 9, p. 78-85, 2019.

ZHANG, Xia; GONCALVES, Ricardo; MOSSER, David M. The isolation and characterization of murine macrophages. **Current Protocols in Immunology**, v. 83, n. 1, p. 1-14, 2008.

ZHULAI, G. et al. Adenosine-Metabolizing Enzymes, Adenosine Kinase and Adenosine Deaminase, in Cancer. **Biomolecules**, v. 12, n. 3, mar, 2022.

ZIMMERMANN, Herbert. 5'-Nucleotidase: estrutura molecular e aspectos funcionais. **Biochemical Journal**, v. 285, n. 2, p. 345, 1992.

APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFES

Prezado (a) participante,

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa: **Biorrepositório de biópsias tumorais para avaliação da expressão gênica e protéica dos receptores e enzimas do sistema purinérgico com ênfase em tumores de mama, próstata e colorretal**, desenvolvida por discentes e docentes do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó – SC, sob coordenação da Professora Dra. Sarah F. V. O. Maciel.

1. Objetivo Central

Construção e manutenção do Biorrepositório de amostras tumorais, a fim de pesquisar marcadores moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer, e com possibilidades de atuar no tratamento do câncer de mama, câncer de próstata, câncer colorretal e câncer de bexiga.

2. Critérios de Inclusão

Pacientes: ambos os sexos, diagnosticados por médico especialista com câncer de mama (do tipo carcinoma ductal invasor), câncer de próstata (do tipo adenocarcinoma), câncer colorretal (do tipo adenocarcinoma) e câncer de bexiga, maiores de 18 anos de idade, que até o momento não realizaram cirurgia para retirada do tumor e nenhum tipo de tratamento (quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia, terapia de precisão). Serão excluídos pacientes com diagnóstico anterior de câncer, ou com doenças inflamatórias crônicas (diabetes, hipertensão, doença de chron, retocolite ulcerativa, hiperplasia prostática benigna, mastite). **Controles:** com base no pareamento por idade (mais ou menos 3 anos) e sexo em relação aos pacientes, que não apresentem diagnóstico passado ou atual de câncer de qualquer tipo, ou de doenças inflamatórias crônicas. Sua participação não é obrigatória e você tem plena autonomia para decidir se deseja ou não participar, além de poder desistir da colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de explicação. Você não receberá remuneração e nenhum tipo de recompensa nesta pesquisa.

3. Mecanismos para garantir o sigilo e privacidade

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações por você prestadas. As amostras biológicas e os dados clinicopatológicos dos participantes serão identificados por numeração sequencial, não tendo vínculo com a identificação do paciente. A qualquer momento você poderá solicitar aos pesquisadores informações sobre sua participação e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo. Caso ocorra desistência, os materiais biológicos e as informações clinicopatológicas dos participantes serão descartados.

4. Identificação do participante ao longo do trabalho

Seu nome não será mencionado durante qualquer etapa desta pesquisa, bem como em quaisquer publicações, cursos, relatórios e afins. Apenas o nome da Instituição será mencionado. Para manter o seu anonimato, será utilizada uma codificação numérica sequencial. Cada participante terá um número distinto em todos os materiais e dados relacionados a ele.

5. Tempo de duração da coleta/procedimento/experimento

A sua participação na pesquisa consiste em: 1. Pacientes - responder aos **questionários de estilo e qualidade de vida**; utilização do **material tumoral e sanguíneo (30 ml)** coletado durante a cirurgia de remoção do tumor, materiais que, normalmente, seriam descartados após análise patológica; disponibilização das **informações dos prontuários médicos** (idade, sexo, subtipo histológico do tumor, estadiamento, etc). A pesquisa não irá gerar nenhum prejuízo no diagnóstico e tratamento da doença em questão; 2. Controles - responder aos **questionários de estilo e qualidade de vida**; utilização do **material sanguíneo (30 ml)** coletado durante a entrevista com os pesquisadores. As coletas serão realizadas pelos pesquisadores responsáveis e/ou médicos especialistas, em ambiente adequado no próprio HRO. O tempo de duração das coletas será de no máximo 30 minutos.

6. Guarda dos dados e materiais coletados na pesquisa

Todos os materiais biológicos serão guardados em freezer, devidamente identificados com numeração sequencial, nome do projeto e pesquisador responsável. Os outros materiais provenientes da pesquisa ficarão guardados em armário trancado com chave, ao qual somente o pesquisador responsável terá acesso. As tabelas com informações dos participantes da pesquisa ficarão guardadas nos computadores dos pesquisadores envolvidos, com acesso somente com senha. Todos os materiais serão mantidos pelo período de duração da pesquisa (5 anos). Após o término da pesquisa, os materiais biológicos e dados clinicopatológicos serão descartados.

7. Benefícios diretos (individuais ou coletivos) aos participantes da pesquisa

Grupos de encontros com os participantes da pesquisa e outros pacientes do setor de Oncologia do HRO, de maneira voluntária por ambas as partes, em sala reservada no próprio HRO, onde serão dadas, por parte dos pesquisadores envolvidos, orientações e esclarecimentos sobre as patologias incluídas na pesquisa e compartilhamento de

experiências, a fim de melhorar a qualidade de vida dos participantes. Posteriormente, esses grupos também permitirão o compartilhamento dos resultados obtidos na pesquisa, de maneira adequada para o entendimento por parte dos participantes.

8. Previsão de riscos ou desconfortos

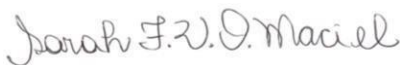
A participação na pesquisa poderá causar riscos. Um risco previsível é o desconforto no momento da coleta de sangue, em decorrência da picada da agulha. Para minimizá-lo, a coleta será realizada por profissionais capacitados, visando a segurança dos participantes. Os pesquisadores explicarão detalhadamente o conteúdo da pesquisa e advertirão os participantes de que sua participação não é necessária caso não se sintam confortáveis para tal. Caso os riscos previstos ocorram, você receberá tratamento e acompanhamento até que esses desconfortos desapareçam. Outros danos que podem ser decorrentes da pesquisa são os psicológicos, visto que as patologias em questão podem provocar alterações psicossociais. Para minimizá-los, será explanado para os participantes o objetivo e finalidade da sua contribuição na pesquisa. Entretanto, caso sejam percebidos quaisquer distúrbios psicológicos no participante decorrente da pesquisa, este será encaminhado para o serviço de apoio psicológico do Centro de Saúde da Família (CSF) de referência, com a Equipe de Saúde da Família (ESF).

9. Divulgação dos resultados da pesquisa

A devolutiva dos resultados obtidos na pesquisa será realizada por meio de publicações científicas e participação em eventos científicos da área, com palestras e com o uso de *poster* e *banner* ou informativos online. Os dados pessoais dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Caso concorde em participar, uma via deste termo ficará em seu poder e a outra será entregue ao pesquisador. Desde já agradecemos sua participação!

Chapecó – SC, _____ de _____ de _____.



Assinatura do Pesquisador Responsável

Contato profissional com o(a) pesquisador(a) responsável: Tel: 49-30254508/ e-mail: sarah.maciell@uffs.edu.br. Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS: Tel e Fax - 49- 2049-3745/ e-mail: cep.uffs@uffs.edu.br.

Endereço para correspondência: Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS, Universidade Federal da Fronteira Sul, Bloco da Biblioteca, Sala 310, 3º andar, Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul, CEP 89815- 899, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar. Nome

completo do participante e contato:

Assinatura:

APÊNDICE II - INFORMAÇÕES CLÍNICO PATOLÓGICAS

INFORMAÇÕES CLÍNICO PATOLÓGICAS

As informações foram obtidas dos participantes da pesquisa a partir de relato e consulta aos prontuários médicos.

- 1) Idade
- 2) Estado civil
- 3) Tabagismo
- 4) Diagnóstico de Covid-19
- 5) Histórico de comorbidades (hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, entre outras)
- 6) Histórico de câncer de próstata em indivíduos com 1º grau parentesco
- 7) Valor de PSA pré-tratamento
- 8) Gradação histológica (Gleason)
- 9) Histologia
- 10) TNM (classificação de tumores malignos)
- 11) Estadiamento clínico
- 12) Escore da ISUP