



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA GABRIELA DA SILVA BONACINI

**AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR EM
PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA:
ASSOCIAÇÃO COM A PRESENÇA DE METÁSTASES E A
ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO**

Londrina
2019

ANA GABRIELA DA SILVA BONACINI

**AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR EM
PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA:
ASSOCIAÇÃO COM A PRESENÇA DE METÁSTASES E A
ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa N. C. Simão

Londrina
2019

ANA GABRIELA DA SILVA BONACINI

**AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR EM
PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA:
ASSOCIAÇÃO COM A PRESENÇA DE METÁSTASES E A
ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa N. C. Simão
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Sayonara Rangel Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 16 de janeiro de 2019.

Dedico esse trabalho à minha família, que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que me deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada e me concedeu força e coragem durante toda esta caminhada.

Ao meu orientador, professor Doutor Rubens Cecchini, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

À Doutora Andrea Name Colado Simão pela infinita disponibilidade e orientação em cada etapa do desenvolvimento do trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos que me transmitiu e pelo impecável exemplo de personalidade e profissionalismo.

Aos professores que compartilharam seus conhecimentos e sempre me incentivaram.

Ao Alexsandro Koike e à Brunna Emanuella França Robles, verdadeiros companheiros de pesquisa, sempre dispostos a me ajudar em todas as etapas do projeto e esclarecer minhas dúvidas neste meu caminhar.

Aos colegas do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário de Londrina, e à equipe de pós-graduandos, pelo convívio, apoio e desenvolvimento do trabalho.

Aos pacientes participantes do projeto, por confiarem na seriedade e importância da nossa pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos à minha família por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Aos meus pais que sempre com tanto carinho e cuidado me incentivaram e deram apoio para que eu chegasse até aqui.

E por fim, agradeço ao meu noivo, Diogo, pelo carinho, paciência e pela sua capacidade de me trazer paz na correria de cada dia.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

BONACINI, Ana Gabriela da Silva. **Avaliação das moléculas de adesão celular em pacientes com câncer de próstata: associação com a presença de metástases e estratificação de risco.** 66 f. Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Introdução: O câncer de próstata (CaP) é a doença prostática mais frequente em homens idosos. A metástase é o culminar de uma série de etapas que englobam a quimiotaxia celular, adesão celular e crescimento seletivo do tumor. As moléculas de adesão celular (MACs) são uma rede complexa de moléculas que medeiam as interações célula-célula e célula-matriz e desempenham um papel crucial no processo de metástase. A expressão anormal do Inibidor do Ativador do Plasminogênio tipo-1 (PAI-1) é encontrada em muitas doenças e está intimamente relacionado ao câncer. **Objetivo:** Determinar o perfil de MACs e PAI-1 e associá-los à presença de metástase e aos diferentes graus de risco para metástase em pacientes com CaP. **Sujeitos e Métodos:** Este é um estudo caso-controle prospectivo que avaliou 213 homens, com idade entre 30 e 90 anos, dos quais 149 eram pacientes com CaP diagnosticados na Clínica de Uro-Oncologia do Hospital do Câncer de Londrina e 64 voluntários saudáveis (grupo controle). Primeiramente, o grupo CaP foi subdividido em dois grupos: sem metástase (Met-, n=108) e com metástase (Met+, n=41). Posteriormente, o grupo CaP foi novamente subdividido de acordo com a estratificação de risco para metástase seguindo as diretrizes do *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*: Grupo A: muito baixo e baixo risco (n=28); Grupo B: risco intermediário favorável e desfavorável (n=41); Grupo C: alto e muito alto risco (n=77). Os dados antropométricos e clínicos foram obtidos de acordo com uma ficha de coleta de dados previamente padronizada para este estudo. Foram avaliados o número de leucócitos totais e plaquetas no sangue periférico, a velocidade de sedimentação de eritrócitos (VHS), a dosagem sérica de proteína C-reativa (PCR), e as concentrações plasmáticas da molécula de adesão celular endotelial plaquetária-1 (PECAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), E-selectina, P-selectina e PAI-1. A Síndrome Metabólica (SM) foi definida seguindo os critérios do Painel de Tratamento de Adultos III (ATP III). **Resultados:** Os pacientes com CaP Met+ foi diferenciado dos controles pelo aumento do VHS ($p=0,037$; OR:1,260; IC 95%:1,014-1,566) e diminuição da PECAM-1 ($p=0,029$; OR:1,000; IC 95%: 0,999-1,000) e do PAI-1 ($p=0,020$; OR:1,000; IC 95%:1,000-1,000). Os pacientes com CaP Met+ diferem dos com CaP Met- pelo aumento do VHS ($p=0,008$; OR:0,906; IC 95%:0,842-0,975) e diminuição da VCAM-1 ($p=0,043$; OR:1,000; IC 95%: 1,000-1,000). Os níveis de P-selectina ($p= 0,031$; OR: 1,000; IC 95%: 1,000-1,000) e PAI-1 ($p=0,017$; OR: 1,000; IC 95%: 1,000-1,000) estavam reduzidos no grupo CaP Met+ quando comparado ao grupo controle. Os resultados foram ajustados pela idade, VHS, tamanho da próstata e presença de SM. Pacientes classificados como de alto risco para metástase apresentaram níveis mais elevados de VHS quando comparados àqueles com baixo risco ($p=0,017$; OR: 1,075; IC 95%: 1,013-1,140) e risco intermediário ($p=0,001$; OR: 0,935; IC 95%: 0,897-0,974). Os níveis de PECAM-1 no grupo de alto risco para metástase foram menores do que o obtido em pacientes com risco intermediário ($p=0,039$; OR: 1,000; IC 95%: 1,000-1,000). Esses

resultados foram ajustados pela idade e VHS. **Conclusão:** Nossos dados demonstraram que PECAM-1, P-selectina e PAI-1 têm um papel importante na fisiopatologia do CaP, mas somente a VCAM-1 pode prever a presença de metástase independentemente da idade, tamanho da próstata, presença de SM e da inflamação. No entanto, somente a PECAM-1 pôde diferenciar pacientes de alto risco para metástase daqueles de risco intermediário, independentemente da idade e do processo inflamatório.

Palavras-chave: Câncer de próstata. Moléculas de adesão celular. Inibidor do ativador do plasminogênio tipo-1 (PAI-1). Metástase. VCAM-1. PECAM-1.

BONACINI, Ana Gabriela da Silva. **Cell adhesion molecules in patients with prostate cancer**: association with the presence of metastases. 66 p. Dissertation (Master's degree in Clinical and Laboratory Pathophysiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Background: Prostate cancer (PCa) is the most frequent prostatic diseases in aging men. Cancer metastasis is the culmination of a series of steps: cell chemotaxis, cell adhesion, and selective tumor growth. Cell adhesion molecules (CAMs) are a complex network molecules that mediate cell-cell and cell-matrix interactions and play a crucial role in metastasis processes. Abnormal expression of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) is found in many diseases and is closely related to cancer. **Objective:** To determine the profile of CAMs and PAI-1 in PCa patients and to associate them with the presence of metastasis and the different degrees of risk for metastasis in this disease. **Subjects and Methods:** This is a prospective case-control study that consisted of 213 men with age from 30 to 90 years; of them 149 patients with PCa diagnosed at the Uro-oncology clinic of the Cancer Hospital of Londrina and 64 healthy volunteers (control group). First, PCa group was subdivided in two groups: without metastasis (Met-, n=108) and with metastasis (Met+, n=41). Subsequently, the CaP group was subdivided according to the stratification of risk for metastasis following the guidelines of the National Comprehensive Cancer Network (NCCN): Group A: very low and low risk (n=28); group B: favorable and unfavorable intermediate risk (n=41); Group C: high and very high risk (n=77). Anthropometric and clinical data were obtained according to a standardized data collection questionnaire for this study. The number of total leukocytes and platelets in peripheral blood, erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum C-reactive protein (CRP), and plasma levels of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin, P-selectin and PAI-1 were analysed. Metabolic Syndrome (MetS) was defined following the Adult Treatment Panel III criteria. **Results:** Patients with PCa Met+ were significantly distinguished from controls by increased ESR (p=0.037; OR: 1.260; 95% CI: 1.014-1.566) and decreased PECAM-1 (p=0.029; OR: 1.000; 95% CI: 0.999-1.000) and PAI-1 (p=0.020; OR:1.000; 95% CI:1.000-1.000). Patients with PCa Met+ differed PCa Met- by increased ESR (p=0.008; OR: 0.906; 95%CI: 0.842-0.975) and decreased VCAM-1 (p=0.043; OR: 1.000; 95% CI: 1.000-1.000). Levels of P-selectin (p= 0.031; OR: 1.000; 95% CI: 1.000-1.000) and PAI-1 (p=0.017; OR: 1.000; 95% CI: 1.000-1.000) decreased significantly among patients with PCa Met- when compared to control group. The results were adjusted by age, ESR, prostate size and presence of MetS. We found that patients classified as high risk for metastasis showed higher levels of ESR when compared with low risk (p=0.017; OR: 1.075; 95% CI: 1.013-1.140) and intermediated risk (p=0.001; OR: 0.935; 95% CI: 0.897-0.974). Levels of PECAM-1 into high risk group were lower than intermediated risk (p=0.039; OR: 1.000; 95% CI: 1.000-1.000). The results were adjusted by age and ESR. **Conclusion:** Our data demonstrated that PECAM-1, P-selectin, and PAI-1 have an important role in pathophysiology of PCa, but only VCAM-1 could differ metastatic PCa, independently of age, prostate size, presence of MetS, and inflammation. PECAM-1 could differentiate patients with high risk for metastasis from those with intermediate risk, independently of age and inflammation.

Keywords: Prostate cancer. Cell adhesion molecules. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Metastasis. VCAM-1. PECAM-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Etapas da metástase e moléculas de adesão envolvidas nesses processos.....17
- Figura 2** - Regulação do Inibidor do Ativador do Plasminogênio tipo-1 (PAI-1) no sistema do plasminogênio e atividade fibrinolítica22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|---|
| ANOVA | Análise de Variância |
| CaP | Câncer de Próstata |
| CTCs | Células Tumorais Circulantes |
| DU145 | Linhagem Celular Derivada de Metástase Cerebral |
| DP | Desvio Padrão |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético |
| EMT | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético |
| EMT | Transformação Epitelial-Mesenquimal |
| HDL | Lipoproteína de Alta Densidade |
| HPB | Hiperplasia Prostática Benigna |
| IC | Intervalo de Confiança |
| ICAM-1 | Molécula de Adesão Intercelular-1 |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| LHRH | Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante |
| LnCaP | Linhagem Celular Derivada de Metástase Linfonodal |
| MACs | Moléculas de Adesão Celular |
| MUC1 | <i>Mucin 1</i> |
| NCCN | <i>National Comprehensive Cancer Network</i> |
| ND1 | Linhagem Celular Derivada de Carcinoma Primário de Próstata |
| OR | <i>Odds Ratio</i> |
| PAI-1 | Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo-1 |
| PECAM-1 | Molécula de Adesão Celular Endotelial Plaquetária-1 |
| PCR | Proteína C- Reativa |
| PC3 | Linhagem celular derivada de metástase óssea |
| PSA | Antígeno Prostático Específico |
| RM | Ressonância Magnética |
| SM | Síndrome Metabólica |
| TC | Tomografia Computadorizada |
| tPA | Ativador do Plasminogênio Tecidual |

| | |
|--------|---|
| TNM | T=Tumor; N= Número de Linfonodos Acometidos; M=Presença de Metástase |
| uPA | Uroquinase |
| USTR | Ultrassonografia Transretal |
| VCAM-1 | Molécula de Adesão Vascular-1 |
| VHS | Velocidade de Hemossedimentação |
| WISP-1 | Proteína Derivada de Osteoblastos Condicionados |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 | CaP, Metástases e Moléculas de Adesão | 17 |
| 1.2 | Inibidor Do Ativador Do Plasminogênio Tipo 1 (PAI-1) | 22 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 24 |
| 3 | OBJETIVOS | 25 |
| 3.1 | Objetivo Geral | 25 |
| 3.2 | Objetivos Epecíficos | 25 |
| 4 | SUJEITOS E MÉTODOS | 26 |
| 4.1 | Delineamento e Amostragem | 26 |
| 4.2 | Medidas Antropométricas | 27 |
| 4.3 | Análises Laboratoriais..... | 27 |
| 4.4 | Análise Estatística | 28 |
| 5 | RESULTADO E DISCUSSÃO | 28 |
| 6 | CONCLUSÕES | 47 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 48 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 49 |
| 9 | ANEXO | 55 |
| 9.1 | Parecer Consubstanciado do CEP | 55 |
| 9.2 | Declaração de Colaboração do Hospital do Câncer de Londrina | 60 |
| 9.3 | Declaração de Colaboração do Hospital Evangélico de Londrina | 61 |
| 10 | APÊNDICES | 63 |
| 10.1 | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)..... | 63 |
| 10.2 | Ficha de Coleta..... | 65 |

1. INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula que faz parte do sistema urogenital masculino e está localizada em posição inferior à bexiga e anterior ao reto. Ela circunda a uretra proximal e participa na produção de secreções seminais. A próstata pode ser dividida em zona de transição, central, periférica e a parte anterior formada por um estroma fibromuscular (McNEAL, 1981). A glândula prostática depende de hormônios esteroides como a testosterona e a di-hidrotestosterona para ter um adequado desenvolvimento e estímulo para a sua função secretora (McGINLEY *et al.*, 1992).

Na infância, a próstata tem um volume pequeno, cerca de 7 cm³ aos nove anos. Ao início da adolescência, cessa-se a dormência hormonal e inicia-se o aumento do seu volume, concomitante à sua produção glandular, alcançando um tamanho de cerca de 15-20 cm³ na fase adulta. Após os 30 anos de idade, a velocidade de crescimento é de cerca de 0,5 cm³ ao ano, e esta velocidade pode aumentar nos portadores de hiperplasia benigna da próstata (HBP). Com o avanço da idade, surgem alterações no tecido prostático juntamente a outras doenças da próstata, decorrentes não só do aumento de seu volume como também devido a alterações histológicas. As duas formas clinicamente mais importantes e prevalentes do crescimento anormal da próstata são a HPB e o câncer da próstata (CaP) (XIA *et al.*, 2002).

No mundo, o número de casos novos do CaP vem aumentando a cada ano, sendo, atualmente, a quarta neoplasia mais frequente quando considerada ambos os sexos (INCA, 2017). A incidência mundial é altamente variável, ocorrendo variações na ordem de 25 vezes (4,4 casos/100 mil habitantes na Índia à 118,2/100 mil habitantes nos Estados Unidos). No Brasil, o CaP tornou-se um sério problema de saúde pública em função de suas altas taxas de incidência e mortalidade (AMORIM *et al.*, 2011). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) a incidência estimada para o biênio 2018-2019, no Brasil, será de, aproximadamente, 68.220 casos novos de CaP. Depois dos tumores de pele não melanoma, O CaP é o tipo de câncer mais incidente entre os homens em todas as regiões do país, com incidência estimada para este biênio de 96,85 homens/100 mil no Sul; 66,75/100 mil no Centro-Oeste; 69,83/ 100 mil no Sudeste; 56,17/100 mil no Nordeste e

29,41/100 mil no Norte. No estado do Paraná, em 2016, houveram 5.260 indivíduos diagnosticados com CaP e em todo o país, houve 14.484 mortes pelo tumor no ano de 2015 (INCA, 2017).

Múltiplos fatores podem influenciar a incidência de CaP, desde as características demográficas e genéticas até a eficiência do sistema de saúde pública para o diagnóstico da doença (CENTER *et al.*, 2012).

Os fatores que têm sido apontados como determinantes para o aumento da incidência do CaP são a melhoria no atendimento básico às populações, aumento de campanhas informativas e preventivas de identificação da doença, aumento na expectativa de vida e a evolução dos métodos diagnósticos. (PAIVA; MOTTA; GRIEP, 2010)

A idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento do CaP (STANGELBERGER; WALDERT, 2008; PAIVA; MOTTA; GRIEP, 2010). Bell (2015) em uma revisão sistemática de 29 estudos de autópsias de pacientes, publicada no período de 1948 a 2013, demonstrou que o CaP aumenta com a idade, variando de uma prevalência de 5% em homens com menos de 30 anos à cerca de 59% naqueles com mais de 79 anos. A história familiar, ou envolvimento do componente genético, é outro fator bem conhecido (CARTER *et al.*, 1992; COOK *et al.*, 2014). Em relação à raça, estudos epidemiológicos mostram que afro-americanos têm maior incidência, em idade mais precoce e são mais propensos à doença localmente avançada ou metástases e doença de alto risco, em relação aos caucasianos-americanos (PIETRO *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2017). Outros fatores também apontados para o CaP são a presença de síndrome metabólica (SM) (LAUKKANEN *et al.*, 2004), dieta (KIMURA *et al.*, 2018), obesidade (MACINNIS *et al.*, 2003) e doenças inflamatórias (SFANOS *et al.*, 2012).

A forma mais aceita de rastreamento do CaP é a associação da dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA) ao toque retal. O toque retal permite avaliar o tamanho, a forma e a consistência (dureza), da próstata com objetivo de analisar a possível existência de nódulos (FRANCA; VIEIRA; PENNA, 2008). Costa (1994) destaca que a ultra-sonografia transretal (USTR) é um exame opcional para detecção de tumor primário. A ressonância magnética (RM) e a tomografia computadorizada (TC) são, também, alguns exames opcionais utilizados no

diagnóstico do CaP; entretanto, estes não superam a eficiência da USTR (FACUNDES, 2002).

A introdução do PSA em meados da década de 1980 como marcador tumoral para o CaP (WANG *et al.*, 1979) foi, dentre todos os marcadores tumorais, o que talvez tenha tido o maior impacto na história da incidência de uma neoplasia. O PSA pode ser encontrado em duas formas moleculares no soro: livre e complexada: 10-30% de PSA total é livre, não ligada a proteínas do soro e 70-90% de PSA total é ligada a α 1-antiquimiotripsina e a uma pequena quantidade de α 1-antitripsina e uma pequena porção não mensurável pelos métodos habituais circula complexada com α 2-macroglobulina (LILJA *et al.*, 1991, STENMAN *et al.*, 1991).

A biópsia da próstata é realizada sempre que existe uma suspeita de CaP, tais como: toque retal com suspeita de malignidade, nódulos ou zonas endurecidas; PSA com níveis elevados e/ou detecção na ecografia de zonas com alterações ecogênicas que sugiram à presença de CaP (BANDEIRAS *et al.*, 2003). Quando a biópsia confirma a presença do CaP, deve-se proceder a avaliação da extensão e das características do tumor, a fim de se estabelecer o estágio da doença e o seu tratamento (REGGIO, 2005; OTTO, 2002). Utiliza-se o *scanner* ou a TC para avaliar a extensão do tumor a tecidos vizinhos, a gânglios linfáticos, ao fígado, rins, ureteres e bexiga; e a radiografia do tórax para pesquisar metástases no pulmão e ossos (REGGIO, 2005). Para o estadiamento da doença seguem-se os critérios estabelecidos no *National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines*, os quais levam em conta os níveis de PSA total, Escore de Gleason e classificação segundo o tamanho, nódulo e metástase (TNM).

Na avaliação da biópsia do CaP realiza-se a graduação de Gleason, que se refere ao padrão arquitetural do CaP, sendo que o grau 1 é bem diferenciado e o grau 5 é pobremente diferenciado. O resultado final da graduação é obtido pela soma das graduações de Gleason mais abundantes na amostra (NELSON *et al.*, 2008).

A classificação TNM é um sistema em que as letras T (tumor) avalia o tamanho e a extensão do tumor primário, N (linfonodos) reflete se as células cancerosas espalharam-se pelos linfonodos e M (metástase) indica se o câncer se espalhou para tecidos distantes. Essas pontuações são combinadas para atribuir o estadiamento do câncer (NCCN *Guidelines*, 2018).

Os grupos de risco para metástase são estratificados em seis categorias: muito baixo risco, baixo risco, favorável intermediário risco, desfavorável intermediário risco, alto risco e muito alto risco. (NCCN *Guidelines*, 2018)

O tratamento de pacientes com CaP é escolhido conforme o estadiamento da neoplasia. Usualmente, para tumores localizados, a prostatectomia radical é o tratamento de escolha, por ser muito eficaz e curativa (LUCIA *et al.*, 2005; CAUWELAERT; AGUIRRE; SANDOVAL, 2006). Tal método consiste na retirada de toda a próstata e das vesículas seminais, posteriormente unindo-se a bexiga à uretra (GOMES *et al.*, 2008).

Quando o CaP encontra-se localizado, a radioterapia, geralmente após a retirada do tumor, é uma das opções de tratamento vigentes (SHAHI; MANGA, 2006). Esta se baseia em administrar radiações externas ou internas sobre a próstata para destruir as células cancerosas (SROUGI; SIMON, 1996; SROUGI, 2007).

No caso de CaP metastático, a terapia endócrina ou hormonoterapia é o tratamento mais indicado (KALIKS; GIGLIO, 2008). Nesta terapia são empregados vários medicamentos à base de hormônios como: estrógenos, análogos do receptor do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) e antiandrógenos, que impedem a produção de testosterona ou bloqueiam as suas ações na próstata. A orquiectomia, retirada cirúrgica dos testículos, também é utilizada como hormonioterapia, com a que eliminação dos órgãos que produzem o hormônio androgênico, este apontado como principal responsável pelo crescimento do tumor (CORDÓN; ALBIACH; ALBIACH, 2003; SHAHI; MANGA, 2006).

O tratamento quimioterápico, frequentemente utilizado no combate a cânceres, tem sido utilizado, também, em tumores avançados ou metastáticos da próstata. Existem esquemas de droga única ou de múltiplas drogas; os esquemas multidroga apresentam resposta mais satisfatória que o uso de drogas isoladamente. O esquema de docetaxel associado à prednisona foi o que, até o momento, apresentou melhor sobrevida dos pacientes com CaP avançado. (WROCLAWSKI *et al.*, 2003).

1.1 CaP, Metástases e Moléculas de Adesão

A metástase é o estágio mais temido do câncer, sendo responsável pela grande maioria das mortes relacionadas ao CaP. Identificar a população de risco para desenvolver CaP avançado e prevenir metástases é, hoje, um dos maiores desafios no tratamento dos pacientes com CaP.

As metástases cancerosas são o culminar de uma série de complexas etapas em que as células cancerosas degradam as matrizes extracelulares permitindo-lhes romper com os tumores primários e migrar para os tecidos. São importantes fatores envolvidos nesse processo, tais como as quimiocinas e seus receptores (KAKINUMA; SAM, 2006; SINGH; SADANANDAM; SINGH, 2007; FERNANDES *et al.*, 2015), as moléculas de adesão celular (MACs) (DAVIES; JIANG; MASON, 2000), e o inibidor do ativador do plasminogênio tipo-1 (PAI-1) (GONDEK *et al.*, 2014). Durante o processo de metástase, um subconjunto de células tumorais primárias sofre transformação epitelial-mesenquimal (EMT) que envolve alterações morfogênicas, alteração do fenótipo e, por consequência, sua motilidade e plasticidade, lhes permitindo invadir a circulação e tornarem-se células tumorais circulantes (CTCs). Algumas CTCs podem sobreviver na circulação e, eventualmente, extravasar em locais metastáticos distantes. O processo de extravasamento envolve várias etapas. Primeiramente, as CTCs rolam nas superfícies das células endoteliais que expressam a molécula de adesão celular (MAC) E-selectina. Isso faz com que as CTCs consigam aderir e rolar nas vênulas pós-capilares. Este processo de rolamento permite que as células do CaP ativem os sinais da integrina e da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), desencadeando processos adicionais de adesão, resultando em aderências firmes entre as células cancerosas e as células endoteliais. Este processo promove a transmigração de células cancerosas através do endotélio para os sítios metastáticos (YASMIN-KARIM *et al.*, 2016). Células de CaP preferencialmente tendem a metastisar para os ossos através de interações específicas do local e a principal MAC envolvida nesse processo é a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) (TAI *et al.*, 2014) (Figura 1).

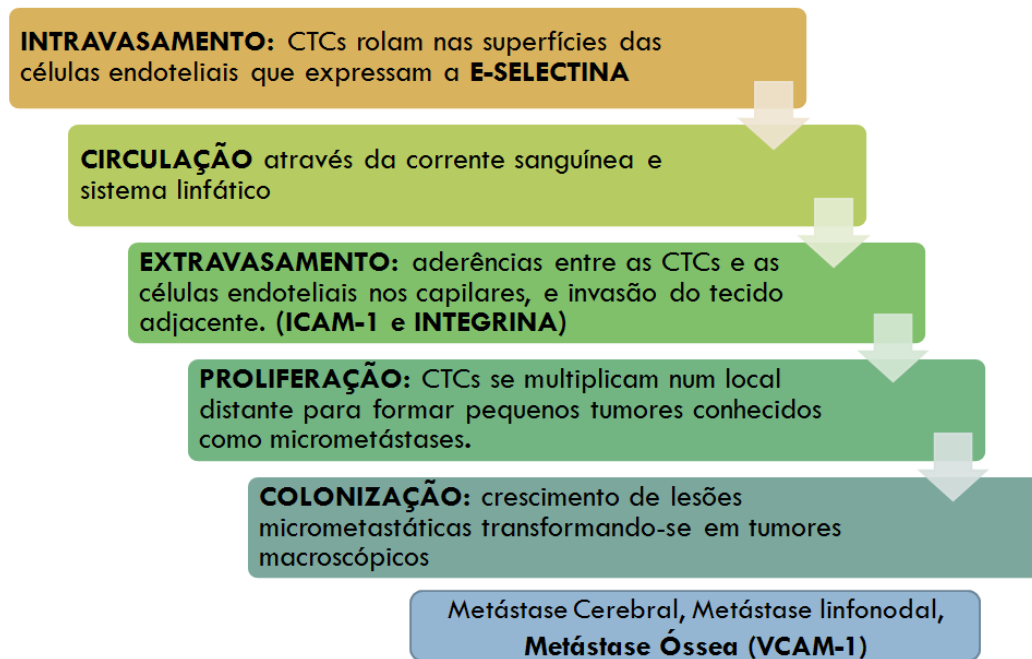


Figura 1. Etapas da metástase e moléculas de adesão envolvidas nesses processos.

CTCs: células tumorais circulantes. ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1. VCAM-1: molécula de adesão vascular-1. Fonte: Próprio autor.

A metástase óssea do CaP é um importante problema clínico e é comumente associado com dor intratável, fratura patológica, inclusive da medula espinhal. O crescimento de células de CaP acelera ao entrarem no ambiente ósseo, sugerindo que a presença de fatores ósseos estimulem a proliferação tumoral. A capacidade de células tumorais interagirem com moléculas de adesão (MACs) de células específicas no endotélio, em parte, determina seu padrão de metástase (COOPER; PIENTA,2000).

As MACs são divididas em quatro categorias principais: caderinas, integrinas, selectinas e membros da superfamília das imunoglobulinas. Elas medeiam o processo de adesão celular pelas interações célula-matriz ou célula-célula e agem como mediadoras chave em uma variedade de processos, como motilidade celular, integridade dos tecidos e a manutenção da diferenciação tecidual. As caderinas pertencem a uma família de glicoproteínas transmembrana que medeiam à adesão intercelular célula-célula na presença de cálcio extracelular. São classificadas de acordo com a estrutura e semelhanças funcionais que compartilham. Atualmente, existem cerca de 20 ou mais moléculas diferentes de caderina classificadas. As caderinas mais estudadas são: E- (epitelial), N- (neural) e P- (placentária). As

integrinas são proteínas transmembranas formadas pela heterodimerização de subunidades alfa e beta. São responsáveis por realizarem a adesão das células aos componentes da matriz. Atualmente, existem, pelo menos, 18 subunidades alfa e nove subunidades beta conhecidas. Essas subunidades formam um número de diferentes integrinas que formam os hemidesmossomas e complexos de adesão focal, as duas principais estruturas de adesão célula-matriz. As selectinas são carboidratos cálcio-dependente e membros da família de MACs de lectina celular. Elas são encontradas em leucócitos, plaquetas e células endoteliais, bem como em células tumorais. Elas também estariam envolvidas em adesão tumoral a outras células, como por exemplo, as células endoteliais (MASON *et al.*, 2002).

A superfamília de imunoglobulinas é uma coleção de glicoproteínas integrais de membrana que possuem, pelo menos, um domínio “*IG-like*” em sua região extracelular, capaz de ligação heterofílica e/ou homofílica com integrinas e/ou entre si. Esta família inclui as MACs: molécula de adesão celular endotelial plaquetária-1 (PECAM-1), VCAM-1, ICAM-1 entre muitas outras. (TEIXEIRA, 2018).

A PECAM-1 é um membro da superfamília de imunoglobulinas que é expressa na superfície das plaquetas circulantes, monócitos, neutrófilos e subconjuntos de células T selecionadas. É também um dos principais constituintes da junção intercelular das células endoteliais. (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

A VCAM-1 é uma glicoproteína transmembrana que medeia a adesão de linfócitos ou monócitos ao endotélio vascular. A expressão de VCAM-1 em células cancerosas tem sido documentada como participante da regulação, progressão tumoral e metástase óssea em alguns tipos de cânceres (TAI *et al.*, 2014).

A ICAM-1 é um membro da família de MACs intercelular constituída de cinco membros, denominados de 1–5, que possuem um domínio extracelular com repetições de imunoglobulina, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático. A expressão de ICAM-1 foi observada nos macrófagos, endotélio vascular e linfócitos e está associada ao reconhecimento imunológico do endotélio exposto, bem como ao extravasamento celular. Sabe-se que a ICAM-1 se liga às β -integrinas, *Mucin 1* (Muc1) e fibrinogênio, modulando, assim, as interações célula-célula e célula-matriz celular (HALE; LI; LATHIA, 2012).

Tumorigênese e progressão para a doença metastática são acompanhadas por mudanças na expressão de MACs. No entanto, os mecanismos envolvidos no

processo de formação das metástases são distintos, assim como a participação das MACs nesse contexto. Normalmente há perda de expressão de E-caderina e, por outro lado, alteração e superexpressão de moléculas como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina nas doenças progressivas e metastáticas (LYNCH *et al.*, 1997).

Estudos foram realizados em cultura de células a fim de caracterizar a expressão de MAC em linhagens de células de CaP (ROKHLIN; COHEN, 1995; BRAYTON *et al.*, 1998; DAVIES *et al.*, 2000; SCOTT *et al.* 2001). Rokhlin e Cohen (1995), utilizando citometria de fluxo, examinaram a expressão de MACs na superfície de quatro diferentes linhagens celulares tumorais da próstata humana: linhagem celular derivada de metástase cerebral (DU 145); linhagem celular derivada de metástase óssea (PC 3); linhagem celular derivada de metástase linfonodal (LNCaP) e linhagem celular derivada de carcinoma primário de próstata (ND1). Os autores encontraram altos níveis de expressão de ICAM-1 em três das quatro linhagens celulares da próstata, sendo negativo apenas para as células LNCaP.

Segundo Brayton e colaboradores (1998), o uso de anticorpos anti-E-selectina e anti-VCAM-1 causaram inibição significativa de crescimento na linhagem ND1; no entanto, a inibição não mostrou resultado significativo na linhagem DU145. O bloqueio da PECAM-1, ICAM-1 e ICAM-2 não inibiram a adesão de nenhuma das linhagens de células tumorais. Estes resultados demonstram que as células neoplásicas originadas de tumores primários podem expressar diferentes propriedades de adesão quando comparadas às células de sítios metastáticos.

Posteriormente, Davies e colaboradores (2000) avaliaram duas linhagens de células de CaP: as de baixo potencial invasivo (CAHPV10 e PZHPV7) e as de alto potencial invasivo (DU-145, PC-3, LNCap). Os autores demonstraram expressão de PECAM-1 apenas nas linhagens invasivas, sugerindo que a expressão desta MAC pode ter sido um fator contribuinte para o fenótipo mais agressivo.

Em relação à linhagem PC3, Scott e colaboradores (2001) desenvolveram um sistema *in vitro* para estudar as características da ligação desta linhagem celular. Os autores demonstraram que os anticorpos dirigidos contra as MACs P-selectina e VCAM-1 não apresentaram efeito significativo no bloqueio da ligação de PC3 ao endotélio da medula óssea.

Já no estudo de Tai e colaboradores (2014), foi demonstrado que a proteína derivada de osteoblastos condicionados (WISP-1) estimula a migração e a expressão da VCAM-1 em células humanas de CaP (PC3 e DU145). Posteriormente, Chang e colaboradores (2018), também demonstraram que a proteína WISP-1 aumentou a expressão de VCAM-1 em células CaP e, subsequentemente, promoveu a aderência de células cancerosas a osteoblastos. Estes dados sugerem que a migração das células CaP através da via de osteoblastos, ocorre por meio da regulação/ expressão VCAM-1.

Também tem sido investigado o envolvimento das selectinas no CaP e nas metástases. No estudo realizado por Glinskii e colaboradores (2005), os autores não encontraram correlação entre as selectinas e a presença de metástase, já que anticorpos bloqueadores direcionados contra E-selectina, L-selectina e P-selectina não inibiram a formação de depósitos metastáticos subpleurais em ratos.

Posteriormente, Gakhar e colaboradores (2013) analisaram a expressão, por imunofluorescência indireta, de E-selectina em 31 amostras de CTCs de pacientes com CaP e verificaram que as CTCs se ligam e interagem de forma estável com a E-selectina, demonstrando envolvimento desta molécula com o processo de metástase. Além disso, as amostras coletadas durante a progressão da doença demonstraram significativamente mais interações CTCs / E-selectina do que as amostras durante os períodos de resposta terapêutica.

Apenas dois estudos avaliaram os níveis séricos de MACs em homens com CaP (Lynch *et al.*, 1997; Perabo *et al.*, 2001). Lynch e colaboradores (1997) avaliaram pacientes com HPB, CaP após o tratamento e homens saudáveis. Os grupos não diferiram quanto aos níveis séricos de ICAM-1 e E-selectina. Os níveis de VCAM-1 foram significativamente elevados em pacientes com HBP e pacientes com CaP quando comparados a controles. Já Perabo e colaboradores (2001) examinaram 237 pacientes com câncer urológico, sendo 87 pacientes com CaP e 41 pacientes com HPB, bem como 42 controles saudáveis. Não houve diferença nos níveis séricos de MACs entre pacientes com CaP e controles. Em pacientes com CaP metastático, os níveis séricos de ICAM-1 e VCAM-1 mostraram uma tendência a correlacionar-se com a extensão da metástase, embora não houvesse diferença estatística entre pacientes com uma única lesão metastática e pacientes com múltiplas lesões.

1.2 Inibidor Do Ativador Do Plasminogênio Tipo 1 (PAI-1)

O PAI-1 é o mais potente inibidor fisiológico das quinases-ativadoras da plasminogênese: uroquinase (uPA) e ativador de plasminogênio tecidual (tPA). É essencial para a manutenção do equilíbrio fisiológico entre a coagulação e os sistemas de fibrinólise *in vivo*. A expressão anormal de PAI-1 é encontrada em muitas doenças e desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de câncer. A uPA desempenha um papel fundamental na migração e invasividade de células tumorais, determinando o aumento da atividade do plasminogênio e iniciando a cascata de proteólise que leva à degradação de ligações entre proteínas da matriz extracelular e perda de ligações intercelulares. O PAI-1 suprime diretamente a atividade proteolítica da uPA e reduz consideravelmente a meia-vida desta proteína, diminuindo as chances de metástases (CHOROSTOWSKA-WYNIMKO *et al.*, 2010) (Figura 2).

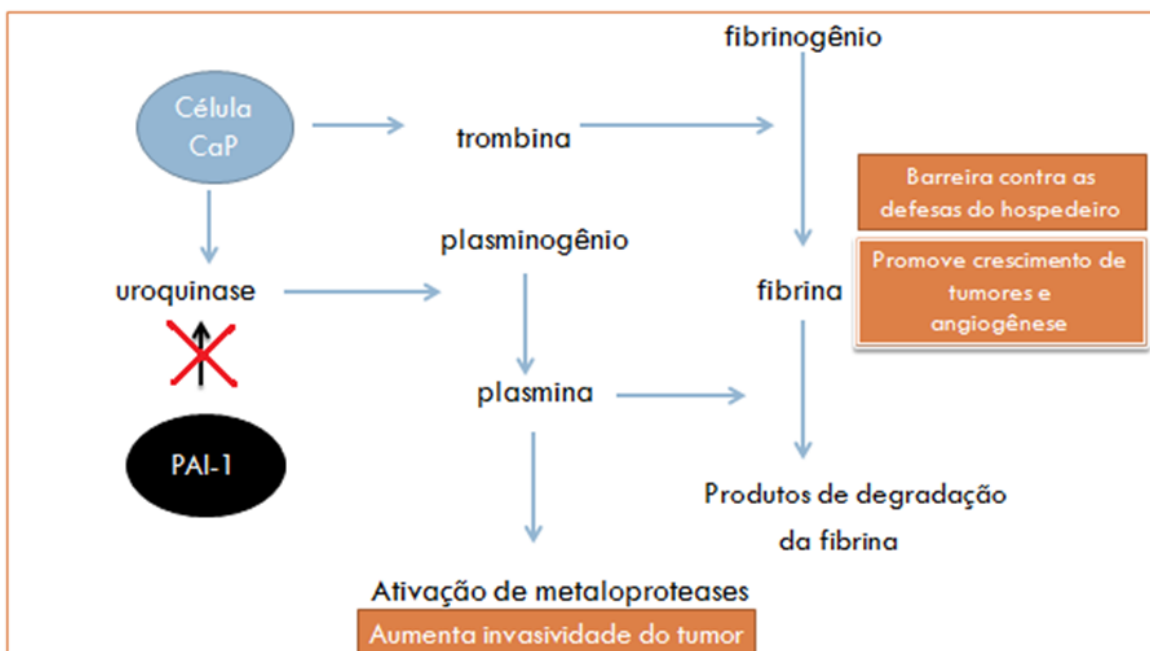


Figura 2. Regulação do Inibidor do Ativador do Plasminogênio tipo-1 (PAI-1) no sistema do plasminogênio e atividade fibrinolítica. Adaptado de Jorgenson *et al.* (2007)

Até a presente data, poucos estudos avaliaram o envolvimento do PAI-1 no CaP e nas metástases. Alguns estudos têm avaliado o PAI-1 em cultura de células de CaP e no plasma sanguíneo e os resultados tem sido discordantes.(JAKUN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; SHARIAT *et al.*, 2007; KUMANO *et al.*, 2009; GONDEK *et al.*, 2014; SERAFIN *et al.*, 2018.)

Estudos realizados em modelos animais demonstraram que a expressão de PAI-1 por células prostáticas malignas resultam em um fenótipo menos agressivo do tumor ou até inibição do crescimento do tumor, presumivelmente pela inibição da atividade de uPA (SOFF *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 2008). No entanto, outros estudos, realizados em cultura de células demonstraram, como efeito do PAI-1, um descolamento de células, o que poderia estar relacionado à disseminação de células cancerosas *in vivo*, além de que a adição de PAI-1 à cultura de células tumorais inibia a apoptose, fazendo com que ocorresse disseminação do tumor (KWAAN *et al.*, 2000; JAKUN *et al.*, 2007).

Estudos em humanos também têm apresentado resultados controversos. Shariat e colaboradores (2007) demonstraram que pacientes com CaP que apresentavam baixos níveis plasmáticos de PAI-1 no pré-operatório foram positivamente associados com a recorrência bioquímica, demonstrada pelo aumento dos níveis de PSA total. Já em 2009, Kumano e colaboradores avaliaram, por imunohistoquímica, tecidos prostáticos pós prostatectomia de pacientes virgens de tratamento e demonstraram que pacientes com forte expressão de PAI-1 tiveram desfechos bioquímicos desfavoráveis em comparação com aqueles com fraca expressão. No entanto, Gondek e colaboradores (2014) não encontraram diferença significativa nos níveis plasmáticos de PAI-1 em pacientes com CaP quando comparados a HPB. Posteriormente, Serafin e colaboradores (2018) demonstraram ainda, maiores níveis plasmáticos PAI-1 em pacientes com CaP do que em controles saudáveis. Embora esses resultados sejam conflitantes, deve-se destacar a dificuldade em comparar esses resultados uma vez que os delineamentos destes estudos, a fase da doença e a abordagem metodológica diferem consideravelmente.

A razão uPA/PAI-1 tem sido avaliada como indicador de CaP. Böhm e colaboradores (2013) encontraram aumento significativo da razão uPA/PAI-1 em tecido 16 pacientes CaP em relação aos 46 pacientes do grupo HPB. Posteriormente, outro estudo avaliou 70 pacientes com CaP em comparação à 30 pacientes com HPB e também demonstrou aumento desta relação com tendência a ser maior em pacientes mais velhos (AKUDUGU; SERAFIN; BÖHM, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Até o presente momento, poucos estudos avaliaram as MACs e o PAI-1, e nenhum deles avaliou, concomitantemente, o perfil plasmático destas moléculas em pacientes com CaP. Não está bem estabelecido o envolvimento conjunto destas moléculas no desenvolvimento de metástases e na estratificação do risco para metástase no CaP. As MACs e o PAI-1 desempenham um papel crucial na invasão e disseminação da doença; portanto, compreender esse processo se faz necessário para definir biomarcadores capazes de prever o comportamento biológico dos tumores de próstata.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi determinar os níveis plasmáticos das MACs e do PAI-1 e associá-los com a presença de metástases e a estratificação de risco para desenvolvimento de metástase em pacientes com CaP.

3.2. Objetivos Epecíficos

- Comparar o perfil de MACs (VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, E-selectina e P-selectina) em pacientes com CaP e homens saudáveis (controles);
- Avaliar os níveis plasmáticos de PAI-1 em pacientes com CaP e controles;
- Comparar marcadores inflamatórios em pacientes com CaP na presença ou não de metástase e indivíduos saudáveis;
- Determinar se o PAI-1 e as MACs estão associados à presença de metástases;
- Determinar a associação do PAI-1 e das MACs com a estratificação de risco para metástase no CaP;
- Comparar marcadores inflamatórios de acordo com a estratificação de risco para metástase em pacientes com CaP e indivíduos saudáveis.

4. SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 Delineamento e Amostragem

Este é um estudo observacional, prospectivo, do tipo caso-controle em que foram selecionados 213 homens, com idade entre 30 à 90 anos, sendo 149 pacientes com diagnóstico de CaP recrutados pelo Ambulatório de Urologia do Hospital do Câncer de Londrina e 64 homens livres da doença (grupo controle) selecionados entre pacientes que compareceram para o exame preventivo de rotina em consultório particular. Os participantes do grupo controle deveriam apresentar volume prostático inferior a 30 g determinados pela ultrassonografia transabdominal, exame de toque retal sem alterações e PSA total < 1,5 ng/mL. O diagnóstico de CaP foi estabelecido por biópsia da próstata. Os pacientes CaP apresentavam diferentes tipos de tratamento no momento da coleta: quimioterapia (n=16, 11%), radioterapia (n=16, 11%), hormonioterapia (n=37, 27%), tratamentos combinados: radioterapia e hormonioterapia (n=3, 2%); quimioterapia e radioterapia (n=4, 3%). Os medicamentos utilizados como antineoplásicos foram: docetaxel e bicalutamida; como hormonioterapia foram administrados os seguintes medicamentos: acetato de leuprorrelina, acetato de abiraterona, enzalutamida, acetato de ciproterona e goserrelina. Alguns indivíduos, ainda, estavam em uso de ácido zoledrônico, utilizado como inibidor da reabsorção óssea. Todos os participantes foram submetidos a uma avaliação clínica por um médico urologista. Os indivíduos responderam a um questionário padrão do estudo para avaliação dos dados antropométricos e clínicos.

Foram excluídos os participantes que faziam uso de suplementos antioxidantes e com presença de doenças autoimunes e infecciosas, história prévia de outros cânceres e doença renal crônica dialítica. Informações sobre hábitos de vida e uso medicamentos foram obtidas em uma avaliação clínica com médico urologista. A presença de SM foi definida seguindo o critério de *Adult Treatment Panel III* (ATP III), no qual SM é a presença de três ou mais dos seguintes critérios: 1) circunferência abdominal maior que 94 cm; 2) níveis de triglicérides maior ou igual a 150 mg/dL; 3) lipoproteína de alta densidade (HDL) abaixo de 40 mg/dL; 4) pressão arterial acima de 130/85 mmHg (ou uso de medicamento antihipertensivo) e;

5) níveis de glicemia maior ou igual a 100 mg/dL (ou uso de medicamento hipoglicemiante) (GRUNDY *et al.*, 2006).

Posteriormente, o grupo CaP foi subdividido em presença ou ausência de metástase, que foi definida pelo aumento de PSA, associado ou não aos exames de imagem, e também de acordo com a classificação de risco de recorrência da doença após tratamento, de acordo com o NCCN, o qual subdivide os pacientes, de acordo com o Gleason, pontuação TNM e os níveis de PSA total, em 6 grupos: 1- muito baixo risco; 2- baixo risco; 3- médio risco; 4- médio alto risco; 5-alto risco; 6- muito alto risco (NCCN, 2018). No presente estudo, os pacientes foram agrupados em: baixo risco (grupos 1 e 2), risco intermediário (grupo 3 e 4) e alto risco (grupos 5 e 6).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE: 56182916.7.0000.5231). O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os indivíduos.

4.2. Medidas antropométricas

Peso corporal foi medido anteriormente à coleta de sangue, usando uma balança eletrônica com acurácia de 0,1 kg, na qual os pacientes usavam roupas leves estavam descalços; altura foi medida com um estadiômetro de precisão de 0,1 cm. Índice de massa corporal (IMC) foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. Circunferência abdominal foi medida com uma fita métrica na região entre a última costela e a crista ilíaca sempre na posição ortostática.

4.3 Análises Laboratoriais

As amostras de soro e plasma foram obtidas a partir da centrifugação de sangue total do paciente, obtido em tubo de coleta sem anticoagulante ou com anticoagulante EDTA, respectivamente, por 15 minutos a 3.000 rpm para separação e foram aliqüotadas e armazenadas a -80°C até a realização dos testes.

A determinação de PSA total, PSA livre e ferritina foi realizada por quimioluminescência em micropartículas no equipamento Architect (CMIA; Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Os níveis séricos de Proteína C Reativa (PCR) foram determinados por turbidimetria de alta sensibilidade em equipamento

Architect (C8000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Os valores de leucócitos totais e plaquetas foram obtidos em equipamento hematológico (BC-6800, Mindray, Shenzhen, China) e velocidade de hemossedimentação (VHS) foi realizada em equipamento automatizado (Teste1, Alifax, Poverara, Itália).

A dosagem das MACs (PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1, P-selectina e E-selectina) e do PAI-1 foi realizada por imunofluorimetria utilizando conjunto e reagentes multiplex pela plataforma Luminex[®] (Human Magnetic Adhesion 6-Plex Panel; Novex, Life Technologies, Frederick, USA).

4.4 Análise Estatística

Os dados categóricos foram avaliados pelo teste de qui-quadrado. Para verificar a distribuição dos dados foi utilizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para avaliar a homogeneidade das variâncias foi utilizado teste de Levene. Dados que não apresentaram distribuição normal ou homogeneidade das variâncias foram transformados em logaritmo natural (Ln) e retestados. Os dados paramétricos foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os dados foram expressos como mediana e interquartis (25%-75%). Diferença estatística foi considerada quando $p < 0,05$. Para determinar associações, foi realizada a regressão logística multinomial. Foram incluídas nos testes de regressão logística as variáveis que apresentarem valor de $p < 0,1$ na análise univariada, *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% foram demonstrados. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS versão 20.0 (IBM EUA).

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação foram apresentados e discutidos no artigo científico intitulado “***Cell adhesion molecules in patients with prostate cancer: association with the presence of metastasis***” que será submetido à periódico científico Clinical and Translational Oncology (Fator de Impacto: 2.392).

Cell adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor type-1 in patients with prostate cancer: association with the presence of metastasis and risk stratification

Ana Gabriela da Silva Bonacini¹, Rubens Cecchini², Andréa Name Colado Simão³.

1. Laboratory of Research in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.
2. Laboratory of Pathophysiology of Free Radicals, Department of Patology Sciences – State University of Londrina, Brazil.
3. Laboratory of Research in Applied Immunology, Department of Patology, Clinical Analysis and Toxicology – State University of Londrina, Brazil.

Corresponding author: Andréa Name Colado Simão

Postal address: Department of Patology, Clinical Analysis and Toxicology – Avenida Robert Koch, n.60. State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. CEP 86038-440. Tel.: +55-43-3371-2321; Fax +55-43-3371-2619.

E-mail address: deianame@yahoo.com.br

ABSTRACT

Background: Prostate cancer (PCa) is the most frequent prostatic diseases in aging men. Cell adhesion molecules (CAMs) play a crucial role in metastasis processes. Abnormal expression of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) is related to cancer. **Objective:** To determine the profile of CAMs and PAI-1 and associate them with the presence of metastasis and risk stratification for metastasis in PCa. **Subjects and Methods:** 149 patients with PCa, without metastasis (Met-,n=108) and with metastasis (Met+,n=41) and 64 controls. Further, PCa group were subdivided according to the risk stratification following the National Comprehensive Cancer Network Guidelines: low risk (n=28); intermediate risk (n=41); high risk (n=77). Plasma levels of platelet endothelial cell adhesion molecule-1(PECAM-1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), E-selectin, P-selectin and PAI-1 were measurement. **Results:** PCa Met+ were significantly distinguished from controls by decreased PECAM-1 ($p=0.029$; OR:1.000; 95%CI:0.999-1.000) and PAI-1 ($p=0.020$; OR:1.000; 95%CI:1.000-1.000); and differed from PCa Met- by decreased VCAM-1 ($p=0.043$; OR:1.000; 95%CI:1.000-1.000). Levels of P-selectin ($p=0.031$; OR:1.000; 95%CI:1.000-1.000) and PAI-1 ($p=0.017$; OR:1.000; 95%CI: 1.000-1.000) decreased between PCa Met- when compared to controls. These results were adjusted by age, inflammation, prostate size and presence of MetS. Levels of PECAM-1 among the high risk group were lower than the intermediated risk ($p=0.039$; OR:1.000; 95%CI:1.000-1.000). These results were adjusted by age and inflammation. **Conclusion:** VCAM-1 may be differ metastatic PCa, independently of age, prostate size, presence of MetS, and inflammation. PECAM-1 may be differentiate patients with high risk for metastasis from those with intermediate risk, independently of age and inflammation.

Key Words: Prostate Cancer, Cell Adhesion Molecules, Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), Metastasis, VCAM-1, PECAM-1.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most frequent prostatic disease in aging men. The incidence of distant disease in PCa has, in fact, decreased over the last few years as a result of screening men >50 years, that consequently influences the

mortality rate [1]. Cancer metastasis is the culmination of a complex series of steps: cell chemotaxis, cell adhesion, and selective tumor growth; where the cancer cells degrade the extracellular matrix allowing these cells to break down the primary tumor barrier and move into circulation and subsequent trafficking to and colonization of distant tissues [2].

Cell adhesion molecules (CAMs) are a complex network of protein and carbohydrate molecules that mediate cell-cell and cell-matrix interactions in organ development, proliferation, differentiation, tumor invasion, and play a crucial role in metastasis processes. CAMs include endothelial adhesion molecules, such as Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), selectins (E-selectin and P-selectin), and integrins [3].

Decrease expression of E-selectin and VCAM-1 caused significant inhibition of growth in the cell line derived from primary prostate carcinoma [4], whereas increased levels of VCAM-1 [5,6], ICAM-1 [7], and PECAM-1 [1] are associated with brain and bone metastasis, as well as a more aggressive tumor phenotype.

Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) is the most potent physiological inhibitor of plasminogen-activating kinases such urokinase (uPA), and tissue plasminogen activator (tPA). It is essential for the maintenance of physiological balance between the coagulation and fibrinolysis systems *in vivo*. Abnormal PAI-1 expression is found in many diseases and plays a key role in the development of cancer. PAI-1 directly suppresses the proteolytic activity of uPA and considerably reduces the half-life of this protein, thus decreasing the chances of metastasis [8].

Previous observations had paradoxically shown that the expression of PAI-1 in PCa predicted remission or progression of cancer. Some authors have shown that the expression of PAI-1 is associated to less aggressive cancer and to inhibit tumor growth [9,10], whereas others reported that PAI-1 inhibits apoptosis and could be related to the spread of cancer cells [11,12]. Therefore, patients with strong expression of this protein have unfavorable biochemical outcomes [13, 14]. Those findings suggest that soluble CAMs and PAI-1 could be important biomarkers to monitor the recurrence of PCa and predict its behavior. However, to date, scarce information is available about the association between CAMs and PAI-1 plasma levels in patients with PCa. In addition, previous studies evaluate CAMs isolated and not determinate a profile from patients with PCa. Thus, the aim of this study was to

determine the profile of CAMs and PAI-1 in PCa patients and to associate them with the presence of metastasis and the different degrees of risk for metastasis in this disease.

Subjects and Methods

Participants

This is a prospective case-control study that consisted of 213 subjects with age from 30 to 90 years, 149 patients with PCa diagnosed at the Uro-oncology clinic of the Cancer Hospital of Londrina and 64 healthy volunteers (control group). Patients included in this study were diagnosed with PCa based on histological evaluation (positive prostate biopsy). Patients presented different types of treatment at the time of collection: chemotherapy (n=16, 11%), radiotherapy (n=16, 11%), hormone therapy (n=37, 27%), combined treatments radiotherapy and hormone therapy (n=3, 2%); chemotherapy and radiotherapy (n=4, 3%). Ethnicity was self reported as caucasian and not caucasian. The participants in the control group should have prostate volume up to 30 cm³ (measured by transabdominal ultrasound) and PSA total < 1.5 ng/mL. The exclusion criteria were use of anti-inflammatory drugs, use of antioxidant supplements, presence of inflammatory diseases and/or acute or chronic infectious, prior history of other cancers and dialytic kidney failure. PCa group was subdivided in two groups: without metastasis (Met-, n=108) and with metastasis (Met+, n=41), based on image exams. Further, PCa groups were subdivided according to the risk stratification of the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines [15]: Group A (n=28): very low and low risk; group B (n=41): favorable and unfavorable intermediate risk group; Group C (n=77): high and very high risk group.

Informed consent was given by all the subjects included in this work. The Human Ethics Committee from the State University of Londrina approved the protocol number: CAAE 56182916.7.0000.5231.

Anthropometric measurements

Body weight was measured prior to blood collection, using electronic scales accurate to 0.1 kg, with patients wearing light clothings and no shoes; height was measured to a precision of 0.1 cm using a stadiometer. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. Waist circumference (cm)

was measured with a soft tape in the region between the last rib and the iliac crest, always in the orthostatic position.

Laboratory analysis

Peripheral blood samples were collected with EDTA as anticoagulant and without anticoagulant after fasting for 12 h. All of the samples were immediately centrifuged at 3000g for 15 min, and the plasma and sera aliquots, respectively, were stored in the -80°C until use. The samples were consecutively identified by number to guarantee confidentiality. Serum levels of ferritin, free PSA (fPSA) and total PSA (tPSA) were determined using a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA; Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Serum levels of C-reactive protein (CRP) were determined by high sensitive turbidimetry (C8000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). The values of total leukocytes and platelets were obtained by reading in hematological equipment (BC-6800, Mindray, Shenzhen, China) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) was performed in automated equipment (Teste1, Alifax, Polverara, Itália).

Metabolic Syndrome (MetS) was defined following the Adult Treatment Panel III criteria, where MetS is present if three or more of the following five criteria are met: 1) waist circumference over 94 cm; 2) fasting triglyceride levels greater than or equal to 150 mg/dL; 3) high density lipoprotein (HDL) lower than 40 mg/dL; 4) blood pressure over 130/85 mmHg (or antihypertensive medication use) and; 5) fasting glucose levels greater than or equal to 100 mg/dL or the use of hypoglycemic medication [16].

CAMs and PAI-1 measurement

Plasma levels of PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, P-selectin and PAI-1 were determined by immunofluorimetric assay using Luminex® platform (Human Magnetic Adhesion 6-Plex Panel; Novex, Life Technologies, Frederick, USA).

Statistical analysis

Categorical variables were evaluated using the chi-square test and the data were expressed in absolute number (%). To verify the distribution of the data, a Shapiro-Wilk normality test was used. To evaluate the homogeneity of the variances, a Levene test was used. Data that did not show normal distribution or homogeneity of

the variance were transformed into natural logarithm (Ln) and retested for normality. Parametric data were evaluated by the analysis of variance (ANOVA) with post test of Bonferroni. Data were expressed as mean \pm Standard deviation (\pm SD). Non-parametric data were assessed by the Kruskal-Wallis test with Dunn's post test. Data were expressed as median and interquartile range (25%-75%). The variables that presented in the univariate analysis $p < 0.10$ were included in the multivariate logistic regression model. Odds ratio and confidence interval were calculated. Statistical difference was considered when $p < 0.05$. All statistical analyzes were analyzed using statistical software SPSS version 22.0 (IBM, USA).

Results

The characteristics of PCa patients Met+ and Met- are presented in Table 1. The individuals did not differ in ethnicity ($p = 0.483$), but PCa patients are older than control group ($p < 0.001$). PCa Met+ patients has higher frequency of MetS when compared control group ($p = 0.025$). PCa Met+ showed increased levels of CRP ($p = 0.007$), ESR ($p < 0.001$) and number of platelets ($p = 0.027$) when compared to control group. PCa Met+ showed increased ESR value when compared with PCa Met- ($p < 0.001$) and control group ($p < 0.001$). As expected, levels of tPSA and prostate size were significantly higher in the PCa patients when compared to controls ($p < 0.001$). In addition, PCa Met+ had higher levels of fPSA when compared to PCA Met- ($p = 0.005$) and control group ($p = 0.004$). Therefore, PCa groups also differ about fPSA ($p < 0.001$).

PCa Met+ and PCa Met- groups showed decreased of PECAM-1 ($p < 0.001$, $p = 0.011$) when compared to control group, respectively. In addition, PCa Met+ also demonstrated decreased levels of PECAM-1 ($p < 0.001$) when compared to PCa Met-. Therefore, VCAM-1 ($p < 0.001$, $p < 0.001$), ICAM-1 ($p < 0.001$, $p = 0.005$), P-selectin ($p < 0.001$, $p < 0.001$) and E-selectin ($p < 0.001$, $p < 0.001$) levels were lower among PCa Met+ than control group and PCa Met-, respectively (Table 1). Plasma levels of PAI-1 were decreased among PCa Met- and PCa Met- ($p < 0.001$, $p < 0.001$) when compared control group, respectively; and PCa Met- when compared PCa Met+ ($p = 0.018$) (Figure 1).

The Table 2 shows the outcome of a multinomial logistic regression analysis with the two groups of PCa patients and controls as dependent variable and age,

MetS, CRP, ESR, leukocytes, platelets, prostate size, CAMs, and PAI-1 as explanatory variables. PCa Met+ were significantly distinguished from controls by increased ESR (OR: 1.260, 95% CI: 1.014-1.566, $p=0.037$) and decreased of PECAM-1 (OR: 1.000, 95% CI: 0.999-1.000, $p=0.029$) and PAI-1 (OR: 1.000, 95% CI: 1.000-1.000, $p=0.020$). PCa Met+ differ from PCa Met- by increased ESR (OR: 0.906, 95% CI: 0.842-0.975, $p=0.008$) and decreased of VCAM-1 (OR: 1.000, 95% CI: 1.000-1.000, $p=0.043$). Prostate size was significantly higher among PCa Met+ versus PCa Met- (OR: 0.881, 95% CI: 0.785-0.988, $p=0.031$) and control groups (OR: 1.999, 95% CI: 1.279-3.126, $p=0.002$). Levels of P-Selectin (OR: 1.000, 95% CI: 1.000-1.000, $p=0.031$) and PAI-1 (OR: 1.000, 95% CI: 1.000-1.000, $p=0.017$) decreased significantly among PCa Met- when compared to control group. After inclusion of the treatment in the regression models, the results remained significant.

When patients were divided according to the risk stratification for metastasis (Table 3), we found that those presented high risk are older ($p=0.001$) than those with low risk but did not differ in ethnicity ($p=0.975$) and MetS frequency ($p=0.180$). According to inflammatory parameters, total leukocytes ($p=0.05$) and ferritin ($p=0.789$) did not differ among the three groups, although plasma levels of CRP and ESR were increased in group high risk for metastasis when compared with low ($p=0.003$; $p<0.001$) and intermediate ($p=0.007$; $p<0.001$) risk, respectively. There was no significant difference in serum levels of tPSA ($p=0.432$), fPSA ($p=0.098$), prostate size ($p=0.139$) and platelets count ($p=0.865$) among groups. Patients with high risk for metastasis showed decreased serum levels of PECAM-1 ($p<0.001$), VCAM-1 ($p=0.005$), P-Selectin ($p=0.009$) and E-Selectin ($p=0.024$) when compared with intermediated risk, and decreased serum levels of PECAM-1 ($p=0.014$), when compared with those with low risk. However, no significant difference was observed in serum levels of ICAM-1 among groups ($p=0.436$). Serum levels of PAI-1 were lower in high risk patients when compared to intermediate risk for metastasis ($p=0.007$) (Figure 2).

The Table 4 shows the outcome of a multinomial logistic regression analysis with the groups of PCa patients divided according to the risk stratification for metastasis as dependent variable and age, CRP, ESR, leukocytes, CAMs, and PAI-1 as explanatory variables. Patients classified as low risk for metastasis are younger than those with intermediated risk (OR: 1.107, 95% CI: 1.023-1.198, $p=0.012$) but did not differ from those with high risk. Patients classified as high risk for metastasis

showed higher levels of ESR when compared with those with low risk (OR: 1.075, 95%CI: 1.013-1.140, $p=0.017$) and intermediated risk (OR: 0.935, 95%CI: 0.897-0.974, $p=0.001$). Levels of PECAM-1 into high risk group were lower than intermediated risk (OR: 1.000, 95%CI: 1.000-1.000, $p=0.039$). PAI-1 was not associated with risk stratification for metastasis. After inclusion of the treatment in the regression models, the results remained significant.

Discussion

The main finding of the present study was that CAMs were associated with metastasis, independently of age, MetS, prostate size, and inflammation. PECAM-1 was able to differ patients with PCa Met+ from control group while P-selectin differs PCa Met+ from PCa Met- and control. In addition, low levels of VCAM-1 can discriminate PCa Met+ from PCa Met-. Furthermore, low levels of PAI-1 can distinguish PCa Met+, Met- and healthy individuals. In addition, this study showed that CAMs were associated with risk stratification for metastasis independently of age and inflammation. Patients classified as high risk for development of metastasis could be differentiated from patients with intermediated risk through the levels of PECAM-1.

In the present study, PCa Met+ patients demonstrated lower levels of PECAM-1 than controls. There is no study that evaluated PECAM-1 in plasma. However, a previous study performed on cell culture showed expression of PECAM-1 only in invasive strains, suggesting that the expression of this CAM may be a contributing factor for the more aggressive phenotype of PCa [1].

Previous studies showed association between ICAM-1 and VCAM-1 in PCa patients. [3,17]. According to VCAM-1, our data demonstrated that PCa Met+ patients showed lower VCAM-1 plasma levels when compared with PCa Met-. Previous studies demonstrated increased VCAM-1 expression in human PCa cells, suggesting that the increase of this CAM promotes the migration of PCa cells through the osteoblast pathway [5,6]. In addition, a study [17] evaluated the serum levels of CAMs by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and VCAM-1 levels did not differ between PCa patients and controls. We did not find difference in ICAM-1 plasma levels between PCa patients and control groups. Our data are in agreement with Perabo et al. (2001) that also demonstrated that ICAM-1 not differ between PCa patients and controls. However, another study [7] demonstrated elevated ICAM-1

serum levels in three prostate cell lines, such as cell line derived from cerebral metastasis (DU 145), cell line derived from bone metastasis (PC 3) and cell line derived from primary prostate carcinoma (ND1). In relation to P-selectin, its levels were significantly reduced in serum from PCa Met- patients when compared to control group. However, previous studies did not find significant differences on inhibition of metastasis in bone cell lines through the use of antibodies directly against the P-selectin [18] and no correlation was found between the selectin and murine pleural metastases [19].

Therefore, we hypothesize that CAMs expression could be increased in tissue whereas the free fraction, represented by plasma levels is decreased in PCa patients. It is possible that plasma levels do not reflect the tissue expression of MACs of patients with PCa Met+. However, the decrease in plasma levels may accurately reflect the participation of MACs in the metastatic process. It is important to emphasize that the measurement of plasma levels of MACs is a less invasive method than the obtaining of prostatic tumor tissue and allows the evaluation of the tissue expression of MACs. In addition, those discrepancies in the results may be explained by difference in study design and methodology used.

Regarding the role of PAI-1 in the pathophysiology of PCa, there have been conflicting results. Our data showed that plasma levels of PAI-1 in PCa Met+ and PCa Met- were lower than in control group. While a study [20] demonstrated elevated levels of PAI-1 in PCa patients, other studies performed on cell culture showed that expression PAI-1 result in a less aggressive phenotype tumor [9,10]. In addition, PAI-1 directly suppresses the proteolytic activity of uPA and significantly reduces the half-life of this protein, thus decreasing the chances of metastasis [8]. The possible explanation for these conflicting results could be that three different sample types were used: prostate resection tissue, needle biopsies, and plasma.

We also evaluated biomarkers involved in stage of risk for metastasis. Although PSA was widely used as a biomarker for screening of PCa, it does not distinguish the different degrees of risk for development of metastasis in PCa.

To date, to our knowledge, only one study [17] compared the serum levels of CAMs according to stage T, stage N, tumor grade, and extent of metabolism in the control group and patients with PCa. The authors demonstrated that the elevated ICAM-1 and VCAM-1 serum levels are not stage dependent; on the contrary, they demonstrate a wide range and highly variable throughout the different stages.

Differently from these authors, we demonstrated that decreased PECAM-1 plasma levels could differ patients with high risk for metastasis from patients with intermediate risk, independently of age and inflammation. Serum levels of PAI-1 were lower in high risk patients when compared to intermediate risk; however after logistic regression, the values do not remained statistical significant. However, there are no studies that had evaluated PAI-1 according to risk stratification for metastasis in PCa.

The main limitation of the present study is the cross-sectional design, which does not allow make inferences on causal relationships. However, it has some strength, such as the fact that CAMs and PAI-1 were evaluated with a Luminex[®] platform, a more sensitive methodology than ELISA, as reported in previous studies. Furthermore, this study used a robust multivariate statistical approach, which allows controlling for many possible confounding variables including age, prostate size, MetS, and inflammation.

In conclusion, our data demonstrated that PECAM-1, P-selectin, and PAI-1 play an important role in pathophysiology of PCa, but only VCAM-1 may be differ the presence of metastasis, independently of age, prostate size, MetS, and inflammation. In relation to risk stratification for metastasis, only PECAM-1 could be used to predict patients with high risk for metastasis from patients with intermediate risk, independently of age and inflammation. This is a first study to evaluated CAMs profile in PCa patients according to the presence of metastasis and risk stratification for development of metastasis. More studies *in vivo* are necessary to investigate the complex involvement of CAMs profile and PAI-1 in cancer and metastasis process.

Acknowledgements

This study was supported by the National Council of Brazilian Research-CNPq and Araucária Foundation from the state of Paraná. We thank the University Hospital of State University of Londrina and HUTec Foundation for technical and administrative supports.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent

All the participants included in this study provided written informed consent.

References

1. Davies G.; Jiang WG; Mason MD. Cell adhesion molecules and prostate cancer invasion. *The journal of urology*, 2000; 163:985–992.
2. Cooper CR; Pienta KJ. Cell adhesion and chemotaxis in prostate cancer metastasis to bone: a minireview. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2000; 3:6-12.
3. Lynch et al. Serum levels of endothelial and neural cell adhesion molecules in prostate cancer. *The prostate*, 1997; 32:214–220.
4. Brayton J et al. Influence of adhesion molecule expression by human brain microvessel endothelium on cancer cell adhesion. *Journal of neuroimmunology*, 1998,104–112.
5. Tai HC et al. Osteoblast-derived wisp-1 increases vcam-1 expression and enhances prostate cancer metastasis by down-regulating mir- 126. *Oncotarget*, 2014; 5:17.
6. Chang AC et al. Osteoblast-secreted wisp-1 promotes adherence of prostate cancer cells to bone via the vcam-1/integrin a4b1. *System cancer letters*, 2018;426.
7. Rokhlin OW; Cohen MB. Expression of cellular adhesion molecules human prostate tumor cell lines. *The prostate*, 1995, 26:205-212.
8. Chorostowska-wynimko J. et al. Cell phenotype determines PAI-1 antiproliferative effect- suppressed proliferation of the lung cancer but not prostate cancer cells. *Pneumonologia i alergologia polska*, 2010; 78: 279–283.

9. Soff et al. Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J. Clin. Invest.* 1995; 96:2593-2600.
10. Chen SC; Henry DO; Reczek PR; Wong MK. Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits prostate tumor growth through endothelial apoptosis. *Mol cancer.* 2008; 7:1227-1236.
11. Kwaan HC et al. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumor growth through inhibition of apoptosis. *British journal of cancer.* 2000; 82:1702–1708.
12. Jankun J et al. PAI-1 induces cell detachment, downregulates nucleophosmin (b23) and fortilin (tctp) in Incap prostate cancer cells. *International journal of molecular medicine.* 2007; 20:11-20.
13. Kumano M et al. Expression of urokinase-type plasminogen activator system in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *Urologic oncology: seminars and original investigations.* 2009; 27:180–186.
14. Shariat SF et al. Plasminogen activation inhibitor-1 improves the predictive accuracy of prostate cancer nomograms. *The journal of urology.* 2007, 178:1229-1237.
15. National comprehensive cancer network.
<https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/>. Accessed 06 Dec 2018.
16. Grundy SM et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an american heart association/national heart, lung, and blood institute scientific statement. *Current opinion cardiology.* 2006; 21:1-6.
17. Perabo F et al. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin in urological malignancies. *Indian J Cancer.* 2001; 38:1-7.
18. Scott LJ et al. Interactions of human prostatic epithelial cells with bone marrow endothelium: binding and invasion. *British Journal of cancer.* 2001; 84:1417–1423.
19. Glinskii O. et al. Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs. *Neoplasia.* 2005; 7: 522-7.
20. Serafin AM; Chinhengo A; Fernandez P; Akudugu JM. The malignancy index in plasma samples as a prostate cancer biomarker. *Discov med.* 2018; 25:235-242.

Table 1. Characteristics of prostate cancer patients with (PCa Met+) and without metastasis (PCa Met-) and healthy controls (HC)

Qui-Square Test. Data are expressed as absolute number (%). ANOVA with post hoc Bonferroni. Data are expressed as mean (\pm SD). Kruskal-Wallis Test compared post-hoc of Dunn. Data are expressed as median (25%-75%). C: Caucasian; NC: not Caucasian; N: No; Y:Yes; MetS: Metabolic Syndrome; CRP: C-reactive protein. ESR: erythrocyte sedimentation rate. tPSA: Prostate-Specific Antigen Total. fPSA: Prostate-Specific Antigen Free. PECAM-1: Platelet endothelial cell *adhesion molecule*; VCAM-1: Vascular cell adhesion protein 1; ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1; PAI-1: plasminogen activator inhibitor type-1.

| Characteristics | HC (A) n=64 | PCa Met- (B) n=108 | PCa Met+ (C) n=41 | P value | A x B | A x C | B x C |
|-----------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Ethnicity (C/NC) (%) | 57 (89.0) / 7 (11.0) | 84 (77.7)/24 (22.3) | 33 (80.4)/8 (19.6) | 0.483 | NS | NS | NS |
| Age (year) | 49 (45-57) | 66 (59-70) | 67 (62-75) | <0.001 | <0.001 | <0.001 | NS |
| MetS (N/Y) (%) | 44 (68.7)/20 (31.3) | 59 (54.6)/49 (45.4) | 19 (46.3)/22 (53.7) | 0.058 | NS | 0.025 | NS |
| CRP (mg/L) | 1.750 (1.0-5.1) | 1.80 (0.8-4.2) | 4.15 (1.45-6.9) | 0.009 | NS | 0.007 | NS |
| ESR (mm/hr) | 9 (5-14) | 15 (8-28) | 38 (27-64) | <0.001 | 0.010 | <0.001 | <0.001 |
| Leukocytes (cells/uL) | 6724 (2019) | 6407 (1801) | 7836 (2481) | 0.001 | NS | 0.022 | <0.001 |
| Platelets (mil/uL) | 230 (206-265) | 212 (182-246) | 239 (206-297) | 0.012 | NS | 0.027 | NS |
| Ferritin (μ g/L) | 224.4 (123.0-384.7) | 215.1 (141.8-343.3) | 223.7 (127.3-538.7) | 0.496 | NS | NS | NS |
| tPSA (ng/mL) | 0.626 (0.423-0.936) | 5.60 (0.535-9.005) | 14.01 (0.807-60.100) | <0.001 | <0.001 | <0.001 | NS |
| fPSA (ng/mL) | 0.183 (0.131-0.267) | 0.445 (0.107-0.943) | 1.857 (0.178-10.466) | <0.001 | 0.004 | <0.001 | 0.005 |
| Prostate Size (g) | 20 (20-30) | 40 (30-40) | 40 (40-55) | <0.001 | <0.001 | <0.001 | NS |
| PECAM-1 (pg/mL) | 49489.6 (38853.9-57745.7) | 18578.9 (13827.0-46361.1) | 15581.9 (14037.0-17922.2) | <0.001 | 0.011 | <0.001 | <0.001 |
| VCAM-1 (pg/mL) | 1033270.1 (751790.9-1563851.2) | 471590 (329956.9-86246.8) | 408573.8 (328999.7-518411.1) | <0.001 | NS | <0.001 | <0.001 |
| ICAM-1 (pg/mL) | 272757.5 (94882.1-2040131.6) | 131466.3 (42957.7-418744.6) | 70828.1 (32605.1-204269.5) | <0.001 | NS | <0.001 | 0.005 |
| P-SELECTIN (pg/mL) | 120582.1 (86829.8-157457.5) | 62611.4 (38505.4-124020.4) | 46382.1 (39831.7-57120.2) | <0.001 | 0.020 | <0.001 | <0.001 |
| E-SELECTIN (pg/mL) | 244934.8 (174607.5-340815) | 74837.5 (48426.3-170910.4) | 66243 (50806.4-74565.8) | <0.001 | NS | <0.001 | <0.001 |

Table 2. Multinomial Logistic regression analyses with prostate cancer patients divided into cancer with metastasis (C), without metastasis (B), and health control (A) as dependent variables and age, metabolic syndrome, CRP, ESR, Leukocytes, Platelets, Prostate size, Adhesion molecules and Plasminogen activator inhibitor-1 as explanatory variables

| Variables | Wald for contrasts | P value | OR | 95% CI |
|-----------------------|--------------------|--------------|--------|----------------|
| Age (year) | A vs B: 3.085 | 0.079 | 1.276 | 0.972-1.676 |
| | A vs C: 1.077 | 0.299 | 1.168 | 0.871-1.567 |
| | B vs C: 2.272 | 0.132 | 1.093 | 0.974-1.226 |
| MetS (Y/N) | A vs B: 2.347 | 0.126 | 19.802 | 0.434-903.204 |
| | A vs C: 2.372 | 0.124 | 26.741 | 0.408-1751.388 |
| | B vs C: 0.120 | 0.729 | 0.741 | 0.136-4.042 |
| CRP (mg/L) | A vs B: 2.086 | 0.149 | 0.863 | 0.706-1.054 |
| | A vs C: 2.544 | 0.111 | 0.847 | 0.691-1.039 |
| | B vs C: 0.588 | 0.443 | 1.018 | 0.973-1.065 |
| ESR (mm/hr) | A vs B: 1.617 | 0.204 | 1.142 | 0.931-1.400 |
| | A vs C: 4.340 | 0.037 | 1.260 | 1.014-1.566 |
| | B vs C: 6.953 | 0.008 | 0.906 | 0.842-0.975 |
| Leukocytes (cells/uL) | A vs B: 0.029 | 0.864 | 0.897 | 0.259-3.112 |
| | A vs C: 0.243 | 0.622 | 0.709 | 0.181-2.781 |
| | B vs C: 0.639 | 0.424 | 1.265 | 0.710-2.254 |
| Platelets (mil/uL) | A vs B: 1.814 | 0.178 | 0.966 | 0.918-1.016 |
| | A vs C: 1.813 | 0.178 | 0.964 | 0.915-1.017 |
| | B vs C: 0.036 | 0.849 | 1.001 | 0.987-1.016 |
| Prostate Size (g) | A vs B: 6.595 | 0.010 | 1.761 | 1.143-2.711 |
| | A vs C: 9.230 | 0.002 | 1.999 | 1.279-3.126 |
| | B vs C: 4.674 | 0.031 | 0.881 | 0.785-0.988 |
| PECAM-1 (pg/mL) | A vs B: 2.856 | 0.091 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | A vs C: 4.756 | 0.029 | 1.000 | 0.999-1.000 |
| | B vs C: 1.879 | 0.170 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| VCAM-1 (pg/mL) | A vs B: 0.133 | 0.715 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | A vs C: 3.449 | 0.063 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | B vs C: 4.109 | 0.043 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| ICAM-1 (pg/mL) | A vs B: 1.689 | 0.194 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | A vs C: 3.788 | 0.052 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | B vs C: 2.234 | 0.135 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| P-SELECTIN (pg/mL) | A vs B: 4.659 | 0.031 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | A vs C: 1.412 | 0.235 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | B vs C: 0.818 | 0.366 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| E-SELECTIN (pg/mL) | A vs B: 0.293 | 0.588 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | A vs C: 0.510 | 0.475 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | B vs C: 0.277 | 0.599 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| PAI-1 (pg/mL) | A vs B: 5.689 | 0.017 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | A vs C: 5.417 | 0.020 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | B vs C: 0.340 | 0.560 | 1.000 | 1.000-1.000 |

A: healthy controls, B: prostate cancer without metastasis; C: prostate cancer with metastasis, OR: odds ratio, CI confidence interval (lower-upper limit), MetS: Metabolic Syndrome; Y/N: yes/no, CRP: C-reactive protein. ESR: erythrocyte sedimentation rate. PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule; VCAM-1: Vascular cell adhesion protein 1; ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1; PAI-1: plasminogen activator inhibitor type-1.

Table 3. Characteristics of prostate cancer patients classified according to the risk stratification

| Characteristics | Low Risk (A) n= 28 | Intermediate Risk (B) n=41 | High Risk (C) n=77 | P value | AxB | AxC | BxC |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------|--------------|------------------|------------------|
| Ethnicity (C/NC)(%) | 22 (78.5)/6 (21.5) | 33 (80.4)/8 (19.6) | 60 (77.9)/17 (22.1) | 0.975 | NS | NS | NS |
| Age (year) | 61 (8) | 65 (7) | 67 (8) | 0.001 | 0.046 | 0.001 | NS |
| MetS (N/Y) (%) | 17 (60.7)/11 (39.3) | 25 (60.9)/16 (39.1) | 35 (45.4)/42 (54.6) | 0.180 | NS | NS | NS |
| CRP (mg/L)* | 1.893 (1.647) | 5.063 (13.272) | 10.587 (25.177) | <0.001 | NS | 0.003 | 0.007 |
| ESR (mm/hr) | 9 (5-15) | 12 (7-23) | 30 (20-54) | <0.001 | NS | <0.001 | <0.001 |
| Leukocytes (cells/uL) | 6.365 (1.686) | 6.385 (1.537) | 7.250 (2.413) | 0.050 | NS | NS | NS |
| Platelets (mil/uL) | 223 (182-249) | 217 (185-257) | 224 (191-263) | 0.865 | NS | NS | NS |
| Ferritin (µg/L)* | 255.1 (168.6) | 278.0 (261.6) | 369.9 (473.7) | 0.789 | NS | NS | NS |
| tPSA (ng/mL) | 6.403 (4.863-8.424) | 5.690 (0.559-8.970) | 6.010 (0.458-28.150) | 0.432 | NS | NS | NS |
| fPSA (ng/mL) | 0.589 (0.333-1.000) | 0.412 (0.171-0.701) | 0.698 (0.061-3.000) | 0.098 | NS | NS | NS |
| Prostate Size (g) | 40 (30-40) | 40 (30-40) | 40 (30-50) | 0.139 | NS | NS | NS |
| PECAM-1 (pg/mL) | 28545.3 (13670.7-56726.7) | 31177.8 (15540.8-51462.4) | 15408.6 (13443.2-18802.4) | <0.001 | NS | 0.014 | <0.001 |
| VCAM-1 (pg/mL) | 523267.4 (321373.5-887626.3) | 602666.3 (368764.8-983117.5) | 397428.2 (315555.0-561183.3) | 0.004 | NS | NS | 0.005 |
| ICAM-1 (pg/mL) | 82607.9 (46784.5-275377.8) | 127545.0 (45488.3-604284.4) | 145564.2 (35174.8-317480.9) | 0.436 | NS | NS | NS |
| P-SELECTIN(pg/mL) | 91580.5 (31080.0-140757.1) | 88662.2 (41732.2-164267.8) | 46739.6 (39831.7-61021.4) | 0.006 | NS | NS | 0.009 |
| E-SELECTIN(pg/mL) | 115606.5 (47692.2-239771.3) | 103798.7 (56736.0-185566.2) | 65971.7 (47550.6-85882.3) | 0.015 | NS | NS | 0.024 |

PCa group was subdivided according to the risk stratification National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines. Group A: very low and low risk; group B: favorable and unfavorable intermediate risk group; Group C: high and very high risk group. Chi-Square Test. Data are expressed as absolute number (%). *Data transformed Ln. ANOVA with post hoc Bonferroni. Data are expressed as mean (\pm SD). Kruskal-Wallis Test with post-hoc Dunn. Data are expressed as median (25%-75%). C: Caucasian; NC: not Caucasian; N: No; Y: Yes; MetS: Metabolic Syndrome; CRP: C-reactive protein. ESR: erythrocyte sedimentation rate. tPSA: Prostate-Specific Antigen Total. fPSA: Prostate-Specific Antigen Free. PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule; VCAM-1: Vascular cell adhesion protein 1; ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1; PAI-1: plasminogen activator inhibitor type-1.

Table 4. Multinomial Logistic regression analyses with prostate cancer patients divided according to the risk stratification as dependent variables and age, CRP, ESR, Leukocytes, Adhesion molecules and Plasminogen activator inhibitor-1 as explanatory variables

| Variables | Wald for contrasts | P value | OR | 95% CI |
|-----------------------|--------------------|--------------|-------|-------------|
| Age (year) | A vs B: 6.343 | 0.012 | 1.107 | 1.023-1.198 |
| | A vs C:1.982 | 0.159 | 1.057 | 0.979-1.141 |
| | B vs C:1.601 | 0.206 | 1.047 | 0.975-1.125 |
| CRP (mg/L)* | A vs B: 2.385 | 0.123 | 1.197 | 0.953-1.504 |
| | A vs C:1.646 | 0.199 | 1.160 | 0.925-1.456 |
| | B vs C:2.164 | 0.141 | 1.032 | 0.990-1.075 |
| ESR (mm/hr) | A vs B: 0.024 | 0.876 | 1.005 | 0.944-1.070 |
| | A vs C:5.694 | 0.017 | 1.075 | 1.013-1.140 |
| | B vs C:10.230 | 0.001 | 0.935 | 0.897-0.974 |
| Leukocytes (cells/uL) | A vs B:0.022 | 0.881 | 0.975 | 0.701-1.357 |
| | A vs C:0.828 | 0.363 | 1.167 | 0.837-1.629 |
| | B vs C:1.498 | 0.221 | 0.835 | 0.626-1.114 |
| PECAM-1 (pg/mL) | A vs B: 0.809 | 0.368 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | A vs C:1.739 | 0.187 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | B vs C:4.259 | 0.039 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| VCAM-1 (pg/mL) | A vs B: 0.106 | 0.745 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | A vs C:0.007 | 0.936 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | B vs C:0.137 | 0.712 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| P-SELECTIN (pg/mL) | A vs B: 0.091 | 0.763 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | A vs C:0.175 | 0.676 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | B vs C:0.511 | 0.475 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| E-SELECTIN (pg/mL) | A vs B: 0.599 | 0.439 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | A vs C:0.402 | 0.526 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | B vs C:2.157 | 0.133 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| PAI-1 (pg/mL) | A vs B: 1.087 | 0.297 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | A vs C:0.851 | 0.356 | 1.000 | 1.000-1.000 |
| | B vs C:2.983 | 0.084 | 1.000 | 1.000-1.000 |

PCa group was subdivided according to the risk stratification National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines. Group A: very low and low risk; group B: favorable and unfavorable intermediate risk group; Group C: high and very high risk group. OR: odds ratio, CI confidence interval (lower-upper limit). CRP: C-reactive protein. ESR: erythrocyte sedimentation rate. PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule; VCAM-1: Vascular cell adhesion protein 1; ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1; PAI-1: plasminogen activator inhibitor type-1.

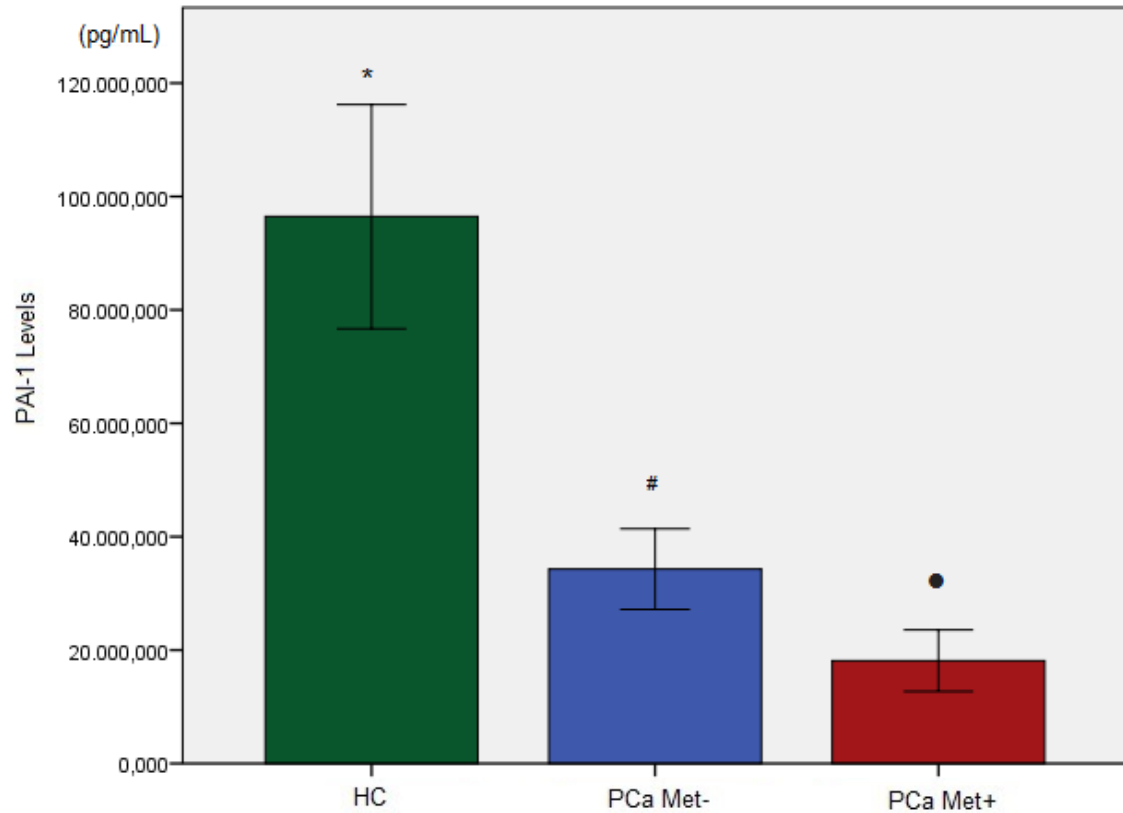


Figure 1. Plasminogen activator inhibitor type-1 in prostate cancer patients without metastasis (PCa Met-) and with metastasis (PCa Met+) and healthy controls (HC).

PAI-1: plasminogen activator inhibitor type-1. Data are shown as mean, CI 95%. * PCa Met- vs HC ($p < 0.001$); #PCa Met- vs PCa Met+ ($p = 0.018$); ● PCa Met + vs HC ($p < 0.001$).

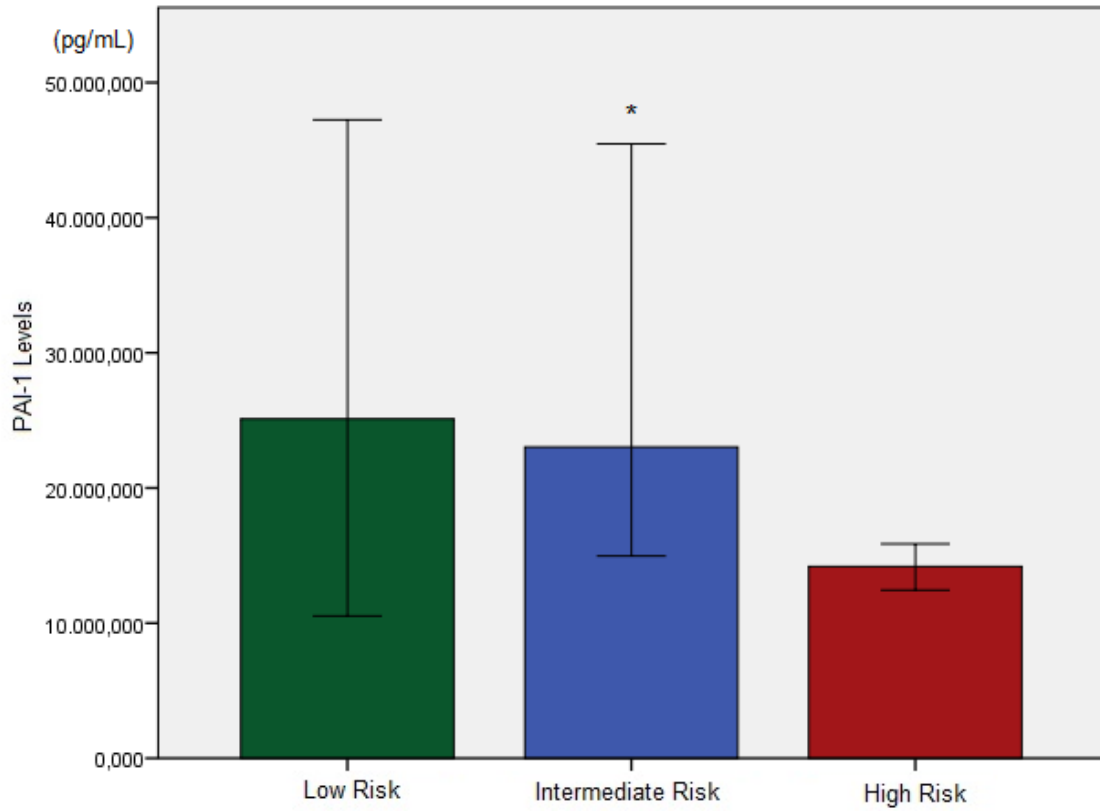


Figure 2. Plasminogen activator inhibitor type-1 in prostate cancer patients divided according to the risk stratification. (NCCN, 2018)

PAI-1: plasminogen activator inhibitor type-1. Data are shown as median, CI 95%. *Intermediate risk vs high risk ($p=0.007$).

6. CONCLUSÕES

- A redução dos níveis plasmáticos de PECAM-1 está associada a presença de CaP metastático mas não ao CaP sem metástase e a indivíduos saudáveis.

- Níveis reduzidos de P-selectina estão associados à presença de CaP na ausência de metástase, independentemente da idade, tamanho da próstata, presença de SM e processo inflamatório.

- A redução nos níveis plasmáticos de VCAM-1 pode diferenciar pacientes com CaP metastático, daqueles sem metástases e de pacientes saudáveis, independentemente da idade, tamanho da próstata, presença de SM e processo inflamatório.

- Os níveis de ICAM-1 e E-selectina não foram associados à presença de CaP seja ele metastático ou não.

- A diminuição dos níveis plasmáticos de PAI-1 está associada à presença de CaP metastático ou não, independentemente da idade, tamanho da próstata, presença de SM e processo inflamatório.

- Quanto aos marcadores inflamatórios, os níveis de VHS foram maiores em pacientes com CaP metastático, quando comparados a indivíduos controles e pacientes com CaP não metastático, independentemente da idade, tamanho da próstata, presença de SM, MACs e PAI-1.

- Quando os pacientes com CaP foram divididos de acordo com a estratificação do risco para metástase, os pacientes classificados como alto risco apresentaram menores níveis de PECAM-1 quando comparados aos pacientes de risco intermediário, independentemente da idade e do processo inflamatório.

- Os níveis de VHS foram maiores em pacientes com alto risco para metástase, quando comparados a pacientes com CaP de risco baixo e risco intermediário, independentemente da idade, das MACs e PAI-1.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A principal limitação deste estudo é o seu delineamento transversal que não permite inferir sobre relações causais. No entanto, este estudo apresenta alguns pontos fortes que devem ser destacados. Primeiramente, as MACs e o PAI-1 foram avaliados por imunofluorimetria utilizando a plataforma Luminex®, uma metodologia mais sensível que o método de ELISA, comumente utilizado em estudos prévios. Em segundo lugar, foi utilizada uma abordagem estatística mais robusta que permitiu o controle de possíveis variáveis confundidoras que não foram controladas nos demais estudos realizados previamente.

Nossos dados demonstraram que PECAM-1, P-selectina e PAI-1 têm um papel importante na fisiopatologia do CaP, mas somente a redução de VCAM-1 pode diferenciar pacientes com CaP metastático daqueles pacientes sem metástase, independentemente da idade, tamanho da próstata, SM e inflamação. Em relação à estratificação de risco para metástase, somente a PECAM-1 poderia ser útil para diferenciar pacientes com alto risco daqueles com risco intermediário, independentemente da idade e inflamação. Este é o primeiro estudo que avaliou o perfil plasmático das MACs em pacientes com CaP, de acordo com a presença de metástase e estratificação de risco para as mesmas. Mais estudos *in vivo* são necessários para investigar o envolvimento complexo do perfil de MACs, do PAI-1 e de outras moléculas tais como quimiocinas e seus receptores, no processo de câncer e metástase.

8. REFERÊNCIAS

AKUDUGU J.; SERAFIN A.; BÖHM L. Further evaluation of uPA and PAI-1 as biomarkers for prostatic diseases. **J Cancer Res Clin Oncol**, 2014.

AMORIM V.M.S.L; et al. Fatores associados à realização dos exames de rastreamento para o câncer de próstata: um estudo de base populacional. **Caderno de Saúde Pública**, v.27, n.2, p.347-56, 2011.

BANDEIRAS, A. M. et al. Carcinoma basocelular: estudo clínico e anatomopatológico de 704 tumores. *An. Bras. Dermatol.*, São Paulo, v. 78, n. 3, p. 23-34, mar., 2003.

BANKS R.E., et al. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. **Br. J. Cancer**, v.68, p.122-124,1993.

BELL K.J.L; et al. Prevalence of incidental prostate cancer: a systematic review of autopsy studies. **International Journal of Cancer**, v.7, p.1749-57, 2015.

BÖHM L.; SERAFIN A.; AKUDUGU J.; FERNANDEZ P.; VAN DER MERWE A.; AZIZ N.A. uPA/PAI-1 ratios distinguish benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.139, p.1221–1228, 2013.

BRAYTON, J.; et al. Influence of adhesion molecule expression by human brain microvessel endothelium on cancer cell adhesion. **Journal of Neuroimmunology**, v. 89,p.104–112, 1998.

CARTER B.S.; BEATY T.H.; STEINBERG G.D.; CHILDS B.; WALSH P.C. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p.3367–71, 1992.

CAUWELAERT, R. V.; AGUIRRE, C.; SANDOVAL, C. Prostatectomía radical en el tratamiento del cáncer de próstata. **Rev. Chilena de Cirugía**, v. 58, n. 4, p. 255-259, 2006.

CENTER M.M,et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. **European Urology**, v.61, p.1079-92, 2012.

CHANG A.C. et al. Osteoblast-secreted WISP-1 promotes adherence of prostate cancer cells to bone via the VCAM-1/integrin $\alpha 4\beta 1$. **System Cancer Letters**, p.426, 2018.

CHEN S.C.; HENRY D.O.; RECZEK P.R.; WONG M.K. Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits prostate tumor growth through endothelial apoptosis. **Mol Cancer Ther** 2008; v.7,n.5, p.1227-1236, 2008.

CHOROSTOWSKA-WYNIMKO J. et al., Cell phenotype determines PAI-1 antiproliferative effect- suppressed proliferation of the lung cancer but not prostate cancer cells. **Pneumonologia i Alergologia Polska**, v.78, n.4, p. 279–283, 2010.

COOK M.B.; et al. A genome-wide association study of prostate cancer in West african men. **Human Genetics**, v.133, p.509-21, 2014.

COOPER C.R.; PIANTA K.J. Cell adhesion and chemotaxis in prostate cancer metastasis to bone: a minireview. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**. v.3, p.6-12, 2000.

CORDÓN, M. R.; ALBIACH, E. F.; ALBIACH, C. F. Tratamiento multidisciplinario actual del cáncer de próstata metastásico. **Actas Urol. Esp.**, v. 27, n. 10, p. 767-782, 2003.

COSTA, R. P. **Manual de tratamento de câncer urológico: aspectos clínicos e cirúrgicos**. São Paulo, SP: Robe Editorial, 1994.

DAVIES G.; JIANG W.G; MASON M.D. Cell adhesion molecules and prostate cancer invasion. **The Journal of Urology**, v.163, p.985–992, 2000.

FACUNDES, I. A. **Câncer de próstata: novos caminhos para a cura**. Porto Alegre, RS: AGFE, 2002.

FERNANDES, J.V; COBUCCI, R.N.O.; JATOBÁ, C.A.N.; FERNANDES, T.A.A.M; AZEVEDO, J.W.V.; ARAÚJO, J.M.G. The Role of the Mediators of Inflammation in Cancer Development. **Pathol. Oncol. Res**, v. 21, p.527–534, 2015.

FRANCA, C. A. S.; VIEIRA, S. L.; PENNA, A. B. R. C. Definição de Recidiva Bioquímica após Tratamento Radioterápico do Câncer de Próstata Localizado: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, 57-61, 2008.

GAKHAR G., et al. Circulating tumor cells from prostate cancer patients interact with E-Selectin under physiologic blood flow. **Plos one**, v.8, n.12, p.85143, 2013.

GLINSKII, O. V.; HUXLEY V.H.; GLINSKY G.V.; PIANTA K.J.; RAZ A.E.; GLINSKY V.V. Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs. **Neoplasia**, v.7, p.522-7, 2005.

GOMES, R. et al. A prevenção do câncer de próstata: uma revisão da literatura. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 239-242, 2008.

GONDEK T., et al. Evaluation of 12-Lipoxygenase (12-LOX) and Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) as Prognostic Markers in Prostate Cancer. **BioMed Research International**, p. 1-7, 2014.

HALE J.S.; LI M.; LATHIA J.D. The malignant social network: cell–cell adhesion and communication in cancer stem cells. **Cell Adh Migr**, v.6, p. 346-355, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Disponível em:<<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em 15 Jul. 2018.

JANKUN et al. PAI-1 induces cell detachment, downregulates nucleophosmin (B23) and fortilin (TCTP) in LnCAP prostate cancer cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 20, p. 11-20, 2007.

KALIKS, R. A.; GIGLIO, A. D. Management of advanced prostate cancer. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 54, n. 2, p. 178-82, 2008.

KIMURA T; EGAWA S. Epidemiology of prostate cancer in Asian countries. **International Journal of Urology**, v.25, n. 6, p.524-31, 2018.

KUMANO M. et al. Expression of urokinase-type plasminogen activator system in prostate cancer: Correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v.27, p.180–186, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS A.K.; ASTER J.C. Robbins & Cotran Patologia – Bases Patológicas das Doenças: 9ª Ed. **Elsevier Editora Ltda**,2016.

KWAAN H.C., et al. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. **British Journal of Cancer**, v.82, n.10, p.1702–1708, 2000.

LAUKKANEN J.A; LAAKSONEN D.E; NISKANEN L.; PUKKALA E.; HAKKARAINEN A.; SALONEN J.T. Metabolic syndrome and the risk of prostate cancer in finnish men: a population-based study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.10, p.1646-50, 2004.

LILJA, H.; CHRISTENSSON, A.; DAHLEN, U.; MATIKAINEN, M. T.; NILSSON, O.; PETTERSSON, K.; LOVGREN, T. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem.*, v. 37, n. 9, p. 1618- 1625, 1991.

LUCIA, F. A. et al. Prostatectomía radical: revisión de nuestra serie en el periodo 1997-2003. **Actas Urol. Esp.**, v. 29, n. 6, p. 542-549, 2005.

LYNCH et al. Serum Levels of Endothelial and Neural Cell Adhesion Molecules in Prostate Cancer. **The Prostate**, v.32, p.214–220,1997.

MACINNIS R.J.; ENGLISH D.R.; GERTIC D.M.; HOPPER J.L.;GILES G.G. Body size and composition and prostate cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.12, p.1417-21, 2003.

MASON M.D. et al. Cell adhesion molecules and adhesion abnormalities in prostate cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** , v.41, p.11–28,2002.

McGINLEY J.I., et al. Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5-alpha reductase deficiency. **Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.75, p.1022-26, 1992.

McNEAL J.E. The zonal anatomy of the prostate. **The Prostate**, v.2, n.1, p.35-49, 1981.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. Disponível em: <https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/>. Acesso em 06 de dezembro de 2018.

NELSON, W. G. et al. Prostate Cancer. Clinical Oncology Philadelphia: Churchill Livingstone. **Prostate Cancer**, p.1653-1700, 2008.

NEWMAN P.J. The Biology of PECAM-1. **J.Clin. Invest**, v. 99, n1, p.3-8,1997.

OTTO, S. E. **Oncologia: câncer em enfermagem**. São Paulo, SP: Ed. Reichmann e Affonso, 2002.

PAIVA, E.P.; MOTTA M.C.S; GRIEP R.H. Conhecimentos, atitudes e práticas acerca da detecção do câncer de próstata. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.23, n.1, p.88–93, 2010.

PERABO F., et al. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin in urological malignancies. **Indian J Cancer**,v. 38, n.1, p.1-7, 2001.

PIETRO G.; CHORNOKUR G.; KUMAR N.B.; DAVIS C.; PARK J.Y. Racial differences in the diagnosis and treatment of prostate cancer. **International Neurourology Journal**, v.20, suppl. 2, p.112-19, 2016.

REGGIO, E. Tratamento percutâneo do adenocarcinoma de próstata por crioblação. Tese (Doutorado em Medicina) – Universidade de São Paulo, São Paulo: 2005.

ROKHLIN O.W.; COHEN M.B. Expression of Cellular Adhesion Molecules Human Prostate Tumor Cell Lines.**The Prostate**, v.26, p.205-212,1995.

SCOTT L.J. et al. Interactions of human prostatic epithelial cells with bone marrow endothelium: binding and invasion. **British Journal of Cancer**, v.84, n.10, p.1417–1423, 2001.

SERAFIN A.M.; CHINHENGO A.; FERNANDEZ P.; AKUDUGU J.M. The malignancy index in plasma samples as a prostate cancer biomarker. **Discov Med**, v. 25, n.139, p.235-242, 2018

SINGH, S.; SADANANDAM, A.; SINGH, R.K. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. **Cancer Metastasis**, v.26, p. 453–467,2007.

SFANOS K.S.; MARZO A.M. Prostate cancer and inflammation: the evidence. **Histopatology**, v.60, p.199-215, 2012.

SHAHI, P. K.; MANGA, G. P. Câncer de próstata metastático. **Oncología**, v. 29, n. 10, p. 398-404, 2006.

SHARIAT, S.F; PARK, S.; TRINH, Q.; ROEHRBORN, C.G.; SLAWIN K.M.; KARAKIEWICZ, P.I. Plasminogen Activation Inhibitor-1 Improves the Predictive Accuracy of Prostate Cancer Nomograms. **The journal of urology**, v. 178, p.1229-1237, 2007.

SMITH Z.L.; EGGNER S.E.; MURPHY A.B. African-American prostate cancer disparities. **Current Urology Reports**, v.18, n.10, p.80-91, 2017.

SOFF et al. Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. **J. Clin. Invest**, v. 96, p.2593-2600, 1995.

SROUGI, M; SIMON, S. D. **Câncer urológico**. 2. ed. São Paulo, SP: Platina, 1996.

SROUGI, M.; CURY, J. **Urologia básica**. Barueri, SP: Manole, 2006.

STANGELBERGER A.; WALDERT M.; DJAVAN B. Prostate cancer in elderly men. **Reviews in Urology**, v.10, n.2, p.111–19, 2008.

STENMAN, U. H.; LEINONEN, J.; ALFTHAN, H.; RANNIKKO, S.; TUHKANEN, K.; ALFTHAN, O. A complex between prostatespecific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. **Cancer Res.**, v. 51, n. 1, p. 222- 226, 1991.

TAI H.C. et al. Osteoblast-derived WISP-1 increases VCAM-1 expression and enhances prostate cancer metastasis by down-regulating miR- 126. **Oncotarget**, v. **5**, n. **17**, **2014**.

TEIXEIRA, P.R. Interação célula-célula. Atlas de Biologia celular. Disponível em <http://lab-siviero.icb.usp.br/biocel/modulos/interacao-celula-celula/>. Acesso em 10 nov. 2018.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Public Health Service National Institutes of Health National Heart, Lung, and Blood Institute NIH Publication**,n.01,p.3305,2001.

WANG, M.C.; VALENZUELA, L. A.; MURPHY, G. P.; CHU, T. M. Purification of a human prostate specific antigen. **Invest Urol.**, v. 17, n. 2, p.159-163, 1979.

WONG M.C.; et al. Global incidence and mortality for prostate cancer: analysis of temporal patterns and trends in 36 countries. **European Urology**, v.70, p. 862-74, 2016.

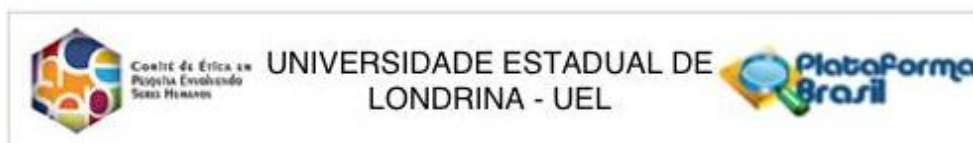
WROCLAWSKI, E. R. et al. **Guia prático de urologia**. São Paulo, SP: Segmento, 2003.

XIA S.J,et al. Characteristic pattern of human prostatic growth with age. **Asian Journal of Andrology**, v.4, p.269-71, 2002.

YASMIN-KARIM, S.; KING, M.R; MESSING E.M.; LEE, Y.F. E-selectin ligand-1 controls circulating prostate cancer cell rolling/adhesion and metastasis. **Oncotarget**, v. 5, n.23, 2016.

9. ANEXOS

9.1 Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO: ASSOCIAÇÃO COM O TRATAMENTO, GLEASON E A PRESENÇA DE METÁTASES

Pesquisador: Andréa Name Colado Simão

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 56182916.7.0000.5231

Instituição Proponente: CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.645.118

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa que tem como objetivo avaliar o perfil de biomarcadores de estresse oxidativo/nitrosativo e de citocinas em pacientes com adenocarcinoma prostático (CaP) de acordo com o tipo de tratamento e compará-los com pacientes com hiperplasia benigna da próstata (HBP) e indivíduos saudáveis. Os participantes serão recrutados em três hospitais de Londrina: Hospital Universitário/UEL, Instituto de Câncer e Ambulatório Alto da Colina/Associação Evangélica Beneficente.

Hipótese:

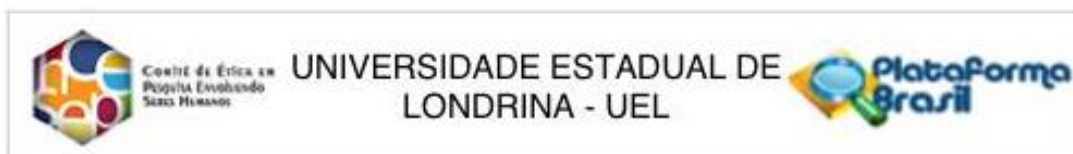
Segundo a pesquisadora: Existe associação entre os biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo com o tipo de tratamento que o paciente com câncer de próstata é submetido

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o perfil de biomarcadores de estresse oxidativo/nitrosativo e de citocinas em pacientes com adenocarcinoma prostático de acordo com o tipo de tratamento e compara-los com pacientes

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR **Município:** LONDRINA **CEP:** 86.057-970
Telefone: (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.645.118

com HBP e indivíduos saudáveis.

Objetivos Secundários:

- Comparar os marcadores de estresse oxidativo e nitrativo em indivíduos saudáveis, com HBP e com CaP em diferentes etapas do tratamento;
- Verificar a associação entre os parâmetros de estresse oxidativo e os níveis de citocinas com as diferentes etapas do tratamento;
- Correlacionar os níveis dos diferentes marcadores de estresse oxidativo com o estadiamento do câncer avaliado pela escala TNM e de Gleason;
- Associar o tratamento do CaP com os diferentes marcadores de estresse oxidativo e nitrativo e os níveis de citocinas em pacientes com CaP;
- Avaliar e comparar a resposta imune TH1, TH2, TH17 e Treg em indivíduos saudáveis, com HBP e com CaP em diferentes etapas do tratamento;
- Verificar se há correlação entre os diferentes marcadores de estresse oxidativo e os níveis de citocinas em pacientes com CaP;
- Verificar se há correlação entre o estadiamento do tumor e os níveis de citocinas em pacientes com CaP;
- Avaliar se há associação entre os níveis de citocinas e o tipo de tratamento do paciente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisadora afirma que esta pesquisa não implicará em riscos para a saúde e bem estar dos pacientes e controles envolvidos no estudo. No entanto, a coleta de sangue pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste: dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local. A coleta de sangue será realizada por 2 farmacêuticas (profissional habilitado para coleta de amostra biológica) que fazem parte deste projeto de pesquisa.

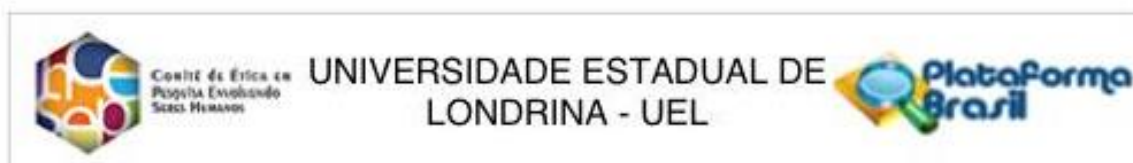
Benefícios:

Segundo a pesquisadora "Este estudo contribuirá para melhor entendimento da fisiopatologia da doença e de seu tratamento"

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Quanto à seleção

| | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Endereço: LABESC - Sala 14 | |
| Bairro: Campus Universitário | CEP: 86.057-970 |
| UF: PR | Município: LONDRINA |
| Telefone: (43)3371-5455 | E-mail: cep268@uel.br |



Continuação do Parecer: 1.645.118

Critério de Inclusão:

Homens com idade entre 35 à 69 anos.

Critério de Exclusão:

Uso de medicamentos antiinflamatórios, uso de suplementos antioxidantes, presença de doenças inflamatórias e/ou infecciosas agudas ou crônicas, história prévia de outros cânceres e insuficiência renal

Quanto a intervenção

Será colhida uma amostra de sangue para as análises laboratoriais de ácido úrico, creatinina, AST, ALT, GGT, ferro e ferritina, determinação de PSA livre e total, determinação do níveis séricos de Proteína C Reativa (PCR) de alta sensibilidade; avaliação do estresse oxidativo; determinações de produtos avançados da oxidação protéica; determinação de isoprostanos plasmáticos; determinação dos níveis séricos de metabólitos do óxido nítrico; dosagem de IL-4, IL-6, IL10, IL-12, IL-17, TNF-, IFN-, TGF-b, adiponectina e leptina.

Quanto a análise estatística

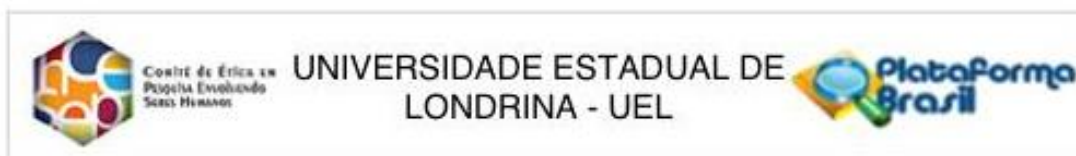
Os dados categóricos serão avaliados pelo teste exato de Fisher ou teste de qui-quadrado conforme apropriado. Para dados contínuos será utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com post test de Dunn ou teste de variância ANOVA com pós teste de Bonferroni, conforme apropriado. Para verificar correlações será utilizado o teste de correlação de Pearson ou Spearmann. Para determinar quais fatores estão associadas com a presença de CaP será realizada a regressão logística multinomial. Para verificar preditores de metástases será utilizada o teste de regressão logística binária. Serão incluídas nos testes de regressão logística as variáveis que apresentarem valor de $p < 0.1$ na análise univariada. Será realizada a regressão linear entre os níveis plasmáticos de biomarcadores de estresse oxidativo/nitrosativo e os valores obtidos para PSA, TNM e Gleason. Todas as análises serão realizadas o programa estatístico SPSS versão 20.0.

Quanto ao orçamento

O projeto prevê um custo de R\$ 3.000,00 para aquisição de material de consumo que será financiado pelos membros da equipe.

Quanto ao cronograma

| | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Endereço: LABESC - Sala 14 | CEP: 86.057-970 |
| Bairro: Campus Universitário | |
| UF: PR | Município: LONDRINA |
| Telefone: (43)3371-5455 | E-mail: cep268@uel.br |



Continuação do Parecer: 1.645.118

Adequado, início da coleta das amostras em 01/09/16.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de rosto devidamente assinado pela vice-chefe do depto de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas/CCA/UEL - ADEQUADO
2. Carta de aceite das instituições co-participantes devidamente assinado - Hospital Universitário, Instituto do Câncer e Associação Evangélica - ADEQUADO
3. Termo de confidencialidade e sigilo devidamente assinado - ADEQUADO
4. Termo de responsabilidade para armazenamento de amostras biológicas devidamente assinado - ADEQUADO
5. TCLE - redigido em forma de convite, com linguagem acessível obedecendo a resolução 466/2012 CONEP - ADEQUADO

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|--------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_644034.pdf | 20/07/2016 11:34:19 | | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE3.docx | 20/07/2016 11:33:57 | Andréa Name Colado Simão | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETOCEP.pdf | 12/07/2016 11:59:47 | Andréa Name Colado Simão | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEfinal.docx | 12/07/2016 11:57:47 | Andréa Name Colado Simão | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaderostroprostata.pdf | 17/05/2016 | Andréa Name | Aceito |

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Centro de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.645.118

| | | | | |
|---|---------------------------|------------------------|-----------------------------|--------|
| Folha de Rosto | foihaderostroprostata.pdf | 13:42:33 | Colado Simão | Aceito |
| Outros | HEL.pdf | 03/05/2016 08:26:26 | Andréa Name Colado Simão | Aceito |
| Outros | HU.pdf | 03/05/2016 08:23:09 | Andréa Name Colado Simão | Aceito |
| Outros | ICL.pdf | 03/05/2016 08:21:02 | Andréa Name Colado Simão | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | ConfidencialidadeHU.jpg | 11/12/2015 15:54:37 | Andréa Name Colado Simão | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Armazenamento.jpg | 11/12/2015 15:53:52 | Andréa Name Colado Simão | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 22 de Julho de 2016

Assinado por:
Rosana Lopes
(Coordenador)

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br

9.2 Declaração de Colaboração do Hospital do Câncer de Londrina



DECLARAÇÃO

Ilma. Sra. Profa. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do CEP/UEL

Senhora Coordenadora,

O Instituto de Câncer de Londrina declara para os devidos fins, que é colaborador no Projeto de Pesquisa sob o tema "Avaliação do perfil de biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com adenocarcinoma prostático: Associação com o tratamento, GLEASON e a presença de metástases", sob a responsabilidade do médico Alexssandro Koike, CRM 18711, nas nossas dependências, que se encontra em fase de submissão e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEL.

Estamos cientes que as unidades de análise da pesquisa serão pacientes, prontuários e amostras de líquidos biológicos dos pacientes, bem como o cumprimento da Resolução 466/2012 do CNS e suas complementares.

Atenciosamente,


Dr. Jesus Roberto Ceribelli
Diretor Clínico
CRM PR: 5784

09/12/15


Dr. Paulo Emílio Fuganti
Chefe do Serviço de Urologia
CRM-PR: 18331

09/12/15

Rua Lucilla Ballalai, 212 - Jd Petrópolis - CEP 86.015-520 - Londrina - PR
Fones: (43) 3379-2600 - Fax: (43) 3379-2696
Home Page: www.hcl.org.br
e-mail: pesquisaclinica@sercomtel.com.br

9.3 Declaração de Colaboração do Hospital Evangélico de Londrina



Declaração de Concordância dos Serviços Envolvidos e/ou de Instituição

Co-Participante

Local, 02 de dezembro de 2015

Srma. Sra. Profa. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do CEP/UEL

Senhora Coordenadora

Declaramos que nós do Hospital Evangélico de Londrina, estamos de acordo com a condução do projeto de pesquisa "**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO: ASSOCIAÇÃO COM O TRATAMENTO, GLEASON E A PRESENÇA DE METÁTASES**" sob a responsabilidade do médico urologista, Alexsandro Koike, CRM 18711, nas nossas dependências (Ambulatório de Urologia – Alto da Colina) tão logo o projeto seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, até o seu final em (31/03/2018).

Estamos cientes que as unidades de análise da pesquisa serão (pacientes, prontuários médicos, amostras de líquidos biológicos de pacientes) bem como de que o presente trabalho deve seguir a Resolução 466/2012 do CNS e complementares.

Atenciosamente,


Eduardo Sene Cardoso
Diretor AEBEL
Diretoria Aebel

PARECER PROCESSO 07/2015

Ao Pesquisador Alessandro Koike e colaboradores;

Considerando o Projeto de Pesquisa com o título “*Avaliação do perfil de biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com adenocarcinoma prostático: associação com o tratamento, gleason e a presença de metástases*” apresentado à Associação Evangélica Beneficente de Londrina;

Considerando o parecer favorável apresentado nas instâncias administrativas que envolvem a realização do estudo;

Vimos informar que **somos de parecer favorável à realização, resguardando-se o atendimento da legislação vigente.**

Solicitamos também que, uma vez realizado o estudo, uma cópia seja apresentada a esta Diretoria, para ciência e divulgação.

Em 20 de dezembro de 2015


Diretoria da AEBEL
Eduardo Sene Cardoso
Diretor AEBEL

10. APÊNDICES

10.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO: ASSOCIAÇÃO COM O TRATAMENTO, GLEASON E A PRESENÇA DE METÁSTASES”

Prezado Senhor:

Gostaríamos de convidá-lo para participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO: ASSOCIAÇÃO COM O TRATAMENTO, GLEASON E A PRESENÇA DE METÁSTASES”**, a ser realizada em Londrina. O objetivo da pesquisa é **“avaliar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença e de seu tratamento”**. Sua participação é muito importante e ela se dará da seguinte forma: realização de uma avaliação clínica pelo médico urologista e uma coleta de sangue. Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o senhor: recusar-se a participar ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isso acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos também que as suas informações serão utilizadas somente para os fins dessa pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Todos os dados coletados, clínicos e laboratoriais, serão descartados após a publicação do estudo.

Esclarecemos ainda que o senhor não pagará e nem será remunerado pela sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente da sua participação.

A sua participação neste estudo contribuirá para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença. Quanto aos riscos, informamos que sua participação não acarretará em qualquer risco à sua saúde nem alteração de qualquer um dos seus tratamentos. A coleta de sangue pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste: dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local.

Caso o senhor tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar **(Alexsandro Koike, Avenida Bandeirantes, 460, Londrina, telefone 3377-1800, celular 9998-1896, urologiakoike@yahoo.com.br)** ou procurar o Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina, situada junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

Temo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado conforme normas da Resolução 466/2012 de 12 de dezembro de 2012.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchido, assinada e entregue ao senhor.

Londrina, _____ de _____ de 2016.

Pesquisadores Responsáveis:

Professora Dra. Andréa Name Colado Simão

RG: 6.226.736-4

Telefone: 3371-2321

Alexsandro Koike

Médico urologista

RG: 5.888.744-7

Tel: 3377-1800

_____, Tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

*Temo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado conforme normas da Resolução 466/2012 de 12 de dezembro de 2012.

| | |
|--|--|
| | <input type="checkbox"/> Quimioterapia Data de inicio: Qual? <input type="checkbox"/> Paliativo – EICPO |
| 17- Depressão? | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Diagnosticado por Psiquiatra? |
| 18- Uso de medicamentos no momento da coleta? | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| 19- Infecção na data da coleta? | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual? |
| 20- Tabagismo? | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ex-fumante Quanto tempo? Período: |
| 21- Atividade Física? | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Frequência? |
| 22- Diabetes? | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não |
| 23- Hipertensão? | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não |
| 24- Outras doenças: | |
| 25- Outros dados: | |
| Toque retal: _____ Tam. Aprox.: _____ | |
| USG próstata. Data: ___/___/_____ Tam. Aprox.: _____ | |