



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNNA EMANUELLA FRANÇA ROBLES

**ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM
PACIENTES COM ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA:
ASSOCIAÇÃO COM A PRESENÇA DE METÁSTASE E O
ESCORE DE ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO PARA
METÁSTASE**

BRUNNA EMANUELLA FRANÇA ROBLES

**ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM
PACIENTES COM ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA:
ASSOCIAÇÃO COM A PRESENÇA DE METÁSTASE E O
ESCORE DE ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO PARA
METÁSTASE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

- r343 Rego, Brunna Emanuella França.
ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA: ASSOCIAÇÃO COM A PRESENÇA DE METÁSTASE E O ESCORE DE ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO PARA METÁSTASE / Brunna Emanuella França Rego. - Londrina, 2019.
103 f.
- Orientador: Andrea Name Colado Simão.
Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2019.
Inclui bibliografia.
1. Biomarcadores de estresse oxidativo na metástase no Câncer de Próstata - Tese. I. Simão, Andrea Name Colado . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

BRUNNA EMANUELLA FRANÇA ROBLES

**ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM
PACIENTES COM ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA:
ASSOCIAÇÃO COM A PRESENÇA DE METÁSTASE E O
ESCORE DE ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO PARA
METÁSTASE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. José Wander Breganó
Universidade Estadual de Londrina

Dra. Tamires Flauzino
Pós Doutoranda do Programa de Patologia Experimental

Dra. Naiara Lourenço Mari
Pós Doutoranda do Programa de Fisiopatologia Clínica e
Laboratorial

Londrina, 09 de agosto 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos. Obrigado por Seu infinito amor que não me permitiu desistir e principalmente por ter colocado em meu caminho pessoas que tornaram essa trajetória mais leve. Toda Honra e Toda Glória seja dada a Deus!

Aos meus pais, João e Rosane, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim.

Ao meu esposo e companheiro Victor Robles, que em diversas vezes abriu mão do seu lazer para me ajudar nas coletas. Meu eterno agradecimento pelo seu valioso e incansável apoio em todos os momentos deste trabalho.

A minhas irmãs Marianne e Anne e sobrinhos Raphaela, Davi e Noah que compreenderam minha ausência e estiveram sempre do meu lado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão, pela grande oportunidade que me foi confiada, pelo apoio, puxões de orelha, pelos valiosos conselhos, pela extrema dedicação e competência, pelo infinito conhecimento e pelo grande exemplo de mulher e profissional.

Aos Professores Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, Dr. José Wander Breganó, Dra. Tamires Flauzino e a Dra. Naiara Lourenço Mari por terem aceito o convite para participarem da banca de defesa e pela valiosa contribuição à este trabalho

Ao Prof. Dr. Rubens Cecchini, pelo grande conhecimento e contribuições para este trabalho.

Aos meus colegas Ana Gabriela Bonaci e Alexsandro Koike que participaram de forma ativa neste trabalho e estiveram ao meu lado na organização do banco de dados, recrutamento de pacientes e na coleta de material biológico.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisa em Imunologia Aplicada, Daniela Frizon Alfieri, Tamires Flauzino, Naiara Mari, Pâmela Lonardoni, Fabiano Medeiros, pela excelente convivência, momentos de lazer e descontração, companheirismo, amizade e colaboração neste trabalho.

Aos pacientes que participaram deste estudo, pela disposição e colaboração.

Aos funcionários do Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina e do Hospital do Câncer de Londrina, que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, que possibilitou meu crescimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo e pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção desta tese.

A todos aqueles que não mencionei mas contribuíram de alguma forma para conclusão deste trabalho.

ROBLES, Brunna Emanuella França. **Estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com adenocarcinoma de próstata: associação com a presença de metástase e o escore de estratificação de risco para metástase.** 2019. 113 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2019.

RESUMO

Introdução: A hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) são as duas formas clinicamente mais importantes e prevalentes de doenças da próstata em homens idosos. O estresse oxidativo e nitrosativo são fatores importantes no desenvolvimento e progressão da HPB e do CaP e têm um papel crucial no processo metastático. **Objetivo:** Artigo 1) Revisar estudos que avaliaram o estresse oxidativo e nitrosativo na HPB e no CaP. Artigo 2) Determinar o perfil de estresse oxidativo e nitrosativo no CaP e sua associação com a presença de metástases e diferentes graus de risco de metástase. **Sujeitos e Métodos:** Artigo 1) Foi realizada uma busca bibliográfica nas bases de dados eletrônicas PUBMED, Lilacs, *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO) e *Science Direct*, em inglês publicado até janeiro de 2019 utilizando as palavras-chave "câncer de próstata", "hiperplasia benigna da próstata", "estresse oxidativo", "espécies reativas de oxigênio", "radicais livres", "peroxidação lipídica", "antioxidantes". Foram incluídos 50 artigos em humanos sendo: HPB: n=4 artigos caso-controle; CaP: n=12 artigos de caso-controle; HPB e CaP: n=14 caso-controle; estudos avaliando a ingestão de antioxidantes e o risco de CaP: coorte: n=6, caso-controle: n=3; com antioxidantes: n=11. Artigo 2) Foram incluídos no estudo 149 pacientes com CaP, categorizados como sem metástase (Met-, n=108) e com metástase (Met+, n=41) e 64 controles saudáveis. Além disso, os grupos CaP foram subdivididos em estratificação de risco de metástase de acordo com a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN): baixo risco (n=28); grupo de risco intermediário (n=41); alto risco (n=77). **Resultados:** Artigo 1) Vários estudos demonstraram a presença de estresse oxidativo e nitrosativo na HPB e no CaP, tanto pelo aumento das espécies reativas ao oxigênio como pela deficiência do sistema antioxidante. O marcador mais estudado para avaliar a peroxidação lipídica foi o malondialdeído (MDA), enquanto as enzimas antioxidantes mais avaliadas foram a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Artigo 2) Os níveis de LOOH, PCB, AOPP e NOx não foram associados com o risco de CaP e Met+. Os níveis de SH foram associados com a presença de metástase (OR: 1,011, IC 95%: 1,011-1,020, p = 0,027) independente da idade, dos níveis de tPSA, e de fPSA, da síndrome metabólica e da inflamação. Além disso, níveis mais baixos de SH também estavam associados ao risco de desenvolvimento de metástases e

poderiam diferenciar pacientes de alto risco de pacientes de baixo risco (OR: 0,992; IC95%: 0,984-1,000, $p = 0,045$) e risco intermediário (OR: 1,009 , IC95%: 1.001-1.016, $p = 0.026$), mas perde a associação após ajuste para inflamação. **Conclusão:** Artigo 1) Evidências crescentes indicam que o estresse oxidativo e nitrosativo tem papel importante na patogênese da HPB e do CaP. No entanto, a ingestão de antioxidantes mostrou resultados controversos, os estudos que avaliaram o licopeno sugerem que ele pode estar associado a diminuição do risco de CaP. Mais estudos são necessários para o melhor entendimento do complexo envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo e a suplementação com antioxidantes na fisiopatologia do CaP. Artigo 2) Nossos dados demonstraram que os níveis de SH tem um papel importante na fisiopatologia do CaP, sendo capaz de diferenciar a presença de metástases, independentemente das variáveis confundidoras como: idade, etnia, tabagismo, tPSa, fPSA, síndrome metabólica incluindo o processo inflamatório. No entanto, em relação à estratificação do risco de metástase, o grupamento SH pode ser usado para prever pacientes com alto risco, mas é dependente da inflamação presente na metástase.

Palavras-chave: Câncer de Próstata.; Metástase; Estresse Oxidativo; Grupamento Sulfrídrico.

ROBLES, Brunna Emanuella França. **Oxidative and nitrosative stress in patients with adenocarcinoma of the prostate: association with the presence of metastasis and the risk stratification score for metastasis.** 2019. 113 f. Thesis (PhD in Experimental Pathology) - Londrina State University, Londrina, Brazil 2019.

ABSTRACT

Background: Benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (CaP) are the two most clinically important and prevalent forms of prostate disease in elderly men. Oxidative and nitrosative stress are important factors in the development and progression of HPB and CaP and play a crucial role in the metastatic process. **Objective:** Article 1) To review studies that evaluated oxidative and nitrosative stress in BPH and CaP. Article 2) To determine the oxidative and nitrosative stress profile in CaP and its association with the presence of metastases and different degrees of metastasis risk. **Subjects and Methods:** Article 1) A bibliographic search was performed in the electronic databases PUBMED, Lilacs, Scientific Electronic Library Online (SCIELO) and Science Direct, published until January 2019 using the keywords "prostate cancer", "benign prostate hyperplasia", "oxidative stress", "reactive oxygen species", "free radicals", "lipid peroxidation", "antioxidants". The reference list of selected articles was also investigated. 50 human articles were included: HPB: n = 4 case-control articles; CaP: n = 12 case-control articles; HPB and CaP: n = 14 case control; studies evaluating antioxidant intake and risk of CaP: cohort: n = 6, case-control: n = 3; with antioxidants: n = 11. Article 2) A total of 149 patients with CaP, categorized as without metastasis (Met-, n = 108) and metastatic (Met +, n = 41) and 64 healthy controls, were included in the study. In addition, CaP groups were subdivided into metastasis risk stratification according to the National Comprehensive Cancer Network (NCCN): low risk (n = 28); intermediate risk group (n = 41); high risk (n = 77). **Results:** Article 1) Several studies have shown the presence of oxidative and nitrosative stress in HPB and CaP, both due to the increase in reactive oxygen species and the deficiency of the antioxidant system. The most studied marker to evaluate lipid peroxidation was malondialdehyde (MDA), while the most evaluated antioxidant enzymes were catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). Article 2) LOOH, PCB, AOPP and NOx levels were not associated with the risk of CaP and metastasis. SH levels were associated with the presence of metastasis (OR: 1.011, 95% CI: 1.011-1.020, p = 0.027) regardless of age, total and free prostate specific antigens, metabolic syndrome and inflammation. In addition, lower SH levels were also associated with the risk of

metastasis development and could differentiate high risk patients from low risk patients (OR: 0.992; 95% CI: 0.984-1.000, $p = 0.045$) and intermediate risk (OR : 1.009, 95% CI: 1.001-1.016, $p = 0.026$), but loses association after adjustment for inflammation. **Conclusion:** Article 1) Increasing evidence indicates that oxidative and nitrosative stress plays an important role in the pathogenesis of BHP and CaP. However, antioxidant intake has shown controversial results, studies evaluating lycopene suggest that it may be associated with decreased risk of CaP. Further studies are needed to better understand the complex involvement of oxidative and nitrosative stress and antioxidant supplementation in the pathophysiology of CaP. Article 2) Our data showed that SH levels play an important role in the pathophysiology of CaP, being able to differentiate the presence of metastases, regardless of confounding variables such as age, ethnicity, smoking, tPSa, fPSA, metabolic syndrome including the process. inflammatory. However, regarding metastasis risk stratification, the thiol group can be used to predict high-risk patients, but is dependent on the inflammation present in metastasis.

Key-words: Prostate Cancer; Metastasis; Oxidative Stress; Sulfhydryl Groups.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AOPP	Produtos Avançados de Oxidação Protéica
BT	Braquiterapia
CAT	Catalase
CaP	Câncer de Próstata
CMIA	Chemiluminescent Microparticle Immunoassay
CTCs	Células Tumorais Circulantes
CXCL12	Fator 1 Derivado de Células Estromais Alfa
CXCR4	Receptores de Quimiocinas Tipo 4
cGMP	Guanosina Monofosfato Cíclico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
DTNB	Ditiobisnitrobenzóico
ERNs	Espécies Reativas ao Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas ao Oxigênio
GSH	Glutathione Reduzida
GST	Glutathione S Transferase
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH-Red	Glutathione Redutase
HC	Grupo Controle
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC	Intervalo de Confiança
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade

LHRH	Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
LOOH	Hidroperóxidos Lipídicos
MACs	Moléculas De Adesão Celular
MDA	Malondialdeído
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOx	Metabólitos Do Óxido Nítrico
QL	Quimiluminescência
OH ⁻	Radical Hidroxila
OR	Odds Ratio
O ²⁻	Ânion Superóxido
PCB	Proteína Carbonílica
PCR	Proteína C Reativa
PSA	Antígeno Prostático Específico
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido Ribonucléico
RLU	UNIDADES REATIVAS DE LUZ
RO ⁻	Radical Alcoxil
ROO ⁻	Radical Peroxil
SDF-1	Fator 1 Derivado De Células Estromais Alfa
SH	Grupamento Sulfrídila
SM	Síndrome Metabólica
SOD	Superóxido Dismutase
SPA	Prolidase Sérica
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TC	Tomografia Computadorizada
TEAC	Capacidade Antioxidante Total Equivalente
TNM	Tumor, Nódulo e Metástase

VCAM-1	Molécula De Adesão Celular Vascular-1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VHS	Velocidade de Hemocedimentação
4-HNE	4-hidroxinonenal
8-isoPGF2 α	8-Iso Prostaglandina F2-Alfa
8-OHdG	8-Hidroxi-Deoxiguanidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	PRÓSTATA.....	14
1.2	HIPERPLASIA PRÓSTATICA BENIGNA.....	14
1.3	CÂNCER DE PRÓSTATA	15
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO E CARCINOGENESE.....	18
1.5	ALTERAÇÃO DO ESTADO REDOX EM PACIENTES COM HIPERPLASIA PRÓSTATICA BENIGNA.....	21
1.6	ALTERAÇÃO DO ESTADO REDOX EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA.....	22
1.7	ALTERAÇÃO DO ESTADO REDOX, HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA E CÂNCER DE PRÓSTATA.....	24
1.8	ALTERAÇÃO DO ESTADO REDOX EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA METASTÁTICO.....	28
2	JUSTIFICATIVA.....	31
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	SUJEITOS E MÉTODOS.....	33
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO DE REVISÃO.....	33
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO ORIGINAL.....	33
4.2	MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS.....	34
4.3	ANÁLISES LABORATORIAIS.....	35
4.3.1	Análises Imunológicas e Hematológicas.....	35
4.3.2	Avaliação do Estresse Oxidativo.....	35
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5	RESULTADOS.....	37
6	CONCLUSÕES.....	91

7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
	APÊNDICES.....	102
	APÊNDICE A - Termo De Consentimento Livre e Esclarecido.....	102
	Questionário.....	104
	ANEXOS.....	106
	ANEXO A - Parecer consubstanciado do CEP.....	106
	Declaração de colaboração do Hospital do Câncer de Londrina	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Próstata

A próstata é uma glândula exócrina 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 que levam a liquefação seminal e estabilização do pH seminal, facilitando assim a fertilização. Sua secreção corresponde a cerca de 20% do volume do ejaculado. A próstata pode ser dividida em zona de transição, periuretral, central e periférica e a parte anterior formada por um estroma fibromuscular (CALVETE et al., 2003).

A glândula prostática depende de hormônios esteroides como a testosterona e dihidrotestosterona que têm função primordial no desenvolvimento e funcionalidade secretora da próstata. A próstata tem o seu volume aumentado com o avanço da idade, apresentando na puberdade um tamanho de cerca de 15 a 20 cm³, porém na fase adulta, após os 30 anos, a velocidade de crescimento da próstata está aumentada, podendo crescer até 0,5 cm³ por ano. 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 condições patológicas clinicamente mais importantes e prevalentes de crescimento anormal da próstata são hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP), sendo consideradas doenças crônicas de progressão lenta (XIA et al., 2002; AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016).

1.2 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A HPB se caracteriza por um processo histológico proliferativo dos elementos celulares da próstata, aumento volumétrico e a disfunção miccional resultante do seu aumento e da obstrução infravesical (DHINGRA; BHAGWAT, 2011). A prevalência histológica de HPB é de aproximadamente 40% dos homens com 50 anos, e 80% em homens acima de 80 anos. A sintomatologia nem sempre é concomitante ao aumento do volume prostático, cerca de 50% dos homens com HPB desenvolverão aumento volumétrico, mas somente 25 a 50% apresentarão sintomas urinários decorrentes da obstrução mecânica causada pelo aumento de volume. Os sintomas urinários mais frequentes são fluxo urinário fraco, noctúria, esforço para iniciar a micção, entre outros. No entanto, se não tratados, podem evoluir para complicações como retenção urinária, litíase vesical, infecção urinária, insuficiência renal e hematúria macroscópica, além de afetar significativamente a qualidade de vida entre homens com mais de 50 anos (FITZPATRICK, 2006; AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016).

1.3 Câncer de Próstata (CaP)

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e é estimado em 9,6 milhões de mortes em 2018, sendo o câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado os tipos mais comuns em homens. O CaP acomete principalmente homens acima de 50 anos de idade, por possuir crescimento lento, muitas vezes é diagnosticado na sua fase avançada, após os 65 anos de idade caracterizando-se como um câncer da terceira idade (ATTARD et al., 2016; GLOBOCAN, 2018).

Segundo o GLOBOCAN, um projeto do *International Agency for Research on Cancer* (IARC), que avalia estimativas de incidência e mortalidade por câncer, o CaP ocupa a posição mundial em números de caso de câncer no mundo, apresentando uma incidência de 29,3 casos/100 mil homens com uma taxa de mortalidade de 7,6 casos/100 mil homens para o ano de 2018. A prevalência mundial estimada para os próximos 5 anos é de 2.508.684 casos de CaP. O Brasil é o segundo país com maior incidência de CaP, atrás apenas dos Estados Unidos da América (EUA) (GLOBOCAN 2018).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), 68.220 novos casos de CaP foram estimados para cada ano do biênio 2018-2019 no Brasil. Estes valores correspondem a um risco estimado de 66,12 novos casos/100 mil homens. No Brasil, o CaP é o câncer com maior incidência entre os homens (sem considerar os tumores de pele não melanoma) nas cinco regiões do país, com 96,85 casos/100 mil no Sul, 69,83 casos/100 mil no Sudeste, 66,75 casos/100 mil no Centro-Oeste, 56,17 casos/100 mil no Nordeste e 29,41 casos/100 mil no Norte. No estado do Paraná, estimou-se que, em 2018, haveria 5.480 novos casos com diagnóstico de CaP (INCA, 2018). Diversos fatores têm sido apontados como determinantes para o aumento da incidência de CaP, tais como evolução de métodos diagnósticos, campanhas informativas de identificação da doença e aumento na expectativa de vida (WONG et al., 2016).

Vários fatores têm sido apontados como importantes na etiopatogênese do CaP, no entanto, a idade é o fator de risco mais importante para o seu desenvolvimento, e aproximadamente, 80% dos homens são diagnosticados com CaP após os 65 anos (TAITT 2018). O histórico familiar de CaP é outro fator de risco importante para o desenvolvimento da doença, e um parente de 1º grau (pai ou irmão) acometido com CaP aumenta o risco em 2 vezes, em 5 vezes quando dois parentes de 1º grau são acometidos e em 10 vezes com três parentes de 1º grau (BASHIR et al., 2015). A raça afro-americana tem um risco maior de desenvolver CaP, além de apresentarem a doença em estágios mais avançados e um pior prognóstico. Isso se deve à maior agressividade do tumor, supostamente relacionada a níveis

1 elevados de testosterona e fatores genéticos (PERDANA et al., 2016). Outros fatores também
2 associados ao CaP são o componente genético (COOK et al., 2014), a presença de síndrome
3 metabólica (SM) (LAUKKANEN et al., 2004), a dieta (KIMURA et al., 2018), a obesidade
4 (MACINNIS et al., 2003) e doenças inflamatórias crônicas da próstata (SFANOS et al.,
5 2012).

6 Os principais métodos diagnósticos para a identificação ou rastreamento do CaP são a
7 dosagem do antígeno prostático específico (PSA), o toque retal, e a biópsia com auxílio da
8 ultrassonografia transretal (KANG et al., 2015). Facundes (2002) ainda destaca que a
9 ressonância magnética (RM), a tomografia computadorizada (TC) e a cintilografia óssea são
10 também exames opcionais utilizados no diagnóstico do CaP, além da cintilografia óssea que
11 identifica a presença de metástase. Entre esses métodos, a dosagem do PSA associada com o
12 toque retal são utilizados na triagem inicial e indicam se há ou não a necessidade da
13 realização de uma biópsia prostática (KANG et al., 2015).

14 O PSA foi introduzido em meados da década de 1980 como marcador para o CaP
15 (WANG et al., 1979) e até hoje é o mais utilizado, apesar da baixa sensibilidade e
16 especificidade (STEFFEN et al., 2018). O PSA é uma proteína produzida pela próstata e
17 excretada no fluido seminal que pode ser encontrada em duas formas moleculares no soro:
18 livre e complexada. Até 30% de PSA total pode estar na forma livre, não ligada a proteínas do
19 soro, 70-90% de PSA total pode estar ligada a α 1-antiquimiotripsina e a uma pequena
20 quantidade de α 1-antitripsina, e finalmente, ainda uma pequena porção não mensurável pelos
21 métodos habituais circula complexada com α 2-macroglobulina (KOSTOVA et al., 2018). O
22 PSA está presente em concentrações muito baixas na circulação de homem saudável, e no
23 CaP normalmente o PSA apresenta níveis elevados. No entanto, os níveis aumentados de PSA
24 não são específicos para o CaP. Outros fatores podem aumentar os níveis de PSA como:
25 manipulações da próstata (toque retal, biópsia), prostatite, HPB e até a ejaculação (KACHUR
26 2018; RICE; STOYANOVA, 2018).

27 Já o toque retal avalia o tamanho, a forma e a consistência da glândula prostática, no
28 intuito de identificar a presença de nódulos e alterações na sua consistência. Este exame
29 apresenta limitações, uma vez que somente as porções posterior e lateral da próstata podem
30 ser palpadas, deixando cerca de 40% dos tumores fora do seu alcance (EGGENER; CIFU;
31 NABHAN, 2015).

32 A indicação da biópsia transretal com auxílio da ultrassonografia transretal se faz a
33 partir da suspeita clínica, em decorrência de alterações no PSA e/ou toque retal. Sendo
34 aconselhada quando os níveis de PSA encontram-se superiores a 10 ng/mL. O diagnóstico é

feito por meio da análise histológica da amostra de tecido obtida pela biópsia prostática (KANG et al., 2015). A biópsia prostática é um procedimento doloroso e invasivo, com a chance de complicações, incluindo sangramento e infecção. No entanto, apenas cerca de 30% das biópsias são positivas para CaP, ou seja, a maioria dos homens com suspeita da doença passa pelo procedimento invasivo desnecessariamente porque o exame de toque e o PSA dão margem para incertezas. Além disso, dependendo da localização do CaP, a biópsia pode não ser necessária e estima-se que cerca de 28% dos pacientes com CaP tenham biópsia negativas (BJURLIN et al., 2013; LITWIN; TAN, 2017).

Na avaliação da biópsia do CaP realiza-se o escore de Gleason que estima o padrão arquitetural do CaP além de determinar a tendência a disseminação e a taxa de crescimento do tumor, além de auxiliar na determinação do melhor tratamento para o paciente. Os fragmentos do tumor são classificados de 1 a 5, sendo grau 1 o mais bem diferenciado e grau 5, o mais indiferenciado. O escore final de Gleason é resultado da soma dos graus do padrão primário (predominante) e secundário (segundo grau histológico mais comum). Assim, as neoplasias mais bem diferenciadas seriam escore 2 (1+1) e as mais indiferenciadas 10 (5+5) (EPSTEIN et al., 2016).

Já o estadiamento do CaP é feito de acordo com o sistema tumor, nódulo e metástase (TNM) que descreve se e o quanto o câncer se espalhou, em que: tumor (T) avalia o tamanho e a extensão do tumor primário; nódulo (N) reflete se células cancerosas se espalharam para os gânglios linfáticos e; metástase (M) indica se o câncer se espalhou para tecidos distantes (CHENG et al., 2012).

A estratificação de risco é uma ferramenta útil para estimativa de risco de recorrência ou progressão auxiliando na definição de estratégias de tratamento (NCCN Guidelines 2018). Os grupos de risco para metástase são estratificados em seis categorias de acordo com *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN): muito baixo risco, baixo risco, favorável intermediário risco, desfavorável intermediário risco, alto risco e muito alto risco de acordo com os níveis de PSA, pontuação TNM e escore de Gleason (NCCN Guidelines, 2018).

No entanto, mesmo com todos esses métodos diagnósticos e preditores, ainda há melhorias a serem feitas no diagnóstico e na estratificação de risco para identificar com precisão os pacientes com CaP, entre eles, aqueles em risco de desenvolver doença de alto grau além de auxiliar no monitoramento da doença e na tomada de decisão orientada para o tratamento (SHARMA, ZAPATERO-RODRÍGUEZ, KENNEDY, 2017).

Os tratamentos utilizados para o CaP são escolhidos conforme o estadiamento da neoplasia. Usualmente, para tumores localizados, a prostatectomia radical é o tratamento de

escolha, por ser muito eficaz e curativa. Tal método consiste na retirada de toda a próstata e das vesículas seminais, posteriormente unindo-se a bexiga à uretra (CAUWELAERT; AGUIRRE; SANDOVAL, 2006).

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

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 hormonoterapia, já que eliminam os órgãos que sintetizam a testosterona, este apontado como principal responsável pelo crescimento do tumor. Já 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 nesses casos (MOTTET et al., 2011).

1.4 Estresse Oxidativo e Carcinogênese

Durante o processo metabólico normal de uma célula são produzidas espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes que podem resultar do excesso de EROs e ERNs com potencial dano celular (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Os principais exemplos destas espécies são o oxigênio molecular (O_2), radical hidroxila ($OH^\cdot$), ânion superóxido (O_2^-), radical peroxil ($ROO^\cdot$), radical alcóxil ($RO^\cdot$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) (HALLIWELL, 2005).

As EROs e ERNs podem afetar diversas moléculas biológicas, tais como ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), proteínas, lipídeos e carboidratos, além de promoverem dano secundários (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

O dano oxidativo ao DNA leva a produção de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), uma molécula potencialmente mutagênica, e que tem sido fortemente implicado na progressão

da carcinogênese. A determinação do composto 8-OHdG vem sendo comumente realizada em pesquisa, e este tem sido apontado como o biomarcador de maior relevância na avaliação do dano oxidativo ao DNA uma vez que está relacionada com mutagênese e consequente carcinogênese (OHTAKE et al., 2018).

A oxidação protéica pode causar alterações na estrutura de aminoácidos, levando a inativação da atividade enzimática, alteração da regulação da estrutura celular, sinalização celular e vários processos enzimáticos da célula, além de promover a toxicidade. Os principais produtos da oxidação de proteínas, tais como clivagem de ligação peptídica e oxidação de aminoácidos, são a proteína carbonílica (PCB) e os produtos avançados da oxidação protéica (AOPP) (DAVIES, 2016).

Os danos oxidativos aos lipídeos são resultados dos ataques das espécies reativas sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, resultando em lipoperoxidação, causando a perda da seletividade de trocas iônicas e moleculares, liberação de enzimas de organelas e formação de derivados citotóxicos, como o malondialdeído (MDA) e os hidroperóxidos lipídicos (LOOH), como 4-hidroxinonenal (4-HNE) e os F2-isoprostanos. Os produtos de peroxidação lipídica apresentam alta citotoxicidade e ação inibitória de enzimas antioxidantes, atuando como potentes agentes carcinogênicos (AYALA, MUÑOZ, ARGÜELLES, 2014; GASPAROVIC et al., 2017).

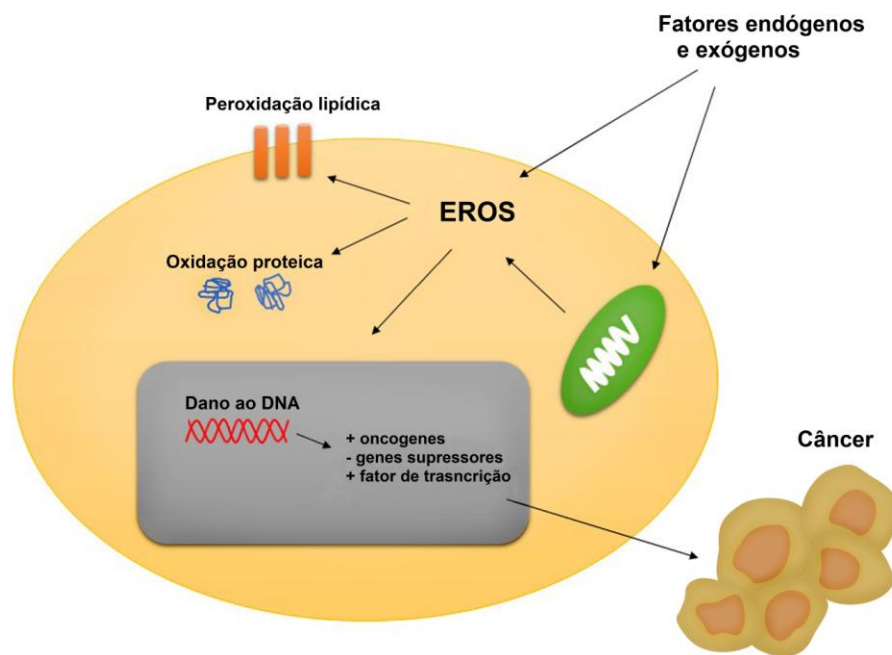
O aumento crônico de EROs e ERNs ao longo do tempo é conhecido por induzir mutações somáticas e transformação neoplásica, promovendo ativação de oncogênese, inativação de genes supressores de tumor, ativação de fatores de transcrição, instabilidade genética, alterações na sensibilidade celular a agentes anticancerígenos, invasão e metástase, como demonstrado na figura 1 (UDENSI; TCHOUNWOU, 2016).

Para antagonizar esses efeitos deletérios dos EROs e ERNs, o organismo desenvolveu um sistema de defesa antioxidante que tem a função de limitar os níveis intracelulares de espécies reativas e inibir ou reduzir os danos celulares e teciduais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, estando presentes tanto no organismo, localizados dentro das células ou na circulação sanguínea, como também nos alimentos ingeridos. As principais enzimas antioxidantes são superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationala-peroxidase (GPx) (VALKO et al., 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Dos componentes não-enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se alguns minerais cobre, manganês, zinco, selênio e ferro, vitaminas (vitamina C, vitamina E, vitamina A), carotenóides (betacaroteno,

licopeno e luteína), bioflavonóides (genisteína, quercetina), taninos (catequinas) e glutathione reduzida (GSH), assim como a proteína glutathione redutase (GSH-red). Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (VALKO et al., 2007; SAHA et al., 2017).

Figura 1. Espécies Reativas de Oxigênio e Evolução à Malignidade.



Legenda: A geração de espécies reativas de oxigênio pode levar a peroxidação lipídica, oxidação proteica e dano ao DNA levando a ativação da oncogênese, inativação de genes supressores e ativação de fatores de transcrição gerando transformação neoplásica e proliferação celular.

ERO: espécies reativas de oxigênio. +: ativação. -: inativação.

Fonte: O próprio autor.

As EROs são consideradas uma significativa classe de carcinógenos que participam da transformação oncogênica, e modulação da resposta celular das células neoplásicas, além de desencadearem a proliferação celular, expansão clonal seletiva e metástase (KUMAR et al., 2008; HOLL et al., 2016). A lesão tecidual da próstata e o estresse oxidativo podem levar a proliferação celular com crescimento hiperplásico, migração celular, além de iniciar e propagar processos oncogênicos (KHANDRIKA et al., 2009; MINCIULLO et al., 2015). Desta forma, vários estudos têm demonstrado associação entre a HPB e o CaP com o

desequilíbrio redox (ARSOVA-SARAFINOVSKA et al., 2009; BATTISTI et al., 2011; WOZNIAK et al., 2012; ROUMEGUERE et al., 2017).

As EROs são reguladoras de diversas vias de transdução de sinais, podendo participar de diversas etapas da transformação e progressão tumoral, como a autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativos, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão e metástase (GILL; PISKOUNOVA; MORRISON, 2016).

1.5 Alteração do Estado Redox em Pacientes com Hiperplasia Prostática Benigna

Diversos estudos têm demonstrado a associação entre HPB e o estresse oxidativo (MERENDINO et al., 2003; ARYAL et al., 2007; VITAL; CASTRO; ITTMANN, 2016; ZABAIYOU et al., 20016).

Em 2003, Merendino e colaboradores avaliaram os níveis de MDA e demonstraram níveis aumentados no plasma de 22 pacientes com HPB em comparação com 22 indivíduos saudáveis, além de uma correlação positiva entre os níveis de PSA total e MDA. Estes dados mostram aumento dos níveis de MDA em pacientes com HPB confirmando o envolvimento do estresse oxidativo em pacientes com HPB. Resultado semelhante foi encontrado por Aryal e colaboradores (2007) que avaliaram o estresse oxidativo em 48 pacientes com HPB e 46 indivíduos controles. Os níveis de MDA, determinados pela metodologia de substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), apresentaram-se aumentados nos pacientes com HPB, ao passo que houve uma redução nos níveis de vitaminas E e C, quando comparado com controles. Em pacientes com HPB foi demonstrada uma correlação inversa entre os níveis de MDA e as vitaminas E e C. Esses dados sugerem o desequilíbrio redox presente nesta doença.

Em 2016, Vital; e colaboradores analisaram o dano oxidativo ao DNA avaliando o 8-OHdG, em 32 amostras de tecido de próstata da zona de transição hiperplásica e compararam com amostras da zona de transição normal. Os tecidos da zona de transição hiperplásica continham níveis maiores de 8-OHdG quando comparados aos tecidos da zona de transição normal, além disso, os níveis de 8-OHdG foram correlacionados com o peso da próstata. Os autores concluíram que o estresse oxidativo e o dano oxidativo do DNA são importantes na patogênese da HPB.

Ainda em 2016, Zabaiou e colaboradores também avaliaram o estado redox nos tecidos de 24 pacientes com HPB com idade entre 58 e 85 anos. De acordo com a massa da próstata hiperplasica estimada por ultrassom, os pacientes foram divididos em quatro grupos:

grupo 1 (n=6), próstata com 20-40 g; grupo 2 (n=6), próstata com 41-60 g; grupo 3 (n=6), próstata com 61-80 g; e grupo 4 (n=6), próstata maior que 100 g. Os pacientes do primeiro grupo, os quais tiveram um menor tamanho da próstata foram utilizados como controle. Este estudo verificou uma alta peroxidação lipídica evidenciada pelo aumento do MDA nos tecidos de próstata aumentadas de tamanho e diminuição dos níveis de GSH de acordo com o aumento do tamanho da próstata. Além disso, as enzimas SOD e CAT também apresentaram diminuição nos grupos 3 e 4. Os achados do presente estudo sugerem que o desenvolvimento da HPB é acompanhado do aumento estresse oxidativo.

1.6 Alteração do Estado Redox em Pacientes com CaP

Durante a última década, vários estudos têm evidenciado o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento e progressão do CaP (FREITAS et al., 2012; SHIOTA et al., 2012; VITAL; CASTRO; ITTMANNM, 2016; KAYA, et al., 2017; OHTAKE et al., 2018).

Miyake e colaboradores (2004) verificaram o dano oxidativo do DNA em pacientes com CaP, avaliando os níveis de 8-OHdG urinário em relação aos níveis de creatinina urinária. Foram estudados 82 pacientes com CaP antes e após 2 meses do tratamento, destes, 42 sofreram prostatectomia radical e 40 receberam terapia hormonal. A proporção 8-OHdG/Creatinina na urina em pacientes com CaP foi maior do que em indivíduos controles. Os níveis de 8-OHdG/Creatinina urinário diminuíram após a terapia hormonal. Esses achados sugerem que o estresse oxidativo pode estar envolvido em um evento precoce no desenvolvimento do CaP e que a supressão de androgênio é capaz de diminuir o estresse oxidativo.

Já em 2006, Surapaneni e Venkata avaliaram os níveis eritrocitários de peroxidação lipídica e o estado antioxidante em 30 pacientes com CaP e 30 indivíduos controle, com média de idade de 60 anos. Observou-se que os níveis de GSH foram menores e os níveis de MDA e a atividade da SOD foram maiores em pacientes com CaP em comparação com os controles. Os autores sugerem que o estresse oxidativo pode estar envolvido no CaP, como evidenciado pelos maiores níveis de MDA e níveis baixos de GSH, além de que o aumento da atividade enzimática da SOD poderia ser uma regulação compensatória em resposta ao dano oxidativo.

Posteriormente, Akinloye e colaboradores (2009) avaliaram os níveis de antioxidantes e peroxidação lipídica em relação aos níveis de PSA em pacientes com CaP em 3 grupos de acordo com a gravidade da doença avaliada pelos níveis de PSA; grupo 1 (baixo grau) com um nível de PSA de 5-10 ng / mL (n = 33), grupo 2 (grau médio) com PSA de 11-20 ng / mL

(n = 45) e grupo 3 (alto grau) com PSA > 20 ng / mL (n = 42). O grupo controle consistiu de 50 indivíduos saudáveis com PSA <3,0 ng / mL. A peroxidação lipídica sérica foi elevada em pacientes com PSA > 11 ng / mL. Os níveis de peroxidação lipídica foram 107% maiores em indivíduos com PSA entre 11-20 ng / mL e 98% em pacientes com PSA ≥20 ng / mL. As atividades de SOD e CAT foram menores em todos os pacientes com PCa. Indivíduos com níveis de PSA de 11-20 ng / mL e PSA > 20 ng / mL apresentaram níveis mais baixos de ácido úrico e GSH; houve uma redução nos níveis plasmáticos de vitaminas C e E. Os níveis de vitaminas C e E diminuíram entre 27% e 77% em indivíduos com níveis de PSA > 20 ng / mL e entre 25% e 47% em indivíduos com níveis de PSA de 11-20 ng / mL. Os resultados confirmaram a redução de antioxidantes em pacientes com CaP e uma relação inversa entre os valores de antioxidantes e PSA neste grupo.

Em 2012, Wozniak e colaboradores (2012) avaliaram alguns marcadores de estresse oxidativo em 30 homens saudáveis e 60 pacientes com CaP submetidos a altas doses de braquiterapia (radioterapia interna) com radioterapia por feixe externo. Amostras de sangue foram coletadas antes do tratamento, logo em seguida, após 1,5 mês, 3 meses do término do tratamento e finalmente, aproximadamente dois anos após sua finalização. A atividade da GPx estava reduzida em todos os períodos (antes do tratamento, logo após o tratamento, 1,5-3 meses após o término do tratamento e após dois anos do tratamento) quando comparada aquela obtida em indivíduos saudáveis. Não foram encontradas diferenças significativas comparando a atividade da SOD e da CAT de pacientes com CaP com a dos controles. A concentração de TBARS plasmática foi maior em todos os períodos nos pacientes com CaP quando comparadas ao grupo controle. No entanto, após dois anos do término do tratamento, os níveis de TBARS eritrocitário foram semelhantes ao observado no grupo controle, o que sugere uma tendência a normalização dos processos de oxidação-redução sistemicamente. No entanto, a concentração de TBARS no plasma não diminuiu, o que prova que não foi obtida uma restauração completa do equilíbrio oxidante-antioxidante. Desta forma, os autores concluíram que no curso do CaP ocorre um desequilíbrio dos processos oxidante-antioxidante e que a terapia com radiação não alterou os níveis de marcadores de estresse oxidativo. Além disso eles relataram que dois anos poderiam não ser um período de tempo suficiente para que os processos de oxidação-redução retomassem à normalidade.

Posteriormente, Pande e colaboradores (2013) também avaliaram a relação entre o estresse oxidativo e a agressividade do CaP. Este estudo analisou 40 pacientes com CaP e 40 indivíduos saudáveis com idades de 64 a 68 anos e mediu os níveis de 8-OHdG, PCB, MDA, capacidade antioxidante total sérica avaliada pela metodologia de *Trolox Equivalent*

Antioxidant Capacity (TEAC), índice de proliferação celular e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Eles verificaram que em pacientes com CaP, os níveis séricos de 8-OHdG, PCB, MDA, índice de proliferação celular, níveis de VEGF foram maiores e o TEAC foi menor quando comparados ao controle. O trabalho verificou que quanto maior o PSA, estadiamento e o Gleason, maiores foram os valores de 8-OHdG, PCB, MDA, Índice de proliferação celular e VEGF e menores os de TEAC. Esses achados mostram que o desequilíbrio redox, a piora do índice de proliferação celular e o aumento do VEGF estão presentes no CaP e se relacionam com a progressão da doença.

Recentemente, Ahmed e colaboradores (2018) avaliaram as atividades das enzimas antioxidantes SOD, GSH e CAT, e também os níveis séricos de MDA, em 25 pacientes diagnosticados com CaP e compararam com 25 indivíduos controle. A atividade da SOD, GSH e CAT em pacientes com CaP foi menor, enquanto os níveis séricos de MDA foram maiores quando comparados ao do grupo controle. Os dados sugerem que a causa do desenvolvimento do CaP pode ser o resultado de um desequilíbrio entre os antioxidantes e pró-oxidantes. Portanto, SOD, CAT, GSH e MDA podem desempenhar um papel importante na etiopatogênese do CaP.

1.7 Alteração do Estado Redox em pacientes com HPB e CaP

Enquanto nos estudos anteriormente citados investigaram o estresse oxidativo em pacientes separadamente com HPB ou CaP e compararam com indivíduos saudáveis, vários outros estudos compararam estes biomarcadores entre esses dois grupos (KAYA et al., 2017; SRIVASTAVA; MITTAL, 2005).

O papel do NO no câncer dependem da concentração, localização, exposição e sensibilidade celular ao NO, visto que o NO pode inibir a progressão de tumores tanto quanto promover o seu crescimento. O NO produzido por óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e liberado pelos macrófagos pode causar citotoxicidade por invadir a célula alvo inativando enzimas envolvidas na respiração celular e com isso levar a morte celular outro papel que o NO pode desempenhar no tumor é promover o crescimento tumoral por aumentar o fluxo sanguíneo mediado por produção prolongada e excessiva de NO, podendo promover a angiogênese e com isso metastase (CHOUDHARI et al., 2013).

Klotz e colaboradores (1998) compararam a expressão da enzima iNOS por imunohistoquímica no tecido prostático de 16 pacientes com CaP e de 10 pacientes com HPB. O tecido de pacientes com CaP apresentou elevada expressão de iNOS. Já no tecido de pacientes

com HPB não pode ser detectada sua expressão. Os autores sugerem que a expressão epitelial de iNOS pode ser usada como marcador imunohistoquímica para o CaP.

Posteriormente, Srivastava e Mittal (2005) analisaram o desequilíbrio redox em 45 pacientes com CaP, 55 com HPB e 25 indivíduos saudáveis com idade entre 60 a 62 anos. Foram observados níveis elevados de MDA e da atividade da glutathiona-S- transferase (GST) em pacientes com CaP e HPB em comparação com os controles. No entanto, a concentração de GSH e a atividade de GPx foram menores em pacientes com CaP e HPB em comparação com o grupo controle. Os autores sugerem que o desequilíbrio redox pode ser um dos maiores fatores responsáveis pelo desenvolvimento de HPB e CaP.

No ano seguinte, Aydin e colaboradores (2006) avaliaram marcadores de estresse oxidativo em 25 pacientes com CaP, 36 com HPB e 24 pacientes controle com idade entre 46 a 80 anos. Este estudo encontrou concentrações aumentadas de TBARS e atividade diminuída das enzimas GPx e SOD em pacientes com CaP em relação aos grupos HPB e controle. Esses resultados demonstram que alterações na peroxidação lipídica e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes podem desempenhar um papel importante na carcinogênese da próstata.

Já em 2007, Goswami e colaboradores analisaram a resposta inflamatória de fase aguda a partir dos níveis séricos de ácido siálico (uma classe de carboidratos presente em algumas proteínas inflamatórias de fase aguda) e o estresse oxidativo pela determinação dos níveis séricos de TBARS e PCB, proteínas totais e PSA. Para isso foram selecionados 30 participantes, subdivididos em CaP (n=10), HPB (n=10) e controles saudáveis (n=10). No grupo CaP, TBARS, PCB e ácido siálico aumentaram em comparação com o grupo HPB e controles. Os autores concluíram que o dano oxidativo é maior nos pacientes com CaP e que os níveis de ácido siálico poderiam ser um marcador para diferenciar a HPB do CaP.

No ano seguinte, Kotrikadze e colaboradores (2008) selecionaram 45 participantes com idades entre 60 a 75 anos subdivididos em 3 grupos: CaP (n=15), HPB (n=15) e controle (n=15). Os autores demonstraram aumento do MDA nos grupos HPB e CaP, quando comparados com o controle. A atividade da SOD estava aumentada em pacientes com HPB e diminuída em CaP quando comparadas com o grupo controle. Já a atividade de CAT permaneceu inalterada na HPB, enquanto estava diminuída em pacientes com CaP quando comparadas com o grupo controle. A ceruloplasmina e a GSH estavam aumentadas tanto no grupo HPB quanto no grupo com CaP assim como a atividade da glutathiona redutase (GSH-Red) quando comparadas com o grupo controle. A atividade da GPx foi maior em pacientes com HPB, no entanto estava reduzida no CaP quando comparadas com o grupo controle. A

presença de HPB é refletida fracamente pelas alterações no sistema antioxidante sanguíneo. No entanto, em pacientes com CaP pode-se verificar uma marcante alteração no perfil antioxidante.

Um outro estudo publicado em 2009 avaliou 107 pacientes com CaP, 167 com HPB e 38 indivíduos controles. Pacientes com CaP apresentaram aumento nos níveis de TBARS, metabólitos do óxido nítrico (NOx) e guanosina monofosfato cíclico (cGMP) e redução da atividade da GPx e SOD quando comparados aos grupos controles e HPB. A atividade da CAT diminuiu nos pacientes com CaP quando comparados ao controle. O grupo HPB apresentou maiores níveis de MDA e NOx, com menores atividades de SOD e GPx quando comparado ao grupo controle. Este estudo confirmou um desequilíbrio no estado redox com aumento do estresse nitrosativo em pacientes com CaP (ARSOVA-SARAFINOVSKA et al., 2009).

Pace e colaboradores (2010) analisaram amostra de sangue de 15 pacientes para cada um dos três grupos a seguir: HPB, CaP e controle. A concentração plasmática de peróxidos foi avaliada utilizando um ensaio colorimétrico comercialmente disponível que determinava a concentração total de peróxido de uma amostra pela reação de peróxidos biológicos com a peroxidase e uma subsequente reação de cor usando trimetoxibenzeno como substrato. Os níveis de peróxidos foram maiores em pacientes com CaP em relação à HPB. Observou-se uma correlação inversa entre peróxidos e TEAC em pacientes com HPB. Esses resultados confirmam um desequilíbrio do estado redox em pacientes com HPB e CaP e sugerem um potencial envolvimento do estresse oxidativo como determinante na patogênese dessas doenças.

Kosova et al. (2014) estudaram a relação entre MDA, dano do DNA (8-OHdG) e caspase-3 em 20 pacientes com HPB e 20 com CaP. Os níveis séricos de MDA e de 8-OHdG estavam aumentados no grupo CaP quando comparados ao grupo com HPB. No entanto, os níveis séricos de caspase-3 estavam reduzidos em CaP comparado com o grupo HPB. Esses resultados indicam que os níveis aumentados de MDA nos pacientes com CaP gera uma citotoxicidade e ação inibitória sobre as enzimas protetoras, agindo como um promotor tumoral e agente carcinogênico, além disso o estresse oxidativo causa modificações na base do DNA seguido por parada do ciclo celular nas células cancerígenas, assim como a alterações na expressão das caspases desregulam a morte celular e a proliferação homeostática levando ao desenvolvimento e progressão do CaP.

Kaya e colaboradores (2017) também avaliaram os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em pacientes com CaP (n=30), com HPB (n=41), com prostatite (n=26) e

indivíduos controle (n=30), com média de idade entre 45 a 68. Foram encontradas aumento de MDA nos pacientes com CaP quando comparadas com os demais grupos. Foi observada também, uma maior atividade de CAT em pacientes com CaP quando comparados com HPB e com o grupo controle. Estes dados mostraram um aumento do estresse oxidativo em pacientes com CaP quando comparados com pacientes com HPB e grupo controle. Os autores concluíram que um desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante parece levar a um aumento do dano oxidativo e consequentemente tem um papel importante na fisiopatologia do HPB e CaP.

No mesmo ano, Kucukdurmaz e colaboradores (2017) verificaram a atividade da prolidase sérica (SPA) que é uma enzima que está envolvida na renovação e degradação do colágeno e no crescimento celular além de ser um marcador de estresse oxidativo, em pacientes com HPB (n=51) e com CaP (n=30). Os valores de SPA foram semelhantes em pacientes com HPB e CaP. A SPA não se correlacionou com a idade, MDA ou SOD em ambos os grupos. Os resultados deste estudo demonstraram que a atividade da SPA é semelhante nos casos de HPB e CaP e não está correlacionada com o estresse oxidativo ou PSA.

Posteriormente, Ohtake e colaboradores (2018) avaliaram o estresse oxidativo pelos níveis de expressão de 8-OHdG no tecido prostático de 10 pacientes com CaP e 70 pacientes com HPB. A expressão de 8-OHdG no CaP (30,0% moderada e 70,0% forte) foi maior do que a observado na HPB (71,4% moderada e 28,6% forte; (p <0,01). Os dados sugerem que a expressão aumentada de 8-OHdG nos pacientes com CaP pode ser utilizada como marcador tumoral na detecção do CaP.

1.8 Alteração do Estado Redox em Pacientes com CaP Metastático

A metástase do câncer é um processo no qual as células cancerígenas se disseminam do tumor primário, se estabelecem e crescem em um local diferente do local primário do tumor. Os fatores envolvidos nesse processo são as quimiocinas e seus receptores (QUAIL; JOYCE 2013; MASSAGUÉ; OBENAUF 2016; HIRAGA 2019), bem como as moléculas de adesão celular (MACs) (TAI et al., 2014; YASMIN-KARIM et al., 2016; MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016).

Este processo é complexo e compreende muitos eventos, tais como as células metastáticas se desprendem do tumor primário rompendo a matriz extracelular e invadem o tecido adjacente quando ocorre o intravasamento e o deslocamento da célula metastática na circulação. Quando essas células caem na circulação, as células tumorais são chamadas de

células tumorais circulantes (CTCs), que devem sobreviver na circulação até sua parada em microvasos de vários órgãos então há o extravasamento, que envolve várias etapas. Para isso, as CTCs rolam nas superfícies das células endoteliais que expressam a 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 tumorais e as células endoteliais. Este processo permite a colonização no órgão alvo, proliferação e angiogênese (YASMIN-KARIM et al., 2016; MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016).

As células tumorais do CaP tendem, preferencialmente, a metastizar para o tecido ósseo através de interações da quimiocinas fator 1 derivado de células estromais alfa (SDF-1) conhecida como CXCL12 que é expressa no tecido ósseo e os receptores de quimiocinas tipo 4 (CXCR4) que é expresso em maiores quantidades, no CaP (HIRAGA, 2019) além da interações específicas do local sendo que a principal MAC envolvida nesse processo é a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) (TAI et al., 2014).

A metástase óssea do CaP é um importante problema clínico e é comumente associado com complicações esqueléticas, como fraturas patológicas, hipercalcemia, lesão medular e dor (HIRAGA, 2019). O CaP é um tumor de crescimento lento, porém as células metastáticas do CaP ao entrarem no tecido ósseo, a taxas de crescimento muitas vezes é superior às do tumor primário sugerindo que a presença de fatores ósseos estimula a proliferação tumoral (COOPER; PIENTA, 2000). A taxa de sobrevivência de cinco anos do CaP localizado é de quase 100%, enquanto apenas 28% dos homens diagnosticados com CaP metastático sobrevivem além de cinco anos (CLARK; TORTI, 2003).

O estresse oxidativo além de regular o crescimento e a sobrevivência do tumor, pode inibir os mecanismos de ativação da apoptose, além de aumentar a taxa de migração celular e com isso propiciar a invasão tumoral e formação de metástases (KUMAR et al., 2008).

Iynem e colaboradores (2004) avaliaram 20 indivíduos controle e 21 paciente com CaP metastático antes e após três meses da terapia antiandrogênica. Os resultados mostraram que os níveis de GSH eritrocitário, a atividade de GSH-Red e GPx e os níveis plasmáticos de vitamina E foram menores nos pacientes com CaP quando comparados com o grupo controle. Já os níveis plasmáticos de MDA antes do tratamento estavam aumentados nos pacientes CaP quando comparado ao grupo de controle. Porém, após a terapia, houve diminuição no nível de MDA plasmático e aumento na atividade de GST. O estudo demonstrou que a terapia

antiandrogênica aumentou a atividade da GST, além de promover a diminuição da peroxidação lipídica.

Almushatat e colaboradores (2006) também avaliaram a atividade antioxidante e a peroxidação lipídica em 20 pacientes com HPB, 78 pacientes com CaP e 14 indivíduos controle. Posteriormente, os pacientes com CaP foram subdivididos de acordo com o estágio da doença em: CaP localizados (n=40) e CaP metastáticos (n=38). Os pacientes com CaP localizado e metastático apresentaram maiores concentrações de MDA e menores concentrações dos compostos antioxidantes, como luteína, licopeno e betacaroteno quando comparados com o grupo controle. Pacientes com CaP metastático, quando comparados com pacientes com doença localizada, apresentaram menores concentrações de PSA, alfa-tocoferol, retinol, luteína e licopeno. Nos pacientes com CaP, o PSA foi correlacionado positivamente com as concentrações de MDA. Em contraste, houve uma correlação negativa entre as concentrações de MDA com a luteína e o licopeno. Os autores sugerem que a baixa concentração de PSA total encontrada nos pacientes com CaP metastático seja devida ao tratamento hormonal que estes pacientes estavam submetidos. Estes resultados sugerem que concentrações baixas de licopeno podem indicar a progressão da doença.

Posteriormente, Battisti e colaboradores (2011) avaliaram o estado oxidativo e a defesa antioxidante em homens com idade entre 60 a 69 anos, sendo 55 pacientes com CaP e 55 indivíduos saudáveis (controle). Os pacientes com CaP foram subdivididos levando em consideração: tratamento, Gleason e metástase óssea. A atividade da CAT e os níveis de vitamina C e vitamina E estavam reduzidos em pacientes com CaP quando comparado com os controles. Já os níveis de MDA, PCB e a atividade da SOD e GSH foram maiores no grupo com CaP em relação ao grupo controle. Porém quando comparados pacientes com metástases ósseas em relação aos de doença localizada, os níveis de SOD foram aumentados nos pacientes com doença localizada, contudo níveis aumentados de GSH foi visto nos pacientes com doença metastática, já os níveis MDA, PCB, CAT, Vitamina C e E não se alteraram entre os grupos doença localizada e metastática. Em relação ao tratamento os níveis de MDA foram aumentados nos pacientes que não receberam tratamento quando comparados aos controles. A atividade da CAT foi reduzida em pacientes não tratados quando comparados aos controles. Os níveis GSH foram aumentados em todos os grupos. A vitamina C foi reduzida em todos os grupos tratados quando comparados aos controles e a vitamina E foi reduzido apenas nos pacientes não tratados quando comparados aos controles. Quando os pacientes foram divididos de acordo com o escore de Gleason os níveis de MDA foram aumentados em todos os pacientes em relação ao controle. Os níveis de PCB foram maiores nos pacientes com

1 escores de Gleason maiores que 7, contudo a atividade da CAT foi reduzida neste grupo
2 quando comparado aos demais grupos e ao controle. Os níveis de GSH foram aumentados em
3 todos os grupos. Por outro lado, os níveis de vitamina C e vitamina E foram reduzidos em
4 todos os grupos em relação ao grupo controle. Este estudo sugere que o nível de estresse
5 oxidativo está alterado nos pacientes com CaP e que pacientes com tumores mais agressivos
6 apresentam intensidade maior de estresse oxidativo em relação a tumores menos agressivos.

7 Brys e colaboradores (2012) analisaram níveis de 8- isoprostaglandina F2-alfa (8-
8 isoPGF2 α) urinária, um marcador de oxidação lipídica, em 30 pacientes com CaP e os
9 comparou a um grupo controle de 233 indivíduos saudáveis. A amostra urinária de 8-
10 isoPGF2 α foi colhida antes da biópsia de próstata. Os pacientes com CaP foram divididos em
11 3 grupos pelo Escore de Gleason (Grupo I: Gleason 2 a 4; Grupo II: Gleason 5 a 7; Grupo III:
12 Gleason 8 a 10) e pelo estadiamento da doença pelo sistema TNM após a prostatectomia
13 radical (T1-2N0M0; T3- 4N0M0 e TxN1 ou M1). Foram encontrados níveis aumentados de
14 8-isoPGF2 α nos pacientes com CaP em relação ao grupo controle. Em relação ao Escore de
15 Gleason e estadiamento da doença, os níveis de 8-isoPGF2 α foram maiores grupo II e em
16 estadios mais avançados (TxN1 ou M1) quando comparados a Gleason e estadios menores.
17 Desta forma, os autores sugerem que EROs induzem a peroxidação de ácidos graxos
18 insaturados em pacientes com CaP, e os níveis de isoprostanos urinário podem ser usados
19 como um marcador não invasivo para determinação do estresse oxidativo.

20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

2 JUSTIFICATIVA

Justificativa do Estudo de revisão

A pesquisa bibliográfica de estudos que avaliaram o estresse oxidativo e nitrosativo na HPB e CaP poderá acrescentar informações importantes para compreender o envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo na fisiopatologia do HPB e CaP.

Justificativa do Estudo de original

Considerando o importante envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo no desenvolvimento e progressão da HPB e CaP revisamos os estudos que avaliaram o estresse oxidativo e nitrosativo e as defesas antioxidantes nos pacientes com HPB e CaP. Além disso até o presente momento, poucos estudos avaliaram o estresse oxidativo em pacientes com CaP metastático e nenhum estudo avaliou os biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo categorizados de acordo com o escore de estratificação de risco para metástase. Não está bem estabelecido o envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo 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 e posteriormente serem estudados como possíveis alvos terapêuticos.

Além do mais os métodos atualmente disponíveis no diagnóstico do CaP possuem limitada sensibilidade e especificidade, portanto, é de extrema importância a identificação de biomarcadores que sejam sensíveis, específicos, não-invasivos e acessíveis financeiramente e que possa se associado ao diagnóstico e o prognóstico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo e associá-los com a presença de metástases e o escore de estratificação de risco para metástase em pacientes com CaP.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar revisão bibliográfica sobre artigos que tenham avaliado estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com CaP e HPB
- Comparar os marcadores inflamatório e do estresse oxidativo, nitrosativo e inflamatório em pacientes com CaP localizado, metastático e indivíduos saudáveis;
- Determinar se os parâmetros inflamatório e do estresse oxidativo, nitrosativo e inflamatório estão associados à presença de metástases;
- Determinar a associação dos parâmetros inflamatório e do estresse oxidativo, nitrosativo e inflamatório com o escore de estratificação de risco para metástase;

4 SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do Estudo de revisão

Este estudo apresenta uma coleção abrangente de revisões sistemáticas atualizadas e outras publicações importantes sobre a complexa associação de estresse oxidativo e a BPH e PCa. Descrevemos desenvolvimentos e perspectivas importantes com base em uma análise sistemática das pesquisas mais citadas neste campo.

Foram pesquisadas nas bases de dados eletrônicas PUBMED, Lilacs, Scientific Eletronic Library Online (SCIELO), e Science Direct, em inglês, publicadas até janeiro de 2019 utilizando as palavras-chave "câncer de próstata", "hiperplasia benigna da próstata", "estresse oxidativo", "espécies reativas de oxigênio", "radicais livres", "peroxidação lipídica", "antioxidantes".

Os critérios de inclusão foram artigos originais, estudos em humanos sem limite de data de publicação ou número de sujeitos, estudos com delineamento experimental (ensaio clínico, randomizados ou não) ou observacionais (caso-controle e coorte), enquanto critérios de exclusão foram estudos *in vitro* ou em modelos animais. A lista de referências aos artigos selecionados também foi investigada.

4.2 Delineamento do Estudo original

Este é um estudo observacional, prospectivo, do tipo caso-controle onde foram selecionados 213 homens, com idade entre 30 à 90 anos, sendo 149 pacientes com diagnóstico de CaP (sem metástase =108, com metástase =41) recrutados pelo Ambulatório de Urologia do Hospital do Câncer de Londrina e 64 homens saudáveis (grupo controle) selecionados entre pacientes que compareceram para o exame preventivo de rotina em consultório particular. A presença ou ausência de metástase foi definida pelo aumento de PSA (recorrência bioquímica), associado com exames de imagem. A classificação pela estratificação de risco para metástase foi realizada de acordo com o risco de recorrência da doença após tratamento de acordo com o proposto pelo 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).

Os critérios de inclusão para participantes do grupo controle foram 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 guiada pela ultrassonografia transretal. Os pacientes CaP apresentavam diferentes tipos de tratamento no momento da coleta: sem tratamento (n=65, 46%), 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: 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 avaliados por um médico urologista e responderam a um questionário padrão do estudo para avaliação dos dados antropométricos e clínicos (Apêndice).

Foram excluídos do estudo os participantes que faziam uso de suplementos antioxidantes e com presença de doenças inflamatórias e/ou infecciosas agudas ou crônicas, história prévia de outros cânceres e doença renal crônica dialítica. A presença de SM foi definida seguindo o critério de *Adult Treatment Panel III* (ATP III), no qual SM foi diagnosticada na presença de três ou mais dos seguintes critérios: 1) circunferência abdominal > 94 cm; 2) níveis de triglicerídeos ≥ 150 mg/dL; 3) Lipoproteína de alta densidade (HDL) < 40 mg/dL; 4) Pressão arterial $> 130/85$ mmHg (ou uso de medicamento antihipertensivo) e; 5) Níveis de glicemia ≥ 100 mg/dL (ou uso de medicamento hipoglicemiante) (GRUNDY et al., 2006).

O presente estudo faz parte do projeto de pesquisa 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 (Apêndice).

4.2.1 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. A circunferência abdominal foi medida com uma fita suave na região entre a última costela e a crista ilíaca, sempre com os indivíduos na posição em pé.

4.3 Análises Laboratoriais

Após jejum ou não de 12h, as amostras de soro ou plasma foram obtidas a partir da centrifugação de sangue total do paciente, obtido em tubo de coleta sem anticoagulante ou com anticoagulante EDTA e Fluoreto, respectivamente, por 15 minutos a 3.000 rpm para separação e foram aliquotadas e armazenadas a -80° C até a realização dos testes.

4.3.1 Análises Imunológicas e Hematológicas

A determinação de PSA total, PSA livre e ferritina foram realizadas por quimioluminescência em micropartículas (CMIA) no equipamento Architect (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, EUA). 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). A velocidade de hemossedimentação (VHS) foi realizada em equipamento automatizado (Testel, Alifax, Polverara, Italy).

4.3.2 Avaliação do Estresse Oxidativo

Quimioluminescência Induzida Por T-Butil Hidroperóxidos (QL): os níveis plasmáticos e eritrocitários de hidroperóxidos lipídicos foram avaliados por quimioluminescência induzida por tert-butil hidroperóxido no equipamento Glomax de acordo com a metodologia proposta por Flecha e colaboradores (1990). A QL estimulada por t-butil hidroperóxido foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidante não enzimáticos e os níveis de peróxidos lipídicos. Os níveis plasmáticos avaliam principalmente a formação de hidroperóxidos lipídicos oriundos da oxidação de partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada enquanto a avaliação eritrocitária avalia principalmente a peroxidação de lipídeos presentes na membrana celular (SIMÃO et al., 2006). Os dados foram expressos como unidades reativas de luz (RLU).

Determinações De Proteína Carbonílica Plasmática (PCB): foram determinados de acordo com o método de Levine e colaboradores (1990) por espectrofotometria. Os valores foram expressos em nmoles/mg de proteína.

Determinações De Produtos Avançados Da Oxidação Protéica (AOPP): foram determinados no plasma de acordo com o método proposto por Witko-Sarsat e colaboradores (1998) por espectrofotometria. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de equivalente de cloramina-T.

Determinação Dos Níveis Plasmáticos De Metabólitos De NO (NOx): Os níveis de NO foram determinados a partir da quantificação de seus metabólitos plasmáticos, nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) utilizando previamente grânulos de cádmio para a redução do nitrato a nitrito. Posteriormente, foram determinadas as concentrações desses metabólitos de acordo com o método de Griess (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 1998) modificado por Panis e colaboradores (2012) por espectrofotometria. Os valores foram expressos em μM .

Determinação De Grupamentos Tióis Protéicos (SH): A quantificação de grupamentos SH de proteínas foi avaliado no plasma por espectrofotometria, de acordo com o método descrito por Hu (1994). Esta técnica baseia-se na reação do ácido 2,2 ditiobisnitrobenzóico (DTNB) com o grupo tiol das proteínas. Os resultados foram expressos em μM .

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 *post test* de Bonferroni. Os dados foram expressos como média ($\pm$ desvio padrão) (DP). Dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis com *post test* 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 e a razão de chance (*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 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em dois artigos científicos:

Artigo 1: **OXIDATIVE STRESS IN BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA AND PROSTATE CANCER: REVIEW**, que será submetido a periódico científico com Qualis B.

Artigo 2: **METABOLITES OF NITRIC OXIDE AND THIOL GROUP IN PROSTATE CANCER: ASSOCIATION WITH METASTASIS AND DEGREE OF METASTASIS RISK STRATIFICATION**, que será submetido a periódico científico com Qualis B1 ou A2.

Artigo 1

OXIDATIVE STRESS IN BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA AND PROSTATE CANCER: REVIEW

Background: Benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa) are the two most clinically important and prevalent forms of abnormal prostate growth in elderly men. Oxidative stress is an important factor in the development and progression of BPH and PCa and has a crucial role in the metastatic process. The aim was to review studies that evaluated oxidative stress in BPH and PCa. **Methods:** A bibliographic search was carried out in the electronic databases PUBMED, Lilacs, Scientific Electronic Library Online (SCIELO), and Science Direct, in English, published up to January 2019 using the key words "prostate cancer", "benign prostatic hyperplasia", "oxidative stress", "reactive oxygen species", "free radical", "lipid peroxidation", "antioxidants". The list of references of the selected articles was also investigated. Inclusion criteria were original human articles with no publication date or number of subjects, experimental or observational designs, while exclusion criteria were in vitro or animal model studies. **Results:** We selected 50 articles in humans, BPH: n=4 case-control articles; PCa: n=12 case-control articles; BPH and PCa: n=14 case-control; Studies evaluating antioxidant intake and PCa risk: cohort: n=6, case control: n= 3; with antioxidants: n=11. **Conclusion:** Several studies have demonstrated the presence of oxidative and nitrosative stress in BPH and PCa, both due to the increase in reactive oxygen species (ROS) and the deficiency of the antioxidant system. The most studied marker to evaluate lipid peroxidation was malondialdehyde (MDA), while the activity of the most analyzed antioxidant enzymes was catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione (GSH). Increasing evidence indicates that oxidative stress play an important role in the pathogenesis of prostate. Use of antioxidants in the diet has obtained controversial results, but lycopene seems to present beneficial effects on PCa risk. Further studies are needed to understand how to improve oxidative stress and antioxidant defenses in the pathophysiology of PCa and whether these markers may be useful in the diagnosis and prognosis of PCa.

Key Words: Thiol Groups; Oxidative Stress; Prostate cancer; Benign Prostatic Hyperplasia, Antioxidant.

Abbreviations and Acronyms

BPH:	benign prostatic hyperplasia
CAT:	catalase
DNA:	deoxyribonucleic acid
EBT:	external brachytherapy therapy
GSH:	glutathione
GST:	glutathione s transferase
GSH-P:	glutathione peroxidase activity
GSH-Red:	glutathione reductase
HDR:	high-dose brachytherapy
iNOS:	inducible nitric oxide synthase
MDA:	malondialdehyde
NAC:	N-acetyl-cysteine
PCa:	prostate câncer
PCB:	carbonyl protein
PIN:	prostatic intraepithelial neoplasia
PSA:	prostate specific antigens
ROS:	reactive oxygen species
SOD:	superoxide dismutase
TBA:	thiobarbituric acid
TBARS:	thiobarbituric acid reactive substances
TEAC:	total equivalent antioxidant capacity
TNM:	tumor, node, metastasis
TWIST1:	twist-related protein 1
VEGF:	vascular endothelial growth factor
YB-1:	Y-box binding protein-1
4-HNE:	4-hydroxy-2-nonenal histidine
8-isoPGF2 α :	8-iso prostaglandin F2-alpha
8-OHdG:	8-hydroxy-deoxyguanine

1 INTRODUCTION

2 Prostatic hyperplasia is a common urologic disease that affects mostly elderly men and
3 can be classified as benign prostatic hyperplasia (BPH), or prostate cancer (PCa) based on its
4 severity.

5 According to GLOBOCAN, PCa occupies the 4th place in the world of cancer cases
6 with an incidence of 29.3/100 thousand cases, with a mortality rate of 7.6/100 thousand for
7 the year 2018. The prevalence for the next 5 years for the PCa is 2.508.684 in the world.
8 Brazil is the second country with the highest incidence of PCa, behind only the US
9 (GLOBOCAN, 2018). In Brazil, 68,220 new cases of PCa were estimated for each year of the
10 2018-2019 bienniums. These values correspond to an estimated risk of 66.12/100 thousand
11 new cases (INCA, 2018).

12 The PCa is associated with increased cell proliferation, cellular migration, and
13 oncogenic processes (KHANDRIKA et al., 2009; MINCIULLO et al., 2015). In addition,
14 oxidative stress (OS) is known to influence the activities of inflammatory mediators and other
15 cellular processes involved in the initiation, promotion and progression of human neoplasms
16 including prostate cancer. Scientific evidence also suggests that BPH and PCa are commonly
17 associated with a change in redox balance propose an association among oxidative stress and
18 development and progression of BPH and PCa (SARAFINOVSKA et al., 2009; BATTISTI et
19 al., 2011). Thus, this review highlights the recent studies in BPH and PCa and it also
20 examines the role of OS, antioxidant consumption and interventional studies with
21 antioxidants.

23 METHODS

24 This study present a comprehensive collection of up-to-date systematic reviews and
25 other important publications on the complex association of OS, BPH and PCa. We describe
26 important developments and perspectives based on a systematic analysis of the most cited
27 research in this field.

28 We searched in the electronic databases PUBMED, Lilacs, Scientific Electronic
29 Library Online (SCIELO), and Science Direct, in English, published up to January 2019
30 using the key words "prostate cancer", "benign prostatic hyperplasia", "oxidative stress",
31 "reactive oxygen species", "free radical", "lipid peroxidation", "antioxidants".

32 Inclusion criteria were original articles, human studies, studies with experimental
33 design (clinical assays, randomized or not) or observational (case-control and cohort studies),

whereas exclusion criteria were studies in vitro studies or in animal models. The list of references to the selected articles was also investigated.

LITERATURE REVIEW

Redox State Change in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia

In relation to BPH, several studies have demonstrated their relationship with redox imbalance. Excess formation of reactive oxygen species (ROS) can lead to cell membrane damage through lipid peroxidation. ROS attack the polyunsaturated fatty acids of the membrane phospholipids, leading to loss of selectivity of ionic and molecular changes, release of organelles enzymes and cytotoxic derivatives, such as malondialdehyde (MDA). The MDA is the most studied lipid peroxidation product, which dosage can be performed by its reaction with the thiobarbituric acid (TBA), in a non-specific process as other substances also react with that acid, or it can be measured by chromatography, a more specific methodology. Elevated levels of MDA have been found in patients with BPH (KULLISAAR et al., 2012; VITAL et al., 2016).

In 2003, Merendino and colleagues found increased plasma MDA levels in 22 BPH patients compared to 22 healthy subjects, and a positive correlation between total Prostate Specific Antigens (PSA) and MDA levels. These data show increased levels of MDA in BPH patients confirming the involvement of oxidative stress in patients with BPH.

A similar result was found by Aryal et al. (2007), who evaluated oxidative stress in 48 patients with BPH and 46 healthy subjects (controls). MDA levels, determined by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) methodology, were increased in patients with BPH, while there was a reduction in vitamins C and E levels when compared to controls, suggesting a redox imbalance.

Vital et al. (2016) using prostatic tissue evaluated the levels of 8-hydroxy-deoxyguanine (8-OHdG), an oxidative marker of deoxyribonucleic acid (DNA) damage in the hyperplastic transition zone compared to normal prostate samples. These tissues were removed from of prostatic tissue of 32 patients with BPH. Tissues from the hyperplastic transition zone contained higher levels of 8-OHdG than tissues from the normal transition zone. In addition, 8-OHdG levels were correlated with prostate weight. The authors concluded that oxidative stress and oxidative DNA damage are important in the pathogenesis of BPH.

In another 2016 study, Zabaïou et al. evaluated the redox status directly from prostatic tissues of patients with BPH. For that, they evaluated 24 patients between 58 and 85 years submitted to prostatic adenomectomy. According to the mass of the BPH estimated by ultrasound, the patients were divided into four groups: group 1 (6 subjects) with prostates of estimated weight of 20-40 g; group 2 (6 individuals) with prostates of 41-60 g; group 3 (6 subjects), prostates 61-80 g; and group 4 (6 individuals), prostates weighing more than 100 g. Patients in the first group, who had the lowest BPH mass, were recruited as controls. This study found that larger prostates had higher MDA levels and, in smaller prostates, lower levels of antioxidants and glutathione (GSH). In addition, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes also decreased in groups 3 and 4. The findings of that study suggest that the development of BPH is accompanied by increased oxidative stress. Table 1 shows the main findings of the studies described above.

In summary, four studies analyzed the change in redox state in patients with BPH, three showed an increase in lipid peroxidation as assessed by plasma MDA (MERENDINO et al., 2003; ARYAL et al., 2007; ZABAIYOU et al., 2016) and one in tissue levels of 8-OHdG (VITAL et al., 2016). Additionally, two of these studies showed a decrease in antioxidant defenses, such as in vitamins C and E (ARYAL et al., 2007), and also in GSH, SOD and CAT (ZABAIYOU et al., 2016).

Redox State Change in Patients with Prostate Cancer

Several studies have demonstrated the relationship of oxidative/nitrosative stress in the etiology of breast (NOURAZARIAN et al., 2014), intestine (BATTACHARYYA et al., 2014) and PCa (ROUMEGUERE et al., 2017).

During the last decade, experimental (SHIOTA et al., 2012) and clinical studies (PANDE et al., 2013) have implicated oxidative stress in the development and progression of PCa. Increased ROS can lead to oncogenic transformation and modulate the cellular response of neoplastic cells leading to cell proliferation, selective clonal expansion and metastasis (KUMAR et al., 2008, HOLL et al., 2016).

Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with PCa were evaluated by Surapaneni and coworkers in 2006. In this study, 30 patients with PCa and 30 healthy subjects with mean age of 60 years were evaluated. It was observed that patients with PCa had reduced levels of GSH and increased levels of MDA when compared to the control group. SOD activity was also increased in patients with PCa when compared to the control group. The

authors suggest that oxidative stress would be involved in PCa. In addition, they suggest that the increase in SOD activity could be a compensatory regulation in response to oxidative damage.

In 2009, Akinloye, Adaramoye and Karim evaluated the levels of antioxidants and lipid peroxidation in relation to PSA levels in patients with PCa in 3 groups according to severity; group 1 (low grade) with a PSA level of 5-10 ng/mL (n = 33), group 2 (medium grade) with PSA of 11-20 ng/mL (n = 45) and group 3 (high grade) with PSA > 20 ng/mL (n = 42). The control group consisted of 50 healthy individuals with PSA <3.0 ng/mL. Serum lipid peroxidation was elevated in patients with PSA > 11 ng/mL, the lipid peroxidation levels were 107% higher in subjects with PSA between 11-20 ng/mL, and 98% in patients with PSA ≥20 ng/mL. SOD and CAT activities were lower in all PCa patients. Subjects with PSA levels of 11-20 ng/mL and PSA > 20 ng/mL had lower levels of uric acid and GSH; there was a reduction in plasma levels of vitamins C and E. The levels of vitamins C and E decreased between 27% and 77% in subjects with PSA levels > 20 ng/mL and between 25% and 47% in subjects with PSA levels of 11-20 ng/mL. The results confirmed antioxidant reduction in patients with PCa and an inverse relationship between antioxidants and PSA values in this group.

Battisti et al. (2011) evaluated 55 patients diagnosed with PCa based on histological evaluation and 55 healthy men with similar ages and social conditions. For purposes of analysis, patients with PCa were subdivided into different groups for each of the four distinct parameters: presence or absence of metastases, standard treatment (without previous treatment, goserelin acetate, or cyproterone acetate) and Gleason score. CAT activity and vitamin C and vitamin E levels were reduced in CaP patients when compared to controls. On the other hand, the levels of MDA, PCB and SOD and GSH activity were higher in the group with CaP than in the control group. However, when compared to patients with localized disease, SOD levels were increased in patients with localized disease. However, increased levels of GSH were seen in patients with metastatic disease, such as MDA, PCB, CAT, Vitamin C and E did not change between the localized and metastatic disease groups. Regarding treatment, MDA levels were increased in patients who did not receive treatment when compared to controls. CAT activity was reduced in untreated patients when compared to controls. GSH levels were increased in all groups. Vitamin C was reduced in all treated groups when compared to controls and vitamin E was reduced only in untreated patients when compared to controls. When patients were divided according to the Gleason score the MDA

levels were increased in all patients relative to the control. PCB levels were higher in patients with Gleason scores greater than 7, but CAT activity was reduced in this group when compared to the other groups and to control. GSH levels were increased in all groups. On the other hand, vitamin C and vitamin E levels were reduced in all groups in relation to the control group. This study suggests evidence that the level of oxidative stress is altered in patients with PCa and that patients with more aggressive tumor present greater intensity of oxidative stress in relation to less aggressive tumors.

Wozniak et al. (2012) evaluated the markers of oxidative stress in PCa in 60 patients submitted to high-dose brachytherapy (HDR) with external brachytherapy therapy (EBT). Blood samples were collected before treatment, then after 1.5 and 3 months after the end of treatment, and finally approximately two years later. The control group consisted of 30 healthy men. Glutathione Peroxidase activity (GSH-P) in patients with PCa was reduced in all periods (34%, 50%, 30% and 61%, respectively) when compared to that obtained in healthy individuals. After two years of the end of the treatment, the activity of the enzymes studied showed a decreasing trend compared to the activity before the therapy. The concentration of TBARS in erythrocytes in patients with PCa was higher at all times, except after two years of treatment, when erythrocyte TBARS levels were reduced and became similar to that observed in the control group, suggesting a trend towards normalization of the processes of oxidation-reduction systemically. However, the plasma concentration of TBARS did not decrease showing that a complete restoration of the oxidative-antioxidant balance was not obtained. Thus, the authors concluded that the course of CAP occurs imbalance of the oxidative-antioxidant processes and that a radiation therapy does not alter the levels of oxidative stress, furthermore they, concluded that two years may not be time long enough for the oxidation-reduction processes to reach levels similar to controls.

The relationship between oxidative stress and cancer aggressiveness was evaluated by Pande and collaborators in 2013. This study analyzed 40 patients with PCa and 40 healthy individuals age 64 to 68 years and measured levels of 8-OHdG, PCB, MDA, serum total antioxidant capacity assessed by the methodology of Total Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), proliferation index cell and the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). They found that, comparing values between patients with PCa and the control group, serum levels of 8-OHdG, PCB, MDA, cell proliferation index, VEGF levels were higher and TEAC was lower in patients with PCa. Similar finding was also found in relation to PSA levels, staging and degree of cellular indifferentiation (measured by the Gleason score) among cancer patients. The results showed an association between higher levels of PSA, staging and

Gleason score with higher values of 8-OHdG, PCB, MDA, cell proliferation index and VEGF, and lower values of TEAC. These findings show that redox imbalance, worsening of cell proliferation index, and increase in VEGF are present in PCa and are related to disease progression.

The knowledge of the association of oxidative activity with tumor evolution could be helpful to indicate methods of treatment. Therefore, authors have sought to understand the mechanism that leads to redox balance in an attempt to control the disease.

Iynem et al. (2004) analyzed the blood of 21 patients with metastatic PCa before and after three months of antiandrogen therapy. These patients were compared with a control group of 20 individuals without PCa. The results showed that erythrocyte GSH levels, GSH-R and GSH-P activities, and plasma vitamin E levels were lower in patients with PCa than in the control group. MDA levels were increased in patients with PCa compared to the control group. However, after three months of initiation of antiandrogen therapy in patients with metastatic PCa, there was a decrease in plasma MDA level and an increase in when compared to baseline. The authors concluded that antiandrogen therapy in metastatic PCa could decrease oxidative stress in these patients.

In a study published in 2004, Miyake et al. evaluated the oxidative DNA damage (by measuring urinary 8-OHdG) in 82 patients with PCa, before and after two months of treatment, and in 33 healthy men. Of these 82 patients, 42 underwent radical prostatectomy and 40 received hormone therapy. The proportion of 8-OHdG in urine in patients with PCa was higher than in the control group. There was a reduction in urinary 8-OHdG levels after 2 months of hormonal treatment. In the 42 patients who were operated on, there was no change in pre-8-OHdG levels and after two months of surgery. These findings have shown that oxidative stress is present in cancer patients and that their suppression could be a strategy to inhibit the progression of PCa.

Ozmen et al. (2006) examined antioxidant vitamins (A, C and E), selenium and MDA and trace metals (iron, nickel, zinc, cobalt and copper) in 21 control patients and 20 patients with PCa. Vitamins A, C and E levels were lower and MDA levels were higher in patients with PCa compared to controls. In addition, levels of selenium and zinc were also lower, and levels of nickel, cobalt, and copper were higher in PCa patients than in controls. Iron levels were not different in patients compared to controls. According to the authors, the administration of vitamins A, C and E, and selenium and zinc could be beneficial in the prevention and treatment of PCa.

The relationship of oxidative markers in pre-carcinogenic evolution was investigated by Barocas et al. (2011). These authors evaluated the F2-isoprostane levels in the urine of 496 patients who underwent prostate biopsy due to suspected cancer. Patients who had PCa and high-grade intraepithelial neoplasia (pre-malignant lesion) had higher urinary F2-isoprostane levels than those obtained in patients without diagnosis of cancer in the biopsy, suggesting that the oxidative process would be present in cases that are evolutionary for malignancy.

Regarding the evolution of cancer, Shiota et al. (2012) investigated if antioxidants could avoid the PCa resistance to castration. These authors completed a prospective study with 31 individuals with PCa that underwent radical prostatectomy. They analyzed the staining with 4-hydroxy-2-nonenal histidine (4-HNE) and the expression of twist-related protein 1 (Twist1), Y-box binding protein-1 (YB-1) and androgen receptor by immunohistochemistry in PCa samples treated with or without androgen deprivation therapy. The results showed that androgen deprivation therapy increased oxidative stress as shown by 4-HNE staining in human PCa tissue. The expression of Twist1 and YB-1 was upregulated by androgen deprivation, resulting in expression of the androgen receptor. In LNCaP and 22Rv1 cells, androgen deprivation increased the intracellular ROS and induced expression of Twist1, YB-1 and androgen, resulting in cell growth in a castration resistant manner. Growth was relieved by N-acetyl-cysteine, an electrophile that supports the production of glutathione. N-acetyl-cysteine (NAC) also decreased LNCaP and 22Rv1 tumor growth in castrated and uncastrated mice. The authors concluded that androgen deprivation therapy induced oxidative stress in *in vitro* and human PCa. Antioxidant therapy with NAC seemed to be a promising therapeutic modality for PCa.

The analysis of isoprostane in the urine of patients with PCa was also performed by Brys et al. (2012). This study analyzed urinary 8-isoPGF2 α levels in 30 PCa patients who were compared to a control group of 233 healthy subjects. The urinary sample of 8-isoPGF2 α was collected before prostate biopsy. Patients with PCa were divided into 3 groups by the Gleason score (Group I: Gleason 2 to 4, Group II: Gleason 5 to 7, Group III: Gleason 8 to 10) and by staging of the disease after radical prostatectomy (T1- 2N0M0; T3-4N0M0 and TxN1 or M1). Higher levels of 8-isoPGF2 α were found in cancer patients compared to the control group. Regarding the levels of 8-isoPGF2 α , the Gleason score and staging of the disease, the authors found statistically higher levels of urinary 8-isoPGF2 α in the Gleason score and in the more advanced stages when compared to Gleason score and less advanced staging. Thus, the authors have suggested that oxidative stress plays a role in the pathophysiology of PCa.

Amar et al. (2018) evaluated the activities of the antioxidant enzymes SOD, GSH and CAT, and also of MDA in 25 serum samples from patients diagnosed with PCa and compared the results obtained with those of a control group composed of 25 healthy individuals. The activity of SOD, GSH and CAT in the PCa was lower than in the healthy control group. The serum levels of MDA were higher when compared to the control group. The data suggest that the cause of the development of PCa may be the result of an imbalance between antioxidants and oxidative stress. Therefore, SOD, CAT, GSH and MDA may play an important role in the etiopathogenesis of PCa. Table 2 shows the main findings of the studies described above.

In summary, redox state in patients with PCa was evaluated by fourteen studies; eleven studies showed an increase in lipid peroxidation evaluated by MDA (IYNEM et al., 2004; OZMEN et al., 2006; SURAPANENI et al., 2006; BATTISTI et al., 2011; WOZNIAK et al., 2012; PANDE et al., 2013; AMAR et al., 2018), lipid peroxidation (AKINLOYE; ADARAMOYE; KARIM, 2009), F2-isoprostane urinary levels (BAROCAS et al., 2011), 8-isoPGF2 α (BRYN et al., 2012), and -HNE (SHIOTA et al., 2012). Two studies have reported increased protein oxidation assessed by PCB (BATTISTI et al., 2011; PANDE et al., 2013). Two other studies showed DNA damage shown by increased 8-OHdG (PANDE et al., 2013; MIYAKE et al., 2004). Mean time, eight studies have described reducing antioxidant defenses shown by decreased vitamin E (IYNEM et al., 2004; OZMEN et al., 2006; AKINLOYE; ADARAMOYE; KARIM, 2009; BATTISTI et al., 2011), vitamin C (OZMEN et al., 2006; AKINLOYE; ADARAMOYE; KARIM, 2009; BATTISTI et al., 2011), vitamin A, selenium and zinc (OZMEN et al., 2006), TEAC (PANDE et al., 2013), GSH (IYNEM et al., 2004; SURAPANENI et al., 2006; AKINLOYE; ADARAMOYE; KARIM, 2009; AMAR et al., 2018), GSH-P (IYNEM et al., 2004; WOZNIAK et al., 2012), GSH-R (IYNEM et al., 2004), SOD (AKINLOYE; ADARAMOYE; KARIM, 2009; AMAR et al., 2018), CAT (AKINLOYE; ADARAMOYE; KARIM, 2009; BATTISTI et al., 2011; AMAR et al., 2018). However, three studies showed an increase of the antioxidant defenses shown by enhanced SOD (SURAPANENI et al., 2006), and GSH (BATTISTI et al., 2011) levels.

Comparison between the Redox State of Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer

Some studies compared redox status in patients with BPH and patients with PCa (KAYA et al., 2017; SRIVASTAVA; MITTAL, 2005).

Klotz et al. (1998) compared the presence of inducible nitric oxide synthase (iNOS) antibodies by immunohistochemistry in the prostatic tissue of sixteen PCa patients and in ten patients with BPH. The neoplastic tissue presented high iNOS index, while the benign tissue did not. Thus, they demonstrated that iNOS could be used as a marker in immunohistochemistry for PCa. The author suggested that the generation of NO in PCa could cause cytotoxicity as a result of an immune defense mechanism. This would lead to increased blood flow and promotion of angiogenesis mediated by prolonged and excessive production of NO and subsequently leading to neoplastic cell proliferation.

Baltaci et al. (2001) evaluated the incidence of iNOS expression in BPH, low and high grade prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and prostatic carcinoma lesions, and explored the role of iNOS in prostate tumorigenesis in 20 samples from each group. Positive immunoblotting of iNOS was detected in all samples from all patients; iNOS was detected in both basal epithelial cells and secretory cells of the glandular epithelium. High grade PIN and prostate carcinoma samples had more intense iNOS immunoblotting than BPH and low-grade PIN samples. In all samples, smooth muscle cells showed weak or moderate immunoreactivity of iNOS and endothelial cells showed moderate immunostaining. The authors concluded that nitric oxide generated by iNOS may be involved in prostatic tumorigenesis.

The serum levels of MDA, erythrocyte copper, zinc and GSH-P and SOD erythrocyte activity were analyzed in patients with PCa and BPH. The authors analyzed 21 patients diagnosed with PCa according to biopsy, 50 patients with BPH undergoing transurethral resection of the prostate and 50 healthy individuals aged 64 to 66 years. Patients with PCa were clinically divided into two groups by tumor, node, metastasis (TNM) classification: confined organ disease (cT1-2N0M0) and advanced disease ($\geq$ cT3). They were also divided into three groups according to the biopsy: well differentiated (Gleason 2 to 4); moderately (Gleason 5 to 7) and poorly differentiated (Gleason 8 to 10). In cancer patients it was found that MDA levels were increased and zinc levels were decreased in comparison to patients with BPH and controls, whereas the activity of GSH-P and SOD were decreased in relation to the control group. Comparative analysis according to tumor staging demonstrated that MDA levels were increased while zinc levels and SOD activity were decreased in patients with advanced disease compared to those with organ confined disease. Regarding the level of tumor indifferentiation evaluated by Gleason, there was no difference in GSH-P activity. However, SOD activity and zinc levels were lower and MDA levels were higher in the poorly

differentiated tumors compared to well and moderately differentiated tumors. The authors concluded that the activity of SOD and GSH-P and MDA and zinc levels could be appropriate tools for the diagnosis and follow-up of patients with PCa (YILMAZ et al., 2004).

The pro-oxidant/ antioxidant status was seen in 45 patients with PCa, 55 with BPH and 25 control subjects. High levels of MDA and GST activity were observed in patients with PCa and BPH compared to the control group. However, GSH concentration and GSH-P activity were lower in patients with PCa and BPH compared to the control group. The authors suggested that the generation of free radicals, as reflected by increased compensatory GST activity, and oxidative damage demonstrated by increased levels of MDA in patients with PCa and BPH could be used as prognostic markers for these diseases (SRIVASTAVA; MITTAL, 2005).

Aydin et al. (2006) in a longitudinal prospective study in Turkey, evaluated markers of oxidative stress in patients with PCa and BPH. Twenty-five newly diagnosed patients with PCa, 36 patients with BPH, and a control group with 24 healthy subjects were selected. Patients with PCa and BPH had no history of any previous treatment for their diseases. Erythrocyte levels of TBARS, copper, zinc, and SOD, CAT and GSH-P enzyme activity were analyzed from the three groups. This study found concentrations of increased TBARS and decreased GSH-P and SOD activity in patients with PCa compared to BPH and control groups. These results demonstrated that alterations in lipid peroxidation and decrease in the activity of antioxidant enzymes are present in PCa.

This same group of researchers, evaluating patients from Turkey and Macedonia, evaluated the oxidative/nitrosative stress and the activity of the antioxidant enzymes in patients with PCa and BPH. A total of 312 men were selected: 163 subjects from Macedonia (73 patients with PCa, 67 with BPH and 23 control subjects) and 149 subjects from Turkey (34 PCa, 100 BPH and 15 control subjects). A similar pattern of alteration in the parameters related to oxidative/nitrosative stress was found in the two studied groups. PCa patients showed an increase in MDA levels (measured by the TBARS method), NO₂/NO₃ (measured by Griess method) and cGMP, and reduction of GSH-P activity compared to the control group and BPH. This study confirmed an imbalance in the redox state and revealed increased nitrosative stress in patients with PCa (SARAFINOVSKA et al., 2009).

The antioxidant activity, lipid peroxidation and disease stage were studied in 40 localized PCa and 38 metastatic PCa, 20 BPH patients and 14 control subjects. Patients with PCa had higher concentrations of MDA and lower concentrations of antioxidant compounds

(lutein, lycopene and betacarotene). Patients with metastatic PCa compared to patients with localized disease presented higher Gleason score, but lower concentrations of PSA, alpha-tocopherol, retinol, lutein and lycopene. In patients with PCa, PSA was positively correlated with MDA concentrations. In contrast, there was a negative correlation between MDA concentrations with lutein and lycopene. These results indicate that lower concentrations of carotenoids reflect the progression of the disease (ALMUSHATAT et al., 2006).

Goswami et al. (2007) investigated serum levels of sialic acid, a group of carbohydrate present in the terminal part of some acute phase inflammatory proteins. In this study, patients submitted to prostate biopsy due to suspected cancer were evaluated, being 10 with cancer and 10 patients without cancer who were diagnosed with BPH at the biopsy. Ten healthy individuals were categorized as controls. Serum levels of TBARS, PCB levels, serum sialic acid, total proteins and PSA were evaluated. The authors found increased levels of lipid peroxides, PCB and sialic acid in patients with PCa in relation to patients in the control group and also in relation to patients with BPH. They concluded that oxidative damage is greater in patients with PCa and that sialic acid levels could be a marker to differentiate BPH from PCa.

In order to verify the antioxidant enzymatic system of patients with PCa, BPH, and control healthy subjects, Kotrikadze et al. (2008) used 15 patients for each group aged 60-75 years. The data showed an increase in MDA in the BPH and PCa groups, with a more intense increase in PCA when compared to the control group. SOD activity was increased in BPH and decreased in PCa, while CAT activity remained unchanged in BPH and was slightly decreased in PCa. Ceruloplasmin was increased in BPH and PCa, but especially in PCa, as well as GSH and glutathione reductase (GSH-Red). GSH-P was increased in BPH and reduced in PCa. The authors concluded that there was a strong reduction of antioxidant enzymes in PCa.

Pace et al. (2010) analyzed oxidative markers in blood samples from 15 patients with BPH, PCa, and control individuals. Total plasma peroxide levels (chromatographic method), TEAC and SOD activity were measured. TEAC was lower and plasma peroxide levels were higher in patients with PCa and BPH than in the control group. An inverse correlation was found between peroxides and TEAC in patients with BPH ($r = -0.821$; $p = 0.023$). In contrast, there was a direct correlation between plasma peroxide levels and TEAC in patients with PCa ($r = 0.627$; $p = 0.039$). According to the authors, in patients with BPH, the antioxidant activity is able to neutralize the increase of free radicals (in this case, the peroxide levels) at the expense of the depletion of the TEAC levels. In contrast, in patients

with PCa, antioxidant defenses are able to neutralize the oxidative damage (as seen by lower peroxide levels) in the early stages of carcinogenesis, leading to decreased levels of TEAC. These data confirm the redox imbalance in patients affected by BPH and PCa and suggest the potential involvement of oxidative stress in the pathogenesis of these diseases.

Kosova et al. (2014) determined the serum levels of MDA, 8-OHdG and caspase-3 (cell apoptosis signaling) in 20 patients with BPH and 20 patients with PCa. The levels of MDA and 8-OHdG were increased in the PCa group when compared to the BPH group. However, the levels of caspase-3 were lower in patients with PCa compared with BPH. Loss of caspase-3 expression would lead to a death-cell proliferation imbalance and, consequently, a role in the process of prostatic cell carcinogenesis in a pre-malignant stage. The authors suggested that these markers would be important in the diagnosis and monitoring of cancer treatment.

A study published by Kaya et al. (2017) compared parameters related to oxidative stress in 128 participants with mean age between 45 and 68 years, with 30 patients with PCa, 41 with BPH, 26 patients with prostatitis, and 30 healthy controls). They found increased MDA in patients with PCa compared to the other groups. It was also observed a higher CAT activity in PCa patients when compared to BPH and the control group. These data showed an increase in oxidative stress in patients with PCa when compared to patients with BPH and control group. Therefore, the pro-oxidant/ antioxidant imbalance seems to lead to an increase in oxidative damage playing an important role in the pathophysiology of BPH and PCa.

Another study by Kucukdurmaz et al. (2017) analyzed serum prolidase activity (SPA), an enzyme involved in the renewal and collagen degradation and in cell growth as well as being a marker of oxidative stress, in 51 patients with PCa and 30 with BPH. Median levels of MDA and SOD were increased, although not significantly, in patients with PCa. SPA values were similar in patients with BPH and PCA. The SPA did not correlate with age and PSA, MDA or SOD levels in both groups. The results of this study revealed that the activity of SPA is similar in cases of BPH and PCa and is not correlated with MDA, SOD or PSA levels.

Ohtake et al. (2018) evaluated oxidative stress by expression levels of 8-OHdG in the prostatic tissue of 10 cases of PCa and 70 cases of BPH. The results showed that all cases expressed 8-OHdG. The expression levels of 8-OHdG in PCa (30.0% moderate and 70.0% strong) were higher than those in BPH (71.4% moderate and 28.6% strong; ($p < 0.01$). The data

suggest that 8-OHdG expression may play an important role in the development of PCa. Table 3 shows the main findings of the studies described above.

In summary, the comparison between the redox state of BPH and PCa was evaluated by 10 studies; nine studies showed that MDA levels were increased in patients with PCa and BPH, but with more elevation in PCa (YILMAZ et al., 2004; SRIVASTAVA; MITTAL, 2005; AYDIN et al., 2006; GOSWAMI et al., 2007; KOTRIKADZE et al., 2008; SARAFINOVSKA et al., 2009; PACE et al., 2010; KOSOVA et al., 2014; KAYA et al., 2017), whereas another study also found increased levels in MDA levels in PCa compared to BPH, but the result was not significant (KUCUKDURMAZ et al., 2017). Lipid peroxidation was also evaluated in two studies by 8-OHdG, whose expression was higher in PCa group compared to the BPH group (KOSOVA et al., 2014; OHTAKE et al., 2018). Increased levels of GST activity were observed in patients with PCa and BPH compared to the control group (SRIVASTAVA; MITTAL, 2005). Regarding protein oxidation, PCB increased in PCa compared to BPH and controls (GOSWAMI et al., 2007). In relation to nitrosative stress, three studies were performed; two verified the presence of more intense iNOS immunostaining in the neoplastic tissue than in the hyperplastic tissue (KLOTZ et al., 1998; BALTAÇI et al., 2001), whereas another study showed an increase in NO₂/NO₃ levels (evaluated by the Griess method) and cGMP in PCa patients in relation to BPH (SARAFINOVSKA et al., 2009).

Antioxidants and Prostate Cancer

Many dietary compounds may play a role in the development and progression of prostate-related pathologies. Thus, the relationship between ingestion of antioxidant nutrients and the decrease in free radical formation has been studied. Several studies investigated the effect of use of antioxidants in the diet to verify attenuation in the incidence or progression of PCa.

Use of antioxidants in the diet showed some decrease in the overall risk of cancer. Most studies on the intake of antioxidants in PCa used vitamins E or C, selenium, beta carotene or lycopene, but they produced inconsistent results with these individual antioxidants (VIUDA-MARTOS et al., 2014).

Use alpha-tocopherol in the diet increased the risk of PCa among healthy men (KLEIN et al., 2011). However, another study showed a 32% reduction in the incidence of PCa and 41% lower mortality among subjects who received alpha-tocopherol compared with those

who did not receive. (HEINONEN et al., 1998; WEINSTEIN et al., 2007). Meanwhile, it seems that gamma-tocopherol confers protection against oxidative stress and contributes to the prevention of prostatic tumorigenesis (BIDOLI et al., 2009). Finally, other studies reported that the use of vitamin E in the diet had no effect on CaP (MCCANN et al., 2005; GAZIANO et al., 2009; WRIGHT et al., 2007). In relation to vitamin C, there was a reduction in the risk of PCa associated with vitamin C intake (MCCANN et al., 2005); however, in another this association was not found (GAZIANO et al., 2009).

Clark et al. (1996) showed that patients who received selenium had a reduced incidence of PCa. The follow-up of this study showed that men who received selenium had a lower incidence of localized and advanced PCa (CLARK et al., 1998). Thereafter, other studies have also shown that selenium may play a protective role against PCa (PETERS et al., 2008). However, this has not been reported by other research that found no effect of selenium intake on the incidence and / or risk of PCa. (CLARK et al., 1998; KLEIN et al., 2011; MARSHALL et al., 2011; ALGOTAR et al., 2013; MORGIA et al., 2017). Additionally, Lippman et al. (2009) found neither vitamin E nor selenium, alone or in combination, prevented CaP. In addition, prolonged intake of vitamin E and selenium was not associated with the overall risk of CaP (PETERS et al., 2008).

Regarding zinc, no effect on the incidence of PCa was reported. But there was reduced risk of advanced and metastatic PCa. The authors concluded that long-term zinc consumption was associated with reduced risk of advanced disease (GONZALEZ et al., 2009).

The most studied carotenoids in relation to PCa are lycopene and beta carotene. Lycopene is considered the most effective carotenoid antioxidant due to its relatively high concentration in the prostate (CLINTON et al., 1996).

Dietary intake of lycopene was associated with a reduction in the risk of lethal PCa and with a lower degree of tumor angiogenesis (ZU et al., 2014); other studies reported that lycopene intake was linked to the reduction of the risk of PCa (MCCANN et al., 2005; VAN HOANG et al., 2017). Similarly, Kirsh and colleagues (2006b) showed that increasing lycopene intake was correlated with a decreased risk of PCa, but only in men with a family history of the disease. The mechanism by which frequent ingestion of lycopene may reduce the risk of PCa is likely by modulating the expression of genes associated with the growth and survival of neoplastic cells (RAFI et al., 2013). However, other studies found no association of lycopene with the risk of PCa (SCHUURMAN et al., 2002; MORGIA et al., 2017).

In some studies, betacarotene has been linked to the risk of PCa. Among patients who received betacarotene, the incidence of PCa was 23% higher and mortality was 15% higher compared to those who did not receive (HEINONEN et al., 1998). In addition, high serum beta-carotene concentrations were associated with an increased risk of aggressive PCa (PETERS et al., 2008). However, opposite findings were reported by other studies that have found a protective effect of betacarotene in PCa (MCCANN et al., 2005; KIRSH et al., 2006a), while other studies found no effect on the incidence or risk of dietary intake of betacarotene PCa (SCHUURMAN, 2002; VAN-HOANG et al., 2017). In addition, the Continuous Update Project (CUP) report summarized by the Global Fund for Cancer Research (WCRF) concluded that consumption of betacarotene (either through food or supplements) is unlikely to have a substantial effect on the risk of PCa (WCRF, 2014).

Overall, the studies cited above provide inconclusive evidence on the effect of antioxidants on PCa. In addition, forms of PCa screening have changed in the last few decades, which mean that the results of some older studies may not be comparable with more recent results. This and other factors such as study design, number of participants or methodologies employed may explain some of the conflicting results between studies. However, while studies on antioxidants and PCa have demonstrated inconsistent data, there is evidence that some dietary antioxidants may have beneficial effects on the risk of PCa. Whereas, there is no robust evidence of beneficial effects of the different forms of vitamin E, selenium, zinc, vitamin C or betacarotene ingestion on PCa, lycopene intake seems to have a positive behavior.

CONCLUSION

In summary, several studies have demonstrated the presence of oxidative and nitrosative stress in BPH and PCa, both due to the increase in ROS and the deficiency of the antioxidant system. These studies evaluated several markers of oxidative stress demonstrating that most markers are increased in BPH and PCa compared to control groups, and that much of the markers are more increased in PCa than in BPH. The most studied marker to evaluate lipid peroxidation was MDA, while the most analyzed antioxidant enzymes were CAT, SOD and GSH. Increasing evidence indicates that oxidative stress play an important role in the pathogenesis of prostate, but studies are needed to assess whether these parameters could be used to make a differential diagnosis or to associate the prognosis of patients with PCa. In addition, some authors highlight the limitation of the comparison of the oxidative stress levels

of BPH and PCa patients with their controls, since other factors such as obesity, smoking, concomitant metabolic diseases, eating habits, lifestyle, pollution, radiation, among others could influence the redox balance and, consequently, be confounding factors. The use of antioxidants in the diet has yielded controversial results, but lycopene appears to have beneficial effects on PCa risk. More studies are needed to better understand the biology of PCa and how antioxidants could influence the risk of PCa.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. AKINLOYE, O.; ADARAMOYE, O.; KARIM, O. Changes in antioxidant status and lipid peroxidation in Nigerian patients with prostate carcinoma. **Pol Arch Med Wewn**, v.119, n.9, 2009.
2. ALGOTAR, A. M. et al. Phase 3 clinical trial investigating the effect of selenium supplementation in men at high-risk for prostate cancer. **Prostate**, v.73, n.3, p.328-35, 2013.
3. ALMUSHATAT, A. S. K. et al. Vitamin antioxidants, lipid peroxidation and the systemic inflammatory response in patients with prostate cancer. **Int Journal of Cancer**, v.118, n.4, p.1051–1053, 2006.
4. AMAR, S. A. A. et al. Determination of oxidative stress levels and some antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **Aging Male**, v.15, p.1-9, 2018.
5. ARYAL, M. et al. Oxidative stress in patients with benign prostate hyperplasia. **Journal of the Nepal Medical Association**, v.46, n.167, p.103–106, 2007.
6. AYDIN, A. et al. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Clinical Biochemistry**, v.39, n.2, p.176-79, 2006.
7. BALTACI, S. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in benign prostatic hyperplasia, low- and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. **BJU Int**, v.88 p.100–103, 2001.
8. BAROCAS, D. et al. Oxidative stress measured by urine F2-Isoprostane level is associated with prostate cancer. **The Journal of Urology**, v.185, p.2102-07, 2011.
9. BATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiology Review**, v.94, p.329–54, 2014.
10. BATTISTI, V. et al. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: Relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.65, n.7, p.516–24, 2011.
11. BIDOLI, E. et al. Dietary vitamins E and C and prostate cancer risk. **Acta Oncol**, n.6, p.890–4, 2009.
12. BRYIS, M. et al. Relationship of urinary isoprostanes to prostate cancer occurrence. **Molecular Cell Biochemistry**, v.372, p.149–53, 2013.
13. CLARK, L. C. et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. **JAMA**, v.276, n.24, p.1957–63, 1996.
14. CLARK, L. C. et al. Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. **Br J Urol**, v.81, n.5,

p.730–4, 1998.

15. CLINTON, S. K. et al. cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.5, p.823–33, 1996.
16. GAZIANO, J. M, et al. Vitamins E and C in the prevention of prostate and total cancer in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. **JAMA**, v.301, n.1, p.52–62, 2009.
17. GONZALEZ, A.; PETERS, U.; LAMPE, J. W.; WHITE, E. Zinc intake from supplements and diet and prostate cancer. **Nutr Cancer**, v.61, p.206-15, 2009.
18. GOSWAMI, K.; NANDEESHA, H.; KONER, B. C.; NANDAKUMAR, D. N. A comparative study of serum protein-bound sialic acid in benign and malignant prostatic growth: possible role of oxidative stress in sialic acid homeostasis. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v.10, n.4, p.356–59, 2007.
19. HEINONEN, O. P. et al. Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. **J Natl Cancer Inst**, v.90, n.6, p.440–6, 1998.
20. HOLL, M. et al. ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and survival of prostate carcinoma cells. **Molecular Carcinogenesis**, v.55, p.27-39, 2016.
21. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. GLOBOCAN 2018: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018. Lyon, France: IARC; 2018 Nov Available from: <http://globocan.iarc.fr/>
22. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Disponível em <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 05 Nov. 2018.
23. IYNEM, A. H. et al. The effect of prostate cancer and antiandrogenic therapy on lipid peroxidation and antioxidant systems. **International Urology and Nephrology**, v.36, p.57-62, 2004.
24. KAYA, E. et al. Oxidative stress parameters in patients with prostate cancer, benign prostatic hyperplasia and asymptomatic inflammatory prostatitis: A prospective controlled study. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v.26, n.7, p.1095–99, 2017.
25. KIRSH, V. A. et al. Supplemental and dietary vitamin E, beta-carotene, and vitamin C intakes and prostate cancer risk. **J Natl Cancer Inst**, v.98, n.4, p.245–54, 2006a.
26. KIRSH, V. A, et al. A prospective study of lycopene and tomato product intake and risk of prostate cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v.15, n.1, p.92–98, 2006b.
27. KHANDRIKA, L.; KUMAR, B.; KOUL, S.; KOUL, H. K. Role of oxidative stress in prostate cancer. **Cancer Letters**, v.282, n.2, p.125–36, 2009.
28. KLEIN, E. A. et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). **JAMA**, v.306, n.14, p.1549–56, 2011.

- 1 29. KLOTZ, T.; BLOCH, W.; VOLBERG, C.; ENGELMANN, U.; ADDICKS, K. Selective
2 expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. **Cancer**,
3 v.82, n.10, p.1897–903, 1998.
- 4 30. KOSOVA, F.; TEMELTAS, G.; ARI, Z.; LEKILI, M. Possible relations between
5 oxidative damage and apoptosis in benign prostate hyperplasia and prostate cancer
6 patients. **Tumor Biology**, v.35, n.5, p.4295–99, 2014.
- 7 31. KOTRIKADZE, N. et al. Activity and content of antioxidant enzymes in prostate
8 tumors. **Experimental Oncology**, v.30, n.3, p.244–7, 2008.
- 9 32. KUCUKDURMAZ, F. et al. Evaluation of serum prolidase activity and oxidative stress
10 markers in men with BPH and prostate cancer. **BMC Urol**, v.17, p.116-22, 2017.
- 11 33. KULLISAAR, T.; TURK, S.; PUNAB, M.; MANDAR, R. Oxidative stress - cause or
12 consequence of male genital tract disorders? **The Prostate**, v.72, p.977-83, 2012.
- 13 34. KUMAR, B.; KOUL, S.; KHANDRIKA, L.; MEACHAM, R. B.; KOUL, H. K.
14 Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive
15 phenotype. **Cancer Research**, v.68, n.6, p.1777-85, 2008.
- 16 35. LIPPMAN, S. M.; KLEIN, E. A. GOODMAN PJ, et al. Effect of selenium and vitamin
17 E on risk of prostate cancer and other cancers: the selenium and vitamin E cancer
18 prevention trial (SELECT). **JAMA**, v.301, p.39-51, 2009.
- 19 36. MARSHALL, J. R. et al. Phase III Trial of Selenium to Prevent Prostate Cancer in Men
20 with High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia: SWOG S9917. **Cancer Prev Res**,
21 v.4, n.11, p.1761-9, 2011.
- 22 37. MCCANN, S. E. et al. Intakes of selected nutrients, foods, and phytochemicals and
23 prostate cancer risk in western New York. **Nutr Cancer**, v.53, n.1, p.33–41, 2005.
- 24 38. MERENDINO, R. A. et al. Malondialdehyde in benign prostate hypertrophy: a useful
25 marker? **Mediators of Inflammation**, v.12, n.2, p.127-28, 2003.
- 26 39. MINCIULLO, P. L.; INFERRERA, A.; NAVARRA, M.; CALAPAI, G.; GANGEMI, S.
27 Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia: A systematic review. **Urologia**
28 **Internationalis**, v.94, n.3, p.249–54, 2015.
- 29 40. MIYAKE, H.; HARA, I.; KAMIDONO, S.; ETO, H. Oxidative DNA damage in
30 patients with prostate cancer and its response to treatment. **The Journal of Urology**,
31 v.171, p.1533–36, 2004.
- 32 41. MORGIA, G. et al. Association between selenium and lycopene supplementation and
33 incidence of prostate cancer: Results from the post-hoc analysis of the procomb trial.
34 **Phytomedicine**, v.34, p.1–5, 2017.
- 35 42. NOURAZARIAN, A. R.; KANGARI, P.; SALMANINEJAD, A. Roles of oxidative
36 stress in the development and progression of breast cancer. **Asian Pacific Journal of**
37 **Cancer Prevention**, v.15, p.4745-51, 2014.
- 38 43. OHTAKE, S. et al. Oxidative stress marker 8-hydroxyguanosine is more highly

expressed in prostate cancer than in benign prostatic hyperplasia. **Urologia Internationalis**, v.85, n.3, p.328–33, 2018.

44. OZMEN, H.; ERULAS, F. A.; KARATAS, F.; CUKUROVALI, A.; YALCIN, O. Comparison of the concentration of trace metals (Ni, Zn, Co, Cu and Se), Fe, vitamins A, C and E, and lipid peroxidation in patients with prostate cancer. **Clin Chem Lab Med**, v.44, p.175–179, 2006.

45. PACE, G.; MASSIMO, C. D.; AMICIS, D. D. CORBACELLI, M. G. T. Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Urologia Internationalis**, v.85, no3, p.328– 33, 2010.

46. PANDE, D. et al. Simultaneous progression of oxidative stress, angiogenesis, and cell proliferation in prostate carcinoma. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v.31, n.8, p.1561–66, 2013.

47. PETERS, U.; TAKATA, Y. Selenium and the Prevention of Prostate and Colorectal Cancer . **Mol Nutr Food Res**, v.52, n.11, p.1261-72, 2008.

48. RAFI, M. M.; KANAKASABAI, S.; REYES, M. D.; BRIGHT, J. J. Lycopene modulates growth and survival associated genes in prostate cancer. **J Nutr Biochem**, v.24, p.1724–34, 2013.

49. ROUMEGUERE, T. et al. Oxidative stress and prostatic diseases (Review). **Molecular and Clinical Oncology**, v.7, p.723-28, 2017.

50. SARAFINOVSKA, Z. A. et al. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **Clinical Biochemistry**, v.42, n.12, p.1228–35, 2009.

51. SHIOTA, M. et al. Antioxidant therapy alleviates oxidative stress by androgen deprivation and prevents conversion from androgen dependent to castration resistant prostate cancer. **The Journal of Urology**, v.187, p.707-14, 2012.

52. SCHUURMAN, A. G. et al. A prospective cohort study on intake of retinol, vitamins C and E, and carotenoids and prostate cancer risk (Netherlands). **Cancer Causes Control**, v.13, n.6, p.573–82, 2002.

53. SRIVASTAVA, D. S. L.; MITTAL, R. D. Free radical injury and antioxidant status in patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.20, n.2, p.162–5, 2005.

54. SURAPANENI, K. M.; VENKATA, G. R. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with carcinoma of prostate. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.50, n.4, p.350–4, 2006.

55. VAN HOANG, D.; NGOC, M. P.; ANDY, H. L.; DUONG, N. T.; COLIN, W. Dietary Carotenoid Intakes and Prostate Cancer Risk: A Case-Control Study from Vietnam. **Binns Nutrientes**, v.10, n.1, p.1-11, 2018.

56. VITAL, P.; CASTRO, P.; ITTMANN, M. Oxidative stress promotes benign prostatic hyperplasia. **The Prostate**, v.76, n.1, p.58–67, 2016.

57. VIUDA-MARTOS, M. et al. Tomato and tomato byproducts. Human health benefits of lycopene and its application to meat products: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.54, p.032–49, 2014.
58. WEINSTEIN, S. J. et al. Serum and dietary vitamin E in relation to prostate cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v.16, n.6, p.1253–9, 2007.
59. WCRF - World Cancer Report 2014. World Health Organization. 2014. pp. Chapter 5.11. ISBN 9283204298.
60. WOZNIAK, A. et al. Oxidative stress markers in prostate cancer patients after HDR brachytherapy combined with external beam radiation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2012, p.1–5, 2012.
61. WRIGHT, M. E. et al. Supplemental and dietary vitamin E intakes and risk of prostate cancer in a large prospective study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.16, n.6, p.1128–35, 2007.
62. XIA, S. J.; XU, X. X.; TENG, J. B.; XU, C. X.; TANG, X. D. Characteristic pattern of human prostatic growth with age. **Asian Journal of Andrology**, v.4, p.269–71, 2002.
63. YILMAZ, M. et al. Antioxidant system activation in prostate cancer. **Biological Trace Element Research**, v.98, n.1, p.13–19, 2004.
64. ZABAIU, N.; MABED, D.; LOBACCARO, J.M.; LAHOUEL, M. Oxidative stress in benign prostate hyperplasia. **Andrologia**, v.48, n.1, p.69–73, 2016.
65. ZU, K. et al. Dietary lycopene, angiogenesis, and PCa: a prospective study in the prostate-specific antigen era. **J Natl Cancer Inst**, v.106, n.2, 2014.

Table 1. Redox State in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia (BPH)

Study design	Sample size	Nitro-oxidative markers	Results and conclusion	Ref.
Case-control	22 BPH 22 Controls	Plasma MDA Serum PSA	• Increase of MDA levels in BPH patients and a positive correlation between PSA and MDA levels. • Levels of MDA in patients with BPH confirming the involvement of oxidative stress in patients with BPH	38
Case-control	48 BPH 46 Controls	Plasma MDA, and Vitamins C and E	• Increased MDA levels and vitamins E and C decreased in BPH, and inverse correlation of plasma MDA with vitamins E and C in BPH patients. • Redox imbalance present in this disease.	5
Case-control	32 BPH tissues 32 normal transition zone	8-OHdG levels in prostate tissue	• BPH tissues contained higher levels of 8-OHdG than control transition zone tissues and were also correlated with prostate weight. • Oxidative stress and oxidative DNA damage are important in the pathogenesis of BPH.	56
Case-control	Group 1 control (6); prostate 20–40 g; Group 2 (6); prostate 41–60 g; Group 3 (6); prostate 61–80 g, Group 4 (6); prostate >100 g)	MDA, GSH, GST activity in tissue SOD, CAT and GSH-P activity in plasma	• Increased MDA levels and decreased levels of GSH, SOD and CAT according to the enlargement of the prostate. • The development of BPH is accompanied by increased oxidative stress.	64

BPH: Benign Prostatic Hyperplasia. MDA: malondialdehyde. PSA: total Prostate-Specific Antigens. 8-OHdG: 8-hydroxy-deoxyguanine. GSH: Glutathione. GST: Glutathione S Transferase. GSH-P: glutathione peroxidase. SOD: *superoxide dismutase*. CAT: catalase.

Table 2. Redox State in Patients with Prostate Cancer (PCa)

Study design	Sample size	Nitro-oxidative markers	Results and conclusion	Ref.
Prospective case-control	82 patients with PCa before and after 2 months of treatment: 42 radical prostatectomy 40 Hormonal therapy.	Urinary 8-OHdG	- Increased levels of 8-OHdG in patients with PCa and levels lower than 8-OHdG in patients with PCa after hormone therapy. - Oxidative stress may be involved in an early event in the development of PCa and that androgen suppression is able to decrease oxidative stress.	40
Prospective case-control	21 metastatic PCa before and after three months of antiandrogen therapy. 20 Controls	MDA and Vitamin E in plasma GSH, GST, GSH-P and GSH-Red in erythrocyte	- Lower levels of GSH, GSH-Red and GPx and vitamin E and increased levels of MDA in patients with PCa before therapy. - Decrease in MDA level and increase in GST in patients with PCa after therapy. - Antiandrogen therapy increased the GST, in addition to promoting the decrease of lipid peroxidation.	23
Case-control	30 PCa 30 Controls	GSH, MDA, and SOD in Erythrocytes GST in plasma	- Lower levels of GSH and higher levels of MDA and SOD in patients with PCa. - Oxidative stress may be involved in PCa, and that increased SOD enzyme activity could be a compensatory regulation in response to oxidative damage.	54
Case-control	20 PCa 21 Controls	Vitamins A, C, and E, MDA, and trace element (Fe, Ni, Zn, Co, Se, and Cu) in whole blood	- Lower levels of vitamins A, C, E, selenium and zinc and increased levels of MDA, nickel, cobalt and copper in patients with PCa. - Iron levels were not different did not differ between groups. - The administration of vitamins A, C and E and selenium and zinc could be beneficial in the prevention and treatment of PCa.	44
Case-control	PCa to 3 groups; group 1 (low grade) with a PSA level of 5–10 ng/ml (n = 33) group 2 (medium grade) with PSA of 11–20 ng/ml (n = 45) group 3 (high grade) with PSA >20 ng/ml (n = 42) 50 healthy subjects with PSA <3.0 ng/ml	PSA and MDA in serum SOD, CAT and GSH in whole blood Vitamins C and E Plasma	- Increased levels of MDA in patients with PCa according to increases in PSA levels. - Lower levels of CAT were lower in all patients with PCa, lower levels of SOD, GSH and vitamin C in patients with medium and high grade PSA. - Vitamin E levels remained unchanged. - The depletion of antioxidants in patients with PCa and an inverse relationship between the values of the antioxidants evaluated and the levels of PSA according to the study groups.	1
Case-control	55 PCa subdivided: treatment, Gleason and bone metastasis 55 Controls	MDA/TBARS in plasma Carbonylation proteins in serum CAT and SOD Activities in Erythrocytes Non-protein thiols in plasma	- The activity of CAT and vitamin C and vitamin E levels were reduced in patients with PCa. The levels of MDA, PCB and SOD and GSH activity were higher in the PCa group. - Metastasis: levels of SOD were increased in patients with localized CaP, GSH levels were increased in patients with metastatic PCa, whereas MDA, PCB, CAT, Vitamin C and E levels did not change between groups.	10

		and erythrocytes Vitamins C and E in serum	• Treatment: MDA levels were increased and CAT activity was reduced in untreated patients. GSH levels were increased in all groups, vitamin C was reduced in all treated groups and vitamin E was reduced only in untreated patients. • Gleason score: MDA levels were increased in all PCa patients. Carbonylation proteins levels were higher and CAT activity was reduced in patients with Gleason scores greater than GSH levels were increased in all groups. Levels of vitamin C and vitamin E were reduced in all groups. • Level of oxidative stress is altered in patients with PCa and that patients with more aggressive tumors have higher oxidative stress intensity over less aggressive tumors.	
Case-control	200 PCa 40 patients with high grade prostatic intraepithelial neoplasia, 160 Controls	F2-isoprostanes in urine	• Increased levels of F2-isoprostane in patients with PCa and high-grade intraepithelial neoplasia • Oxidative stress may play a role in the initiation and/or progression of PCa.	8
Prospective Case-control	60 patients subjected to HDR and EBRT 30 Controls	CAT, SOD and GSH-P activities in Erythrocytes MDA/TBARS in plasma	• The GSH-P activity in the patients was lower than in healthy individuals in all periods, but no significant differences were found in SOD and CAT. • Blood plasma TBARS concentration was higher than in the controls at all periods, while erythrocyte TBARS decreased after 2 years to control levels. • The course of PCa, imbalance of oxidant-antioxidant processes occurs. The therapy did not alter the levels of oxidative stress markers, which may prove its applicability. Two years is too short a period to restore the oxidant-antioxidant balance.	60
Case-control	31 patients who underwent radical prostatectomy with or without ADT as neoadjuvant	4-HNE, Twist1, YB-1 and AR in tissue LNCaP, 22Rv1 and NAC in cultured cells	• Androgen deprivation therapy increased oxidative stress, as shown by 4-HNE staining in human PCa tissue. • Twist1 and YB-1 expression was up-regulated by androgen deprivation, resulting in androgen receptor over expression. • In LNCaP and 22Rv1 cells, androgen deprivation increased intracellular reactive oxygen species and evoked Twist1, YB-1 and androgen receptor over expression, resulting in cell growth in a castration resistant manner. • N-acetyl-cysteine decreased LNCaP and 22Rv1 tumor growth in castrated and non-castrated mice. • Androgen deprivation therapy induced oxidative stress in vitro and human PCa. Antioxidant therapy using N-acetyl-cysteine appears to be a promising therapeutic modality for PCa.	51

Continuation Table 2. Redox State in Patients with Prostate Cancer (PCa)

64

Case-control	304 PCa 233 Controls	8-isoPGF2 α in urine Serum PSA	• Increased the level of isoprostanes and antioxidantns in patients with PCa. • A positive association was found between PCa risk and urinary isoprostane levels. • Reactive oxygen species induce peroxidation of unsaturated fatty acid in patients with PCa, and the level of isoprostanes may be used as a non-invasive marker for determination of oxidative stress.	12
Case-control	40 PCa 40 Controls	8-OHdG, protein carbonyls, MDA and TEAC in serum Quantitation of VEGF levels Cell proliferation assay	• The levels of oxidative stress, VEGF and cell proliferation markers were higher with decreased levels of antioxidant activity in patients with PCa. • Oxidative stress, angiogenesis and cell proliferation progressively increase with increasing staging and disease progression.	46
Case-control	25 PCa 25 Controls	SOD, GSH, CAT and MDA in serum	• SOD, GSH, and CAT activity was lower and MDA levels were higher in patients with PCa. • The development of PCa may be related to an imbalance between antioxidants and oxidative stress. Thus, SOD, CAT, GSH and MDA may play an important role in the etiopathogenesis of PCa.	4

PSA total Prostate-Specific Antigens, ADT androgen deprivation therapy, HDR high-dose brachytherapy, EBRT external beam radiotherapy, 8-OHdG 8-hydroxy-deoxyguanine, 8-isoPGF2 α 8-iso prostaglandin F2-alpha, 4-HNE 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct, MDA malondialdehyde, GSH Glutathione, GST Glutathione S Transferase, GSH-P glutathione peroxidase, GSH-red Glutathione reductase, SOD *superoxide dismutase*, CAT catalase, TEAC Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TBARS thiobarbituric acid reactive substances, LPO lipid peroxidation, UA uric acid, VEGF Vascular Endothelial Growth Factor, AR androgen receptor, NAC N-acetyl-cysteine, YB-1 Y-box binding protein-1, Twist1 twist-related protein 1.

Table 3. Comparison between the Redox State of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) and Prostate Cancer (PCa)

Study design	Sample size	Nitro-oxidative markers	Results and conclusion	Ref.
Case-control	16 PCa 10 BPH	iNOS in tissue	• Positive iNOS immunoblotting was detected in all patients with PCa, the malignant epithelial cells were tightly positive. • None of the benign hyperplasia specimens stained immunohistochemically positive for iNOS. • The production of NO in PCa by iNOS can cause cytotoxicity as a result of an immune defense mechanism, and may also increase tumor blood flow and promote angiogenesis.	29
Case-control	20 PCa 20 BPH 20 high-grade PIN 20 low-grade PIN	iNOS in tissue	• Positive iNOS immunostaining was detected in all pathological conditions. • High-grade PIN and prostatic carcinoma samples had more intense iNOS immunostaining than low-grade PIN and BPH samples. • More intense iNOS immunoreactivity in high grade PIN and PCa suggests a role of NO in prostate tumorigenesis	7
Case-control	21 PCa 50 BPH 50 Controls	CuZn-SOD and GSH-P in erythrocytes MDA in plasma	• MDA levels were higher and the antioxidant activity and Zn levels lower in the PCa groups than in the control and BPH groups. • MDA levels can be used to diagnose and monitor PCa. • Plasma and erythrocyte levels of Zn may be useful in the diagnosis of BPH and PCa.	63
Case-control	45 PCa 55 BPH 25 Controls	MDA and GST in serum GSH e GSH-P in erythrocyte	• Higher levels of MDA and GSTs activities, and lower levels of GSH and GPx activity in PC and BPH patients. • Oxidant-antioxidant imbalance may be one of the major factor responsible for the development of PCa and BPH.	53
Case-control	25 PCa 36 BPH 24 Controls	CuZn-SOD, GSH-P, CAT, Zn in erythrocyte MDA in plasma	• The levels increased of MDA, and decreased levels activities GPX and SOD in the PCa versus controls and BPH group. Zn levels were lowered in PCa versus controls with no significant changes between BPH and PCa. • Similarly, MDA was increased with decreased SOD activity and Zn level in BPH versus controls. • Altered prooxidant-antioxidant balance may lead to an increase in oxidative damage and consequently may play an important role in prostate.	6
Case-control	38 metastatic PCa 40 localized PCa 20 BPH 14 Controls	Retinol, α -tocopherol, lutein, lycopene, α -carotene, β -carotene concentrations and MDA in plasma PSA in serum	• Increased levels MDA in PCa patients and lower circulating concentrations of lutein, lycopene and b-carotene. • Lower concentrations of a-tocopherol, retinol, lutein and lycopene in patients with metastatic PCa, when compared with localized PCa patients. • In the PCa patients, PSA was correlated with the concentrations of the MDA.	3

Continuation Table 3. Comparison between the Redox State of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) and Prostate Cancer (PCa)

			• Negative correlation between MDA concentrations and both lutein and lycopene. • Lower concentrations of carotenoids, in particular, lycopene reflect disease progression rather.	
Case-control	10 PCa 10 BPH 10 Controls	Protein carbonyl, protein-bound sialic acid, MDA and PSA in serum	• In PCa, levels of lipid peroxides, carbonyl proteins, protein-bound sialic acid and PSA were increased compared to BPH and controls. There was an association between lipid peroxide and carbonyl protein with PSA and protein-bound sialic acid. • In BPH, serum lipid peroxides and protein bound sialic acid levels were higher compared to controls and protein carbonyls were correlated with the protein-bound sialic acid. • Sialic acid can be used as a marker to differentiate PCa from BPH with a sensitivity of 100% and specificity of 80%.	18
Case-control	15 PCa 15 BPH 15 Controls	SOD, CAT, GSH-P, GSH and GSH-Red activity in erythrocyte Cp and MDA in plasma	• SOD activity was increased in BPH and decreased in PCa. • CAT activity remained unaltered in BPH and was slightly declined in PCa. • Cp was increased in both kind of tumors, especially in PCa, as well as GSH and GR. • GSH-P was sharply increased in BPH and reduced in PCa. • In BPH the activity of antioxidant enzymes did not differ. The changes are significant in PCa, where they showed reduced levels of the antioxidant enzyme system in the blood.	31
Case-control	163 from Macedonia: 73 PCa 67 BPH 23 Controls 149 men from Turkey: 34 PCa 100 BPH 15 Controls	CuZn-SOD, GSH-P and CAT activities in erythrocyte MDA, NO ₂ –/NO ₃ – nitrite/nitrate, cGMP and 8-OHdG in plasma	• Oxidative/ nitrosative stress levels were similar in both Macedonia and Turkey populations: higher concentrations of MDA with lower GSH-P and CuZn-SOD activity in patients with PCa versus controls and BPH groups. • CAT activity was decreased in the PCa patients versus controls in the Turkish subjects. • PCa patients had increased plasma NO₂(-)/NO₃(-) and cGMP levels versus controls and BPH groups in both populations. • Imbalance in the oxidative stress/antioxidant status and revealed an altered nitrosative status in PCa patients and that the lipid peroxidation products might modulate the expression of genes related to tumor promotion creating an intracellular environment more favorable for DNA damage and disease progression.	50
Case-control	15 PCa 15 BPH 15 Controls	Peroxides, TEAC and SOD in plasma	• Plasma peroxides were significantly higher in patients with PCa with respect to BPH. • A positive correlation the peroxides and TEAC values in patients whith PCa. • Inverse correlation between peroxides and TEAC in patients with BPH. • Oxidative stress indicates as a pathogenic factor in patients affected by PCa and BPH, and supports the suggestion that men exposed to metabolic risk factors may develop BPH and PCa as a consequence of their effective ability to counteract oxidative	45

Continuation Table 3. Comparison between the Redox State of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) and Prostate Cancer (PCa)

Prospective Case-control	20 PCa 20 BPH	8-OH-dG, and MDA in serum	damage. • In the PCa group, serum MDA and DNA damage levels were raised, and serum caspase-3 levels were lowered when compared to the BPH. • Altered prooxidant and DNA damage levels may lead to an increase in oxidative damage and may consequently play an important role in prostate carcinogenesis.	30
Case-control	30 PCa 41 BPH 26 AIP 30 Controls	CuZn-SOD, CAT, Se-GSH-P activities in erythrocyte MDA, Zn, Cu, Se in plasma	• MDA evels increased in PCa in relation to the other groups. • Increase in CAT activity in PCa, BPH and PIA. • Levels of Zn, Cu, and Se were lower in patients with PCa and BPH when compared to the control group. • The evaluation of oxidative stress can aid in the prevention, diagnosis and treatment of prostate diseases.	24
Case-control	30 PCa 51 BPH	MDA, SOD and SPA in serum	• MDA and SOD levels were not significantly increased in PCa patients. • SPA values were similar in BPH and PCa patients. • SPA did not correlate with age, PSA, MDA or SOD levels in either group. • Serum prolidase activity is similar in BPH and PCa and is not correlated with MDA, SOD or PSA levels.	32
Case-control	10 PCa 70 BPH	8-OHdG in tissue	• All samples expressed 8-OHdG. • The levels of 8-OHdG expression in PCa were higher than those in BPH. • Oxidant stress produced 8-OHdG in prostate tissue leads to the damage of DNA and 8-OHdG may play an important role in PCa development.	43

AIP asymptomatic inflammatory prostatitis, PIN prostatic intraepithelial neoplasia, PSA total Prostate-Specific Antigens, SPA serum prolidase, 8-OHdG 8-hydroxy-deoxyguanine, iNOS inducible nitric oxide synthase, MDA malondialdehyde, GSH Glutathione, GST Glutathione S Transferase, GSH-P glutathione peroxidase, GSH-red Glutathione reductase, SOD superoxide dismutase, CAT catalase, TEAC Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TBARS Thiobarbituric acid reactive substances, Co cobalt, Cu copper, Zn zinc, Fe iron, Ni nickel, Se selenium, NO oxid nitric, Cp ceruloplasmin, cGMP cyclic guanosine monophosphate.

Table 4. Studies with Antioxidants and Prostate Cancer (PCa)

Study design	Sample size	Duration of the study	Antioxidants	Results and conclusion	Ref.
Randomized controlled trial	35.533 subjects	2001 to 2004	400 IU/day Alpha-tocopherol 200 mg/day Selenium	• 529 subjects developed PCa in the placebo group. • 620 subjects developed PCa in the vitamin E group • 575 subjects developed PCa in the selenium group and 555 in the selenium plus vitamin E group. • There was an increase in PCa risk ratio for every 1000 persons: 1.6 for vitamin E, 0.8 for selenium and 0.4 for the combination. • Vitamin E intake significantly increased the risk of PCa among healthy men.	28
Randomized controlled trial	29.133 subjects	5 to 8 years (± 6.1 years)	50 mg/day alpha-tocopherol 20 mg/day beta-carotene	• There was a 32% decrease in the incidence of PCa in individuals who received alpha-tocopherol compared to those who didn't. • Mortality from PCa was 41% lower among individuals who received alpha-tocopherol. • In patients receiving beta-carotene, the incidence of PCa was 23% higher and mortality was 15% higher compared to those who did not receive it. • Long-term alpha-tocopherol ingestion reduced incidence and mortality in male CaP smokers.	19
Case-control	1 294 PCa 1 451 Controls	1991 to 2002	15.3 mg/day Vitamin E 128.5 mg/day Vitamin C	• Vitamin E had a significant inverse association with PCa, whereas vitamin C showed an inverse non-significant association. • This study demonstrates an inverse association between vitamin E intake and the incidence of PCa.	11
Case-control	433 PCa 538 Controls	1986 to 1991	±9.65 mg/day Vitamin E ±190.7 mg/day Vitamin C ±10.365.25 IU/day Total carotenoids	• Ingestion of vitamin C, α and β-carotene, lycopene, significantly reduced the risk of PCa, although these associations were not independent of total vegetable intake. • A diet rich in vegetables may be important in reducing the risk of PCa.	37
Randomized controlled trial	29 361 subjects	1993 to 2001	11.511±8.498 µg/day.Lycopene	• Ingestion of lycopene was not associated with the risk of PCa. • Reduced risks were not found with ingestion of lycopene from tomato. • Among subjects with a family history of PCa, the risk decreased with increasing consumption of lycopene • These data do not provide support for high dose lycopene intake for prevention of PCa.	26
Cohort	29.361	1993 to 2001	400 UI/day Vitamin E	• High doses of vitamin E over a long period were associated with an	25

Continuation Table 4. Studies with Antioxidants and Prostate Cancer (PCa)

	subjects		2000 µg/day beta-carotene 500 mg/day Vitamin C	- increased risk of advanced PCa. - High doses of beta-carotene in patients with high consumption of beta-carotene were associated with an increased risk of PCa. - These findings do not provide support for high doses of antioxidant for the prevention of PCa.	
Randomized controlled trial	29.133 subjects	5 to 8 years	50mg/day tocopherol	- Increased serum alpha-tocopherol was associated with reduced risk of PCa. - There was an inverse relationship between serum α-tocopherol and risk of PCa for advanced disease. - These data indicated that serum concentrations of α-tocopherol were significantly associated with reduced risks of PCa, particularly in advanced PCa.	58
Randomized controlled trial	14.641 subjects	1997 to 2007	400 UI/day Vitamin E 500 mg/day Vitamin C	- Vitamin E had no effect on the incidence of PCa. There was also no significant effect of vitamin C on PCa. - Ingestion of vitamin E and C did not reduce the risk of CaP. These data do not support the use of these cancer prevention supplements in middle-aged and elderly men.	16
Cohort	295.344 subjects	1995 to 1996	0,45 mg/day alpha-tocopherol	- Supplemental vitamin E intake was not related to PCa risk. - Dietary alpha-tocopherol, was inversely related to the risk of advanced PCa. - These results suggest that supplemental vitamin E does not protect against PCa, but that increased consumption of alpha-tocopherol from foods is associated with a reduced risk the PCa.	61
Randomized controlled trial	8271 subjects	1983 to 1991	200 mcg/day Selenium	There was a significant reduction in the incidence of PCa and mortality in the selenium-eating group.	13
Randomized controlled trial	974 subjects with basal or squamous skin cell carcinoma	4.5 years ($\pm$ 6.5 years)	200 mcg/day Selenium	- Selenium intake was associated with a significant 63% reduction in the incidence of PCa. - Selenium had no protective effects against squamous and basal cell carcinoma of the skin, but selenium intake showed reductions in PCa incidence.	14
Cohort	35.424 subjects	10 years ($\pm$ 4.5 years)	>30 UI/day Vitamin E >20 µg/day Selenium	- Long-term use with vitamin E and selenium was not associated with the overall risk of CaP. - There was a tendency to reduce the risk of advanced PCa with vitamin E intake.	47
Randomized controlled trial	619 subjects	2000 to 2006	200 µg/day Selenium	There was no significant reduction in the risk of PCa in any disease stage with selenium.	36
Randomized	699 PCa	5 years	200 mcg/day or 400	Selenium intake had no effect on CaP incidence in high-risk men.	2

Continuation Table 4. Studies with Antioxidants and Prostate Cancer (PCa)

controlled trial			mcg/day Selenium	• These findings suggest that selenium intake has no role in CaP chemoprevention.	
Cohort	134 patients treated with Se and Ly 75 Controls	2012 to 2014	50 mcg/day Selenium 5 mg/day Lycopene	• Selenium and lycopene intake was not associated with an increased risk of PCa. • Data show no evidence to support the harmful or protective role of selenium and lycopene intake in PCa.	41
Randomized controlled trial	35 533 subjects	2001 to 2004	200 µg/day Selenium 400 UI/day Vitamin E	• There was a non-significant increase in the incidence of PCa in vitamin E intake, but not with selenium + vitamin E intake. • These data indicate that selenium or vitamin E alone or in combination did not prevent PCa in this population.	35
Cohort	35.242 subjects	2000 to 2004	>15mg/day Zinc	• Average zinc intake was not associated with risk of CaP. • The risk of advanced/metastatic PCa decreased with higher zinc intake. • Ingestion of zinc over long periods is associated with reduced risk of advanced disease.	17
Randomized controlled trial	49898 subjects	1986 to 2010	Plasma lycopene levels 681.7, 761.6, 820.0, 884.8, and 934.5 mol/L	• Higher lycopene intake was inversely associated with total PCa and more strongly with lethal PCa. • Higher lycopene intake was associated with biomarkers in the cancer indicative of less angiogenic potential. • Dietary intake of lycopene was associated with reduced risk of lethal PCa and with a lesser degree of angiogenesis in the tumor.	65
Case-control	244 PCa 408 Controls	2013 to 2015	Lycopene ± 1097.9 µg/day Alpha-tocopherol ± 838,15 µg/day Beta-carotene ± 4982.65 µg/day	• The risk of PCa decreased with increased intake of lycopene, tomato and carrot.	55
Cohort	58.279 subjects	1986 to 1992	2.9 mg/day Beta-carotene 1.1 mg/day Lycopene	• Ingestion of betacarotene and lycopene had no additional effect on overall risk of PCa.. • Lycopene was not associated with PCa.	52

Artigo 2

Metabolites of nitric oxide and thiol group in prostate cancer: association with metastasis and degree of metastasis risk stratification

Brunna Emanuella França Robles¹, Ana Gabriela da Silva Bonacini¹, Alexsandro Koike², Marcell Alysson Batisti Lozovoy³, Edna Maria Vissoci Reiche³, Rubens Cecchini⁴, Isaías Dichi⁵, Andréa Name Colado Simão³.

1. Laboratory of Research in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

2. Cancer Institute of Londrina, Laboratory of Research in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

3. Department of Patology Sciences – State University of Londrina, Brazil

4. Department of Patology, Clinical Analysis and Toxicology – State University of Londrina, Brazil

5. Department of Internal Medicine, University of Londrina, Londrina, Paraná, 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: Oxidative stress is an important factor in the development and progression of prostate cancer (PCa) and plays a crucial role in the metastatic process. **Objective:** To determine oxidative stress profile in PCa and to associate it with the presence of metastasis and different degrees of metastasis risk. **Subjects and Methods:** 149 PCa patients, without metastasis (Met-, n=108) and with metastasis (Met+, n=41), and 64 healthy controls. Posteriorly, the CaP groups were subdivided to metastasis risk stratification according to the National Comprehensive Cancer Network (NCCN): low risk (n = 28); intermediate risk (n = 41); high risk (n = 77). Lipid hydroperoxides in red blood cell (rbcLOOH) and plasma (plLOOH), plasma carbonyl protein (PCB), advanced protein oxidation products (AOPP), nitric oxide metabolites (NOx), and protein thiol groups (SH), ferritin, C-reactive protein (CRP), and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were evaluated. **Results:** LOOH, PCB, AOPP and NOx were not associated with the risk of PCa and metastasis. The SH was associated with the presence of metastasis (OR:1.011, 95%CI:1.011-1.020, p=0.027) independent of age, tPSA levels, fPSA levels, MetS, and inflammation. In addition, lower SH levels were also associated with the risk of developing metastasis and could differentiate patients at high risk from low risk patients (OR:0.992, 95%CI:0.984-1.000, p=0.045) and intermediate risk (OR:1.009, IC95%:1.001-1.016, p=0.026) but loses the association after adjust for inflammation. **Conclusion:** In conclusion, our data demonstrated that SH has an important role in pathophysiology of PCa being able to differentiate the presence of metastasis, independently of extraneous variable, including inflammation process. However, in relation to metastasis risk stratification, thiol group could be used in the association of patients with high risk but is dependent of inflammation present in metastasis.

Key Words: Prostate cancer; oxidative stress; thiol groups; metastasis.

1 INTRODUCTION

2
3 Prostate cancer (PCa) is the second leading cause of cancer mortality in men and represents a
4 major public health problem (BRAY et al., 2018). The majority of cancer deaths are
5 attributed to the metastatic spread of malignant cells to vital organs mainly occurring in bones
6 (90%), lungs (46%), and liver (25%) (BUBENDORF et al., 2000). Therefore, understanding
7 the mechanisms that regulate metastasis is crucial to the discovery of successful therapies and
8 patient survival.

9 Epidemiological, clinical, and experimental studies suggest that oxidative stress plays
10 an important role in the development and progression of PCa (BATTISTI et al., 2011;
11 WOZNIAK et al., 2012; OH et al., 2016; GANDAGLIA et al., 2017; ROUMEGUERE et al.,
12 2017). The reactive species of oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) are a class of carcinogens
13 known to influence the activities of inflammatory mediators and other cellular processes
14 involved in the initiation, promotion and progression of human neoplasms including PCa.
15 (HOLL et al., 2016; UDENSI; TCHOUNWOU, 2016).

16 The studies have demonstrated that ROS and RNS are associated with PCa
17 development, progression and response to therapy. Also, it has been demonstrated that PCa
18 tissues contain higher amounts of ROS and oxidative DNA damage than normal prostate
19 tissues (BRYN et al., 2012; PANDE et al., 2013). Men with PCa have lower antioxidant levels
20 in prostate tissues compared to healthy controls (AHMED et al., 2018). Beside that, Akinloye
21 et al. (2009) showed an inverse relationship between levels of prostate specif antigen (PSA), a
22 PCa biomarker, and antioxidant levels.

23 Those findings suggest that the redox state may play an important role in the
24 etiopathogenesis of PCa. Previous studies evaluate isolated biomarkers of oxidative stress
25 from patients with PCa and association with the presence of metastasis. In addition, until now,
26 there was no data about the association between oxidative stress profile and the different
27 degrees of risk for metastasis in PCa. Thus, the objective of this study was to determine a
28 profile of oxidative stress biomarkers in patients with PCa and its association with the
29 presence of metastasis and the different degrees of risk to metastasis.

30
31
32
33
34

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 controls (HC). Patients included in this study had prostate size ≥ 30 g were diagnosed with PCa based on histological evaluation (positive prostate biopsy) and. Patients presented different types of treatment at the time of admission: surgery (n = 65), chemotherapy (n=16), radiotherapy (n=16), hormone therapy (n=37), combined treatments radiotherapy and hormone therapy (n=3); chemotherapy and radiotherapy (n=4). Ethnicity was self reported as caucasian and not caucasian. The participants in the HC have prostate size up to 30g (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 kidney failure. PCa group was subdivided in two groups: without metastasis (PCa Met⁻, n=108) and with metastasis (PCa Met⁺, n=41), based on image exams. Further, PCa groups were subdivided according to the metastasis risk stratification of National Comprehensive Cancer Network (NCCN, 2018) Guidelines: 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. Three patients were excluded due to lack of criteria for classification in risk stratification of metastasis.

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. Abdominal circumference was measured with a soft tape in the region between the last rib and the iliac crest, always with the individuals standing.

Laboratory analysis

Peripheral blood samples were collected with and without anticoagulant EDTA 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 turbidimetry (C8000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was performed in automated equipment (Teste1, Alifax, Polverara, Italy).

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: 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 (GRUNDY et al. 2006).

Analysis of Tert-Butyl Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence (CL-LOOH)

Lipid hydroperoxides (LOOH) were evaluated in red blood cell (rbcLOOH) and plasma (plLOOH) as described by Flecha et al. (1991) and modified by Simão et al. (2006). The results were expressed in relatives light units (RLU).

Determinations of plasma carbonyl protein (PCB)

PCB content was measured as an estimate of protein oxidative injury, as described elsewhere by Reznick and Packer (1994). The results were expressed in nmol/mL/mg total proteins.

Determination of advanced oxidation protein products (AOPP)

AOPP was determined according to the method of Witko-Sarsat et al. (1998). The values were expressed in $\mu\text{M/L}$ of T-chloramine equivalent.

Determination of plasma levels of metabolites of nitric oxide (NOx)

NOx plasma levels were evaluated by the concentrations of its metabolites nitrite (NO^{2-}) and nitrate (NO^{3-}) according to the Griess reaction supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium by Panis et al. (2012), and the results were expressed in μM .

Determination of protein thiol groups (SH)

The quantification of sulfhydryl (SH) groups of proteins was determined by spectrophotometry, according to the method described by Hu et al. (1994). This technique is based on the reaction of the 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) with the thiol group of proteins. The results were expressed in μM .

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 and homogeneity of the variances were used Shapiro-Wilk and Levene test, respectively. 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 ($\pm\text{SD}$). Non-parametric data were assessed by Kruskal-Wallis test with Dunn's post test. Data were expressed as median and percentiles (25%-75%). The variables that presented in the univariate analysis $p < 0.10$ were included at the multivariate logistic regression analysis was used to define the significant association, with odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) of PCa patients versus hc using the markers and other significant characteristic data, in four different models. Statistical difference was considered when $p < 0.05$. All statistical analyzes were analyzed using statistical software SPSS version 22.0 (IBM, USA).

RESULTS

In Table 1 we observed the characteristics of patients with PCa Met⁺, PCa Met⁻ and HC. The individuals did not differ in ethnicity. Regarding age, patients with PCa Met⁻ and PCa Met⁺ were older than HC ($p<0.001$, $p<0.001$), respectively. In patients with PCa Met⁺ the MetS was more present in relation to the HC ($p=0.025$), but there was no significant difference between the PCa Met⁻ and HC. Concerning inflammation, CRP of PCa Met⁺ were higher when compared to HC ($p=0.007$) while ESR ($p=0.010$) was increased in the PCa Met⁻ ($p<0.001$) and PCa Met⁺ ($p<0.001$) when compared to HC. As expected, levels of tPSA was higher in patients PCa Met⁻ ($p<0.001$) and PCa Met⁺ ($p<0.001$) when compared to HC, as well as the fPSA levels were higher in PCa Met⁻ ($p=0.004$) and PCa Met⁺ ($p<0.001$) in comparison to HC. In addition, PCa Met⁺ showed higher levels of fPSA in comparison to PCa Met⁻ ($p=0.005$). The WEIGHT of the prostate was higher in PCa Met⁻ and PCa Met⁺ in relation to HC ($p<0.001$; $p<0.001$), but there was no difference in prostate size between patients PCa Met⁻ and PCa Met⁺ ($p>0.05$). In relation to oxidative stress biomarkers, rbcLOOH, plLOOH, and PCB did not differ among groups ($p>0.05$). AOPP plasma levels was higher in PCa Met⁻ in relation to HC ($p=0.004$) but did not differ between the PCa groups ($p>0.05$). NOx was decreased in PCa Met⁺ in relation to HC ($p=0.016$) and PCa Met⁻ ($p=0.006$) but there was not difference between PCa Met⁻ and HC ($p>0.05$). However, SH levels were lower in patients PCa Met⁻ ($p<0.001$) and PCa Met⁺ ($p<0.001$) in relation to HC and besides that the levels of SH were lower in PCa Met⁺ than PCa Met⁻ ($p<0.001$).

Further, significant results of the univariate statistical analysis were used to delineate the significant explanatory variables as determinants of independent association between oxidative stress profile and PCa patients in subsequent models of logistic regression analysis (Table 2). With model 1, adjusted for ethnicity, age and smoking, AOPP was associated with PCa Met⁻ and PCa Met⁺ when compared to HC (OR:1.018, 95% CI: 1.008-1.028; $p<0.001$; OR: 1.017, 95% CI: 1.006-1.028, $p=0.002$) and SH was able to differ PCa Met⁺ and Met- patients and HC (OR:0.960, 95% CI: 0.944-0.976; $p<0.001$; OR:0.950, 95% CI: 0.933-0.967; $p<0.001$ respectively Pca Met⁻ vs HC and PCa Met⁺ vs HC; SH still able to differ presence of metastasis (OR: 1.011, 95% CI: 1.004-1.017, $p<0.001$). Analyzing model 2, that included model 1, tPSa and fPSA, association between AOPP and presence of PCa did remain statistical significant, however, the associantion between SH and presence of metastasis remained significant (OR:1.012, 95% CI: 1.004-1.021; $p=0.005$). When MetS was added into model 3, the association between SH and presence of metastasis was also significant (OR:

1 1.012, 95% CI: 1.013-1.020; $p = 0.006$). Besides NOx was able to differ PCa patients to HC
 2 (OR:0.913, 95% CI: 0.836-0.998; $p = 0.045$; OR:0.916, 95% CI: 0.842-0.997; $p = 0.042$,
 3 respectively PCa Met- vs HC and PCa Met+ vs HC). Finally, with model 4, after additional
 4 adjustment for inflammatory parameters including ESR and CRP, only the the association
 5 between SH and presence of metastasis remained significant (OR:1.011, 95% CI: 1.011-
 6 1.020; $p = 0.027$).

7 The clinical and laboratory characteristics of PCa patients classified in 3 groups
 8 according to the metastasis risk stratification were presented in Table 3. The 3 groups did not
 9 differ according to the ethnicity, MetS frequency, ferritin, tPSA and fPSA level, and prostate
 10 size did not differ between groups ($p > 0.05$). However, patients with intermediate (B group,
 11 $p = 0.046$) and high risk for metastasis (C group, $p = 0.001$) were older than those at low risk
 12 and C vs B group did not differ ($p > 0.05$). In relation to the inflammation biomarkers, CRP
 13 and ESR, were increased in B group when compared to C ($p = 0.006$; $p < 0.001$) and A ($p = 0.02$;
 14 $p < 0.001$), respectively. With regard to profile of oxidative stress biomarkers, levels of
 15 rbcLOOH, plLOOH, NOx, AOPP and PCB did not differ statistically between groups
 16 ($p > 0.05$). However, SH was decreased in high risk patients when compared to low risk
 17 ($p = 0.019$) and intermediate risk ($p = 0.015$), but there was not differ when compared to
 18 intermediate and low risk ($p > 0.05$).

19 Posteriorly at the table 4, we showed the univariate statistical analysis used to
 20 delineate the significant explanatory variables as determinants of independent association of
 21 oxidative stress profile and risk stratification for metastasis in PCa patients. At the model 1,
 22 adjusted for ethnicity, age and smoking, lower levels of SH was associated with high risk for
 23 development of metastasis (OR: 0.991, 95% CI: 0.984-0.999; $p = 0.024$; when compared low
 24 risk vs high risk and OR: 1.009, 95% CI: 1.002-1.015, $p = 0.009$ when compared high risk vs
 25 intermediated risk). According to the model 2, that included model 1, tPSa and fPSA, SH
 26 remained associated with risk of developmentos metastasis (OR: 0.992; 95% CI: 0.984-1.000;
 27 $p = 0.038$ when compared low risk vs high risk (OR: 1.009, 95% CI: 1.001-1.016, $p = 0.020$
 28 when compared high risk vs intermediated risk). MetS addition into model 3, the association
 29 was also significant (OR: 0.992, 95% CI: 0,984-1.000; $p = 0.045$ when compared low risk vs
 30 high risk and OR: 1.009, 95% CI: 1.001-1.016, $p = 0.026$ when compared high risk vs
 31 instermediated risk). However, in model 4 that included ESR and CRP, the association lost
 32 statistical significance (OR: 0.995, 95% CI: 0.986-1.005; $p = 0.317$ when compared low risk vs
 33 high risk, and OR: 1.007, 95% CI: 0.998-1.015, $p = 0.115$ when compared high risk vs
 34 instermediated risk).

DISCUSSION

The major finding of the present study is that protein oxidation was able to differ PCa patients from HC, but this association is dependent of extraneous variables. In addition, lipid peroxidation and NOx were not able to differentiate PCa with or without metastasis or risk to metastasis. SH plasma level was associated with presence of metastasis, independently of age, PSA serum levels, MetS presence, and inflammation. In addition, this present study showed that lower levels of SH were also associated with risk of development of metastasis and could be differentiate patients with high risk from patients with intermediated and low risks.

In relation to protein oxidation, we evaluated two biomarkers, PCB and AOPP plasma levels. Although PCB, early biomarkers of protein oxidation, did not differ among the PCa and HC, AOPP plasma levels, late biomarker, were increased in PCa Met⁻ when compared with HC. This association was maintained after correction multivariate logistic regression analysis when additioned age, ethinicty and smoking. However, after entered other extraneous variables (MetS, tPSa, fPSA, and inflammation) AOPP did not remain associated. That result demonstrated that increased AOPP was associated with other parameters that not PCa. In relation to metastasis risk stratification, the groups also did not differ about PCB and AOPP plasma levels. A limited number of studies have evaluated the role of protein oxidation in PCa. Our data are agreement with Hoque et al. (2010) who did not find a significant association between risk of development PCa or its aggressiveness and serum levels of PCB. However, Battisti et al. (2011) and Pande et al. (2013) found levels increased PCB in patients with PCa when compared to controls. In addition, there are not studies, until now, that have evaluated AOPP plasma levels in PCa patients. It is possible that serum levels of oxidized proteins do not accurately reflect oxidative damage in the prostate, where there may have a high inflammatory microenvironment.

In the present study, LOOH levels in erythrocytes and plasma did not differ between PCa and HC, and among different degree of metastasis risk. In relation to lipid peroxidation, the data are controversial. Some studies have found a relationship between the levels of lipid peroxidation and PCa. Increased levels of lipid peroxidation were found when evaluated by malondialdehyde (MDA) in patients with localized PCa (SURAPANENI; VENKATA, 2006; PANDE et al., 2013; KOSOVA et al., 2014; KAYA et al., 2017; ARIF et al., 2018) and metastatic PCa (ALMUSHATAT et al., 2006; AYDIN et al., 2006). However, Dogru-Abbasoglu et al. (1999) showed no difference in MDA levels between PCa and BPH. In the present study, we evaluated hydroperoxide that is an initial product while MDA is a final

product of the oxidation process. Therefore, we evaluated lipid peroxidation by CL-LOOH, a methodology more sensitive and specific than TBARS (SIMÃO et al., 2006). Thus, different in lipid peroxidation stage and methodologies could explain our results.

Our study demonstrated that PCa Met- showed low NOx plasma levels when PCa Met+ and control, but after correction with bivariate logistic regression analysis this relation did not remain significant. There is a previous study that demonstrated strong iNOS immunoreactivity in PCa tissue and that increased levels of iNOS were positively associated with clinical staging and the PSA levels, but not with grade or other prognostic factors such as nodal status and capsular invasion (AALTOMAA et al., 2000). Baltaci et al. (2001) found a more intense immunostaining of iNOS in PCa than the benign prostatic hyperplasia (BPH) tissue samples. Wang et al. (2002) also found higher iNOS levels in PCa tissue than in adjacent non-neoplastic tissue. Sarafinowska et al. (2009) showed that levels of NOx were increased in plasma of patients with PCa when compared to controls, but they did not evaluate metastasis. Erlandsson et al. (2018) found high levels of iNOS in the prostate tumor epithelium when compared to the controls. Supporting the hypothesis that high iNOS in tumor epithelium of the prostate is associated with lethal disease.

The role of NO in PCa is controversial. The tumoricidal effects of NO are understudied in PCa. A study performed by Arora et al. (2018) in animal models creating a condition known as castration-resistant, PCa demonstrates that NO levels increased by S-nitrosoglutathione (GSNO), an NO donor, are capable of arresting tumor burden in highly tumorigenic xenografts; increased NO affects both activity and differentiation of tumor-associated macrophages. Another study reported that elevated NO levels are able to inhibit tumor growth in androgen dependent as well as cell lines such as cell line derived from lymphnode metastasis (LNCAP) (QIN et al., 2013). Thus, NO in PCa can cause cytotoxicity as a result of an immune defense mechanism but in excess, also promotes angiogenesis and metastasis (KLOTZ et al., 1998). Different levels of NOx found in PCa patients is that NOx has the capacity to induce or stopping the growth of cancer. In conditions where NOx is at lower concentrations, it aids in angiogenesis, which stimulates tumor progression by giving blood flow access to the tumor and subsequently result in cell proliferation. On the contrary, higher levels of NOx tend to be cytotoxic to cancer cells. This is achieved by the formation of peroxynitrite, which acts as an inducer of apoptosis and other toxic species during immune surveillances (VAHORA et al., 2016).

Although tPSA was widely used as a biomarker for trial the PCa, it was not able to distinguish the different degrees of risk of PCa. In the present study, SH was able to

differentiate PCa patients with metastasis from without metastasis and patients with high risk from patients with intermediated and low risk of development of metastasis is dependent of inflammation present in metastasis. Several studies have studied thiol group in PCa. Our data agree with previous studies that demonstrated reduced thiol group in PCa patients (HANIKOGLU et al., 2016; SÖNMEZ et al., 2018; SOLAKHAN et al., 2019).

The decrease in protein thiol levels in the present study it could be due to its role as a sacrificial antioxidant or as a tumor promoting antioxidant, facilitating cell proliferation and conferring selective growth advantage with decreased susceptibility to oxidative stress, as reported in other studies of oral and cerebral cancer (KOLANJIAPPAN et al., 2002; MANOHARAN et al., 2005; KUMAR et al., 2009). Thiols, which are an antioxidant structure in the serum, may have decreased upon exposure to severe oxidation because antioxidant defense weakens or oxidation increases in PCa (SOLAKHAN et al., 2019). In addition, this is the first study that showed that the thiol group could be used in the association of high risk metastasis stratification.

The main limitation of the present study is the cross-sectional design, which does not allow make inferences on causal relationships. However, this is a first study to evaluate oxidative stress biomarkers in the association of prognosis by risk stratification for the development of metastasis in patients with PCa. Furthermore, this study used a robust multivariate statistical approach, which allows controlling for many possible confounding variables including age, MetS, and PSA levels.

In conclusion, our data demonstrated that SH has an important role in pathophysiology of PCa being able to differentiate the presence of metastasis, independently of extraneous variables, including inflammation process. However, in relation to metastasis risk stratification, the thiol group can be used in the association of high-risk patients, but is dependent on the inflammation present in the metastasis. This is a first study to evaluated oxidative stress and nitrosative profile in PCa patients according to the presence of metastasis and metastasis risk stratification. In addition, further studies are needed to validate the use of oxidative stress and nitrosative biomarkers in the association of PCa and metastasis.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -Finance Code 001. This study was also supported by the National Council of Brazilian Research-CNPq and by Araucária Foundation from the state of Paraná.

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.

1 **REFERENCES**

- 2 AHMED, A.; ERYILMAZ, R.; DEMIR, H.; AYKAN, S.; DEMIR, C. Determination
3 of oxidative stress levels and some antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **Aging**
4 **Male**, v.15, p.1-9, 2018.
- 5 AKINLOYE, O.; ADARAMOYE, O.; KARIM, O. Changes in antioxidant status and lipid
6 peroxidation in Nigerian patients with prostate carcinoma. **Pol Arch Med Wewn**, v.119, n.9,
7 2009.
- 8 ALMUSHATAT, A. S. K. et al. Vitamin antioxidants, lipid peroxidation and the systemic
9 inflammatory response in patients with prostate cancer. **International Journal of Cancer**,
10 v.118, n.4, p.1051–1053, 2006.
- 11 AALTOMAA, S. H. et al. The prognostic value of inducible nitric oxide synthase in local
12 prostate cancer. **BJU Int**, v.86, p.234–239, 2000.
- 13 ARIF, M. et al. Evaluation of correlation between expression of P53
14 and Malondialdehyde levels in prostate cancer patients. **J Pak Med Assoc**, v.68, n.9, p.1373-
15 1377, 2018.
- 16 ARORA, H. et al. Alterations of tumor microenvironment by nitric oxide impedes castration-
17 resistant prostate cancer growth. **PNAS**, v.115, n.44, p.11298-11303, 2018.
- 18 AYDIN, A. et al. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer
19 and benign prostatic hyperplasia. **Clinical Biochemistry**, v.39, n.2, p.176-79, 2006.
- 20 BALTACI, S. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in benign prostatic hyperplasia,
21 low- and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. **BJU Int**,
22 v.88, p.100–103, 2001.
- 23 BATTISTI, V. et al. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients:
24 Relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine &**
25 **Pharmacotherapy**, v.65, n.7, p.516–24, 2011.
- 26 BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and
27 mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v.68, n.6, p.394-424,
28 2018.

- 1 BRYN, M. et al. Relationship of urinary isoprostanes to prostate cancer occurrence. **Molecular**
2 **Cell Biochemistry**, v.372, p.149–53, 2013.
- 3 BUBENDORF, L. et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589
4 patients. **Hum Pathol**, v.31, n.5, p.578-83, 2000.
- 5 DOGRU-ABBASOGLU, S. et al. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxides in the
6 plasma of patients with benign prostatic hyperplasia or prostate cancer are not predictive.
7 **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.125, p.402-4, 1999.
- 8 ERLANDSSON, A. High inducible nitric oxide synthase in prostate tumor epithelium is
9 associated with lethal prostate cancer. **Scandinavian Journal of Urology**, v.52, n.2, p.129–
10 133, 2018.
- 11 FLECHA, G. B.; LLESUY, B.; BOVERIS, S. A.; Hydroperoxide-initiated
12 chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free**
13 **Radic Biol Med**, v.10, p.93–100, 1991.
- 14 GANDAGLIA, G. et al. Impact of Postoperative Radiotherapy in Men with Persistently
15 Elevated Prostate-specific Antigen After Radical Prostatectomy for Prostate Cancer: A Long-
16 term Survival Analysis. **Eur Urol**, v.72, n.6, p.910-917, 2017.
- 17 GRUNDY, S. M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American
18 Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Current**
19 **Opinion Cardiology**, v.21, p.1-6, 2006.
- 20 HANIKOGLU, F. et al. Dynamic thiol/disulphide homeostasis before and after radical
21 prostatectomy in patients with prostate cancer. **Free Radic Res**, v.50, n.1, p.79-84, 2016.
- 22 HOLL, M. et al. ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and
23 survival of prostate carcinoma cells. **Molecular Carcinogenesis**, v.55, p.27-39, 2016.
- 24 HOQUE, A. et al. Serum oxidized protein and prostate cancer risk within the prostate cancer
25 prevention trial. **Cancer Prevention Research**, v.4, p.478-83, 2010.
- 26 KAYA, E. et al. Oxidative stress parameters in patients with prostate cancer, benign prostatic
27 hyperplasia and asymptomatic inflammatory prostatitis: A prospective controlled study.
28 **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v.26, n.7, p.1095–99, 2017.

- 1 KLOTZ, T. et al. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate
2 carcinoma. **Cancer**, v.82, n.10, p.1897–903, 1998.
- 3 KOLANJIAPPAN, K.; RAMACHANDRAN, C. R.; MANOHARAN, S. Biochemical
4 changes in tumor tissues of oral cancer patients. **Clin Biochem**, v.36, n.1, p.61-65, 2003.
- 5 KOSOVA, F.; TEMELTAS, G.; ARI, Z.; LEKILI, M. Possible relations between
6 oxidative damage and apoptosis in benign prostate hyperplasia and prostate cancer
7 patients. **Tumor Biology**, v.35, n.5, p.4295–99, 2014.
- 8 KUMAR, P. et al. Oxidação de proteína plasmática em pacientes com tumores cerebrais.
9 **Neurological Research**, v.31, n.3, p.270-273, 2009.
- 10 MANOHARAN, S. et al. Lipid peroxidation & antioxidants status in patients with oral
11 squamous cell carcinoma. **Indian J Med Res**, v.122, n.6, p.529-34, 2005.
- 12 OH, B. et al. Oxidative Stress in prostate cancer patients: a systematic review of case
13 controls studies. **Prostate International**, v.4, n.3 p.71-87, 2016.
- 14 PANDE, D. et al. Simultaneous progression of oxidative stress, angiogenesis, and cell
15 proliferation in prostate carcinoma. **Urologic Oncology: Seminars and Original**
16 **Investigations**, v.31, n.8, p.1561–66, 2013.
- 17 PANIS, C. et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer
18 patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat**,
19 v.133, p.89-97, 2012.
- 20 QIN, Y. et al. Maintenance of androgen receptor inactivation by S-nitrosylation. **Cancer Res**,
21 v.73, p.6690–6699, 2013.
- 22 REZNICK, A. Z; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for
23 carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v.233, p.357-63, 1994.
- 24 ROUMEGUERE, T. et al. Oxidative stress and prostatic diseases (Review). **Molecular and**
25 **Clinical Oncology**, v.7, p.723-28, 2017.
- 26 SARAFINOVSKA, Z. A. et al. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased
27 antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **Clinical Biochemistry**, v.42, n.12, p.1228–

- 1 35, 2009.
- 2 SIMÃO, A. N. C. et al. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage
3 introduced by 2,2 V-Azobis (Amidinopropane). **Life Science**, v.78, p.1202-10, 2006.
- 4 SOLAKHAN, M et al. Role of native Thiol, total Thiol and dynamic Disulphide in diagnosis
5 of patient with prostate cancer and prostatitis. **Int Braz J Urol**, v.45, n.1, p.1-8, 2019.
- 6 SÖNMEZ, M. G. et al. Is oxidative stress measured by thiol/ disulphide homeostasis status
7 associated with prostate adenocarcinoma? **Centr Eur Immunol**, v.43, n.2, p.174-179, 2018.
- 8 SURAPANENI, K. M.; VENKATA, G. R. Lipid peroxidation and antioxidant status in
9 patients with carcinoma of prostate. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**,
10 v.50, n.4, p.350–4, 2006.
- 11 UDENSI, U. K.; TCHOUNWOU, P. B. Oxidative stress in prostate hyperplasia and
12 carcinogenesis. **J Exp Clin Cancer Res**, v.35, n.1, 2016.
- 13 VAHORA, H. et al. The Potential Role of Nitric Oxide in Halting Cancer Progression
14 Through Chemoprevention. **J Cancer Prev**, v.21, n.1, p.1–12, 2016.
- 15 WANG, J. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in paired neoplastic and non-
16 neoplastic primary prostate cell cultures and prostatectomy specimen. **Urol Oncol**, v.21,
17 p.117–122. 2003.
- 18 WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of
19 Inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure. **J. Immunol**, v.161,
20 p.2524–32, 1998.
- 21 WOZNIAK, A. et al. Oxidative stress markers in prostate cancer patients after hdr
22 brachytherapy combined with external beam radiation. **Oxidative Medicine and Cellular**
23 **Longevity**, v.2012, p.1–5, 2012.

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

Characteristics	HC (A) n=64	PCa MeT ⁻ (B) n=108	PCa Met ⁺ (C) n=41	p	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)	NS	NS	NS	NS
Age (Years)	49 (45-57)	66 (59-70)	67 (62-75)	<0.001	<0.001	<0.001	NS
Smoker (No/ Yes) (%)	54 (84,3) / 10 (15,7)	94 (87,1) / 14 (12,9)	36 (87,8) / 5 (12,2)	NS	NS	NS	NS
MetS (No/Yes) (%)	44 (68.7) / 20 (31.3)	59 (54.6) / 49 (45.4)	19 (46.3) / 22 (53.7)	NS	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
Ferritin (µg/L)	224.4 (123.0-384.7)	215.1 (141.8-343.3)	223.7 (127.3-538.7)	NS	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
rbcLOOH * (RLU)	264.03 (83.04)	256.72 (65.81)	256.29 (64.94)	NS	NS	NS	NS
pLLOOH (RLU)	135.76 (125.60-151.02)	132.05 (118.41-143.41)	130.50 (118.75-140.81)	NS	NS	NS	NS
PCB (nmol/mg)	3.30 (1.01)	3.53 (1.43)	3.59 (1.03)	NS	NS	NS	NS
AOPP* (µmol/L of chloramines-T equivalents)	118.95(54.84)	168.21 (104.79)	145.29 (96.55)	0.005	0.004	NS	NS
NOx (µM)	10.07 (8.53-11.0)	11.40 (9.44-14.89)	9.42 (7.50-12.52)	0.001	NS	0.016	0.006
SH (µM)	372.82 (47.04)	249.52(58.88)	206.10 (73.88)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Qui-Square Test. Data were expressed as absolute number (%). ANOVA with post test of Bonferroni. Data were expressed as media (±SEM). Kruskal-Wallis Test with post test of Dunn. Data are expressed as median (25%-75%). * Data transformed in Ln. NS: not significant; p>0.05; C: Caucasian; NC: not Caucasian; MetS: Metabolic Syndrome; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; tPSA: Total Prostate-Specific Antigens; fPSA: Free Prostate-Specific Antigens; rbcLOOH: red blood cell lipid hydroperoxide, pLLOOH: plasma lipid hydroperoxide; PCB: carbonyl protein; AOPP: advanced products of protein oxidation; NOx: nitric oxide metabolites; SH: protein sulfhydryl groups.

Table 2. Association between health control (A) and prostate cancer patients divided into cancer with metastasis (C), without metastasis (B) and oxidative stress biomarkers.

		Model 1			Model 2			Model 3			Model 4		
		P	OR	95% CI	P	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI
AOPP ($\mu\text{mol/L}$ of chloramines T equivalents)	AxB	<0.001	1.018	1.008-1.028	0.155	1.011	0.996-1.026	0.166	1.012	0.995-1.028	0.906	1.449	0.003-673.4
	AxC	0.002	1.017	1.006-1.028	0.268	1.009	0.993-1.025	0.281	1.010	0.992-1.027	0.906	1.448	0.003-673,0
	CxB	0.586	1.001	0.997-1.006	0.563	1.002	0.996-1.008	0.521	1.002	0.996-1.008	0.860	1.001	0.994-1.007
NOx (μM)	AxB	0.608	1.047	0.878-1.249	0.629	0.952	0.780-1.162	0.045	0.913	0.836-0.998	0.977	10.295	8,739E-068-1,213E+069
	AxC	0.577	1.051	0.882-1.254	0.646	0.954	0.781-1.166	0.042	0.916	0.842-0.997	0.977	10.350	8,786E-068-1,219E+069
	CxB	0.445	0.996	0.986-1.006	0.838	0.998	0.976-1.020	0.819	0.997	0.971-1.024	0.750	0.995	0.963-1.028
SH (μM)	AxB	<0.001	0.960	0.944-0.976	0.001	0.945	0.913-0.979	0.005	0.933	0.889-0.979	0.892	0.271	1,799E-009- 40969956,261
	AxC	<0.001	0.950	0.933-0.967	<0.001	0.934	0.901-0.968	0.001	0.922	0.878-0.968	0.891	0.269	1,779E-009- 40532039,218
	CxB	<0.001	1.011	1.004-1.017	0.005	1.012	1.004-1.021	0.006	1.012	1.013-1.020	0.027	1.011	1.011-1.020

AOPP: advanced products of protein oxidation; NOx: nitric oxide metabolites; SH: sulfhydryl groups; tPSA: Total Prostate-Specific Antigens; fPSA: Free Prostate-Specific Antigens; MetS: Metabolic Syndrome; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: reactive c- protein. CI: confidence interval, OR: odds ratio.

Model 1: adjusted for age (years), ethnicity and smoker

Model 2: additionally, adjusted for tPSA and fPSA

Model 3: additionally, adjusted for MetS (No/Yes)

Model 4: additionally, adjusted for ESR and CRP

Table 3. Clinical and laboratory characteristics of prostate cancer patients classified according to the metastasis risk stratification, low risk (A), intermediated risk (B), high risk (C).

Characteristics	Group A n= 28	Group B n=41	Group C n=77	p	AxB	AxC	BxC
C/NC (%)	22 (78.5)/6 (21.5)	33 (80.4)/8 (19.6)	60 (77.9)/17 (22.1)	NS	NS	NS	NS
Age (Years)	61 (8)	65 (7)	67 (8)	0.001	0.046	0.001	NS
Smoker (No/ Yes) (%)	25 (89,2)/ 3 (10,8)	36 (87,8)/ 5 (12,2)	66 (85,7) /11 (14,3)	NS	NS	NS	NS
MetS (No/Yes) (%)	17 (60.7)/11 (39.3)	25 (60.9)/16 (39.1)	35 (45.4)/42 (54.6)	NS	NS	NS	NS
CRP (mg/L)*	1.300 (0.700-2.400)	1.400 (0.700-4.400)	3.400 (1.550-6.250)	<0.001	NS	0.002	0.006
ESR (mm/hr)	9 (5-15)	12 (7-23)	30 (20-54)	<0.001	NS	<0.001	<0.001
Ferritin(μg/L)*	255.1 (168.6)	278.0 (261.6)	369.9 (473.7)	NS	NS	NS	NS
tPSA(ng/mL)	6.403 (4.863-8.424)	5.690 (0.559-8.970)	6.010 (0.458-8.150)	NS	NS	NS	NS
fPSA(ng/mL)	0.589 (0.333-1.000)	0.412 (0.171-0.701)	0.698 (0.061-3.000)	NS	NS	NS	NS
Prostate Size (g)	40 (30-40)	40 (30-40)	40 (30-50)	NS	NS	NS	NS
rbcLOOH (RLU)	242.72 (47.77)	264.61 (64.07)	258.14 (72.10)	NS	NS	NS	NS
pILOOH (RLU)	136.85 (123.71-150.18)	132.10 (118.70-143.45)	128.93 (116.78-140.28)	NS	NS	NS	NS
PCB (nmol/mg)	3.64 (11.33)	3.63 (1.21)	3.49 (1.41)	NS	NS	NS	NS
AOPP* (μmol/L of chloramines-T equivalents)	170.13 (85.01)	162.86 (88.09)	160.51 (117.10)	NS	NS	NS	NS
NOx (μM)	11.71 (9.85-14.89)	10.34 (8.8013.49)	11.03 (8.66-15.06)	NS	NS	NS	NS
SH (μM)	259.66 (68.65)	255.61 (50.59)	220.23 (69.04)	0.003	NS	0.019	0.015

Qui-Square Test. Data were expressed as absolute number (%). ANOVA with post test of Bonferroni. Data were expressed as media (±SEM). Kruskal-Wallis Test with post test of Dunn. Data are expressed as median (25%-75%). * Data transformed in Ln. NS: not significant; p>0.05; C: Caucasian; NC: not Caucasian; MetS: Metabolic Syndrome; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; tPSA: Total Prostate-Specific Antigens; fPSA: Free Prostate-Specific Antigens; rbcLOOH: red blood cell lipid hydroperoxide, pILOOH: plasma lipid hydroperoxide; PCB: carbonyl protein; AOPP: advanced products of protein oxidation; NOx: nitric oxide metabolites; SH: protein sulfhydryl groups.

Table 4. Association between prostate cancer patients divided according to the metastasis risk stratification as low risk (A), intermediated risk (B), high risk (C) and oxidative stress biomarkers.

		Model 1			Model 2			Model 3			Model 4		
		p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI
SH	AxB	0.956	1.000	0.992-1.008	0.954	1.000	0.992-1.009	0.973	1.000	0.992-1.009	0.664	1.002	0.993-1.011
	AxC	0.024	0.991	0.984-0.999	0.038	0.992	0.984-1.000	0.045	0.992	0.984-1.000	0.317	0.995	0.986-1.005
	CxB	0.009	1.009	1.002-1.015	0.020	1.009	1.001-1.016	0.026	1.009	1.001-1.016	0.115	1.007	0.998-1.015

AOPP: advanced products of protein oxidation; NOx: nitric oxide metabolites; SH: sulfhydryl groups; tPSA: Total Prostate-Specific Antigens; fPSA: Free Prostate-Specific Antigens; MetS: Metabolic Syndrome; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: reactive c- protein. CI: confidence interval, OR: odds ratio.

Model 1: adjusted for age (years), ethnicity and smoker

Model 2: additionally, adjusted for tPSA and fPSA

Model 3: additionally, adjusted for MetS (No/Yes)

Model 4: additionally, adjusted for ESR and CRP

6 CONCLUSÕES

Artigo 1

- Estudos demonstraram a presença de estresse oxidativo e nitrosativo na HPB e no CaP, tanto pelo aumento das espécies reativas de oxigênio quanto pela deficiência do sistema antioxidante.

- Níveis aumentados dos marcadores do estresse oxidativo no HPB e CaP em comparação aos grupos controle, com níveis mais elevados nos pacientes com CaP em relação ao HPB.

- O marcador mais estudado para avaliar a peroxidação lipídica foi o MDA, enquanto a atividade das enzimas antioxidantes mais analisadas foram CAT, SOD e GSH.

- Estes estudos indicam que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da próstata.

- O uso de antioxidantes obteve resultados controversos, mas o licopeno parece apresentar efeitos benéficos no risco de PCa.

Artigo 2

- Pacientes com CaP apresentam redução nos níveis de SH quando comparados com indivíduos saudáveis.

- Os níveis de SH podem diferenciar pacientes com CaP metastático daqueles com CaP localizado, independentemente da idade, presença de SM, níveis de PSA total e livre, e inflamação.

- Os níveis de SH na estratificação de risco poderia ser usado pacientes com alto risco de desenvolvimento de metástase, independentemente da idade, presença de SM, e níveis de PSA total e livre.

- Os marcadores inflamatórios avaliados, VHS e PCR, apresentaram maiores níveis em pacientes Cap metastáticos, quando comparados a indivíduos controles e pacientes com CaP não metastático; e podem influenciar no perfil de estresse oxidativo destes pacientes.

- Pacientes classificados como alto risco para o desenvolvimento de metástase, apresentaram maiores níveis de VHS e PCR quando comparados aos pacientes com risco intermediário e baixo, e podem influenciar no perfil de estresse oxidativo destes pacientes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A principal limitação deste estudo é que este apresenta um delineamento caso-controle, que não permite inferências sobre relação causal entre os biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo e a ocorrência de CaP e a presença de metástase.

Este é o primeiro estudo que avaliou o perfil oxidativo e nitrosativo em pacientes com CaP, de acordo com a presença de metástase e estratificação de risco e que demonstrou que o processo inflamatório presente em pacientes com metástase está associado ao desequilíbrio redox. Mais estudos *in vivo* são necessários para investigar o envolvimento do estresse oxidativo no processo de câncer e metástase.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AARON, L.; FRANCO, O. E.; HAYWARD, S. W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. **Urol Clin North Am.** v.43, n.3, p.279-88, 20016.
- AHMED, A.; ERYILMAZ, R.; DEMIR, H.; AYKAN, S.; DEMIR, C. Determination of oxidative stress levels and some antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **Aging Male**, v.15, p.1-9, 2018.
- AKINLOYE, O.; ADARAMOYE, O.; KARIM, O. Changes in antioxidant status and lipid peroxidation in Nigerian patients with prostate carcinoma. **Pol Arch Med Wewn**, v.119, n.9, 2009.
- ALMUSHATAT, A. S. K. et al. Vitamin antioxidants, lipid peroxidation and the systemic inflammatory response in patients with prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v.118, n.4, p.1051–1053, 2006.
- ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z. et al. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **Clin Biochem.** v.42, n.12, p.1228-35, 2009.
- ARYAL, M. et al. Oxidative stress in patients with benign prostate hyperplasia. **Journal of the Nepal Medical Association**, v.46, n.167, p.103–106, 2007.
- ATTARD, G. et al. Prostate cancer. **The Lancet**, v.387, n.10013, p.70–82, 2016.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev.**, v.2014, p.1-31, 2014.
- AYDIN, A. et al. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Clinical Biochemistry**, v.39, n.2, p.176-79, 2006.
- BASHIR, M. N. Epidemiology of Prostate Cancer. **Asian Pac J Cancer, Prev.** v.16, n.13, p.5137-41, 2015.
- BATTISTI, V. et al. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients:

- 1 Relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine &**
2 **Pharmacotherapy**, v.65, n.7, p.516–24, 2011.
- 3 BJURLIN, M. A. et al. Optimization of initial prostate biopsy in clinical practice: sampling,
4 labeling and specimen processing. **J Urol.**, v.189, n.6, p.2039-46, 2013.
- 5 BRYIS, M. et al. Relationship of urinary isoprostanes to prostate cancer occurrence. **Molecular**
6 **Cell Biochemistry**, v.372, p.149–53, 2013.
- 7 CALVETE, A. C. et al. Avaliação da extensão da neoplasia em câncer da próstata: valor do
8 PSA, da percentagem de fragmentos positivos e da escala de Gleason. **Rev. Assoc. Med.**
9 **Bras**, v.49, n.3, 2003.
- 10 CAUWELAERT, R. V.; AGUIRRE, C.; SANDOVAL, C. Prostatectomía radical en el
11 tratamiento del cáncer de próstata. **Rev. Chilena de Cirugía**, v. 58, n. 4, p. 255-259, 2006.
- 12 CHENG, L. et al. Staging of prostate cancer. *Histopathology*. v.60, n.1, p.87-117, 2012.
- 13 CHOUDHARI, S. K. et al. Nitric oxide and cancer: a review. **World J. Surg. Oncol.**, v.30,
14 n.11, p.2-11, 2013.
- 15 CLARK, P. E.; TORTI, F. M. Prostate cancer and bone metastases: medical treatment. **Clin**
16 **Orthop Relat Res**, v.415, p.148-57, 2003.
- 17 COOK, M. B.; et al. A genome-wide association study of prostate cancer in West african
18 men. **Human Genetics**, v.133, p.509-21, 2014.
- 19 COOPER, C. R.; PIENTA, K. J. Cell adhesion and chemotaxis in prostate cancer metastasis
20 to bone: a minireview. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases.**, v.3, p.6-12, 2000.
- 21 DAVIES, G.; JIANG, W. G.; MASON, M. D. Cell adhesion molecules and prostate cancer
22 invasion. **The Journal of Urology**, v.163, p.985–992, 2000.
- 23 DHINGRA, N, BHAGWAT, D. Benign prostatic hyperplasia: an overview of existing
24 treatment. **Indian Journal of Pharmacology**, v.43, no1, p.6–12, 2011.
- 25 EGGNER, S. E.; CIFU, A. S.; NABHAN, C. Prostate Cancer Screening. **JAMA**, v.25, n.8,
26 p.825-6, 2015.

- 1 EPSTEIN, J. L. et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated
2 Alternative to the Gleason Score. **Eur Urol.**, v.69, n.3, p.428-35, 2016.
- 3 FACUNDES, I. A. **Câncer de próstata: novos caminhos para a cura.** Porto Alegre, RS:
4 AGFE, 2002.
- 5 FREITAS, M., et al. Oxidative stress adaptation in aggressive prostate cancer may be
6 counteracted by the reduction of glutathione reductase. **FEBS Open Bio**, v.2, n.1, p.119–128,
7 2012.
- 8 FLECHA, G. B.; LLESUY, B.; BOVERIS, S. A.; Hydroperoxide-initiated
9 chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free**
10 **Radic Biol Med**, v.10, p.93–100, 1991.
- 11 FITZPATRICK, J. M. The natural history of benign prostatic hyperplasia. **British Journal of**
12 **Urology International**, v.97, s2, p.3–6, 2006.
- 13 GILL, J. G.; PISKOUNOVA, E.; MORRISON, S. J. Cancer, Oxidative Stress, and
14 Metastasis. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.**, v.81, p.163-175, 2016.
- 15 GOSWAMI, K.; NANDEESHA, H.; KONER, B. C.; NANDAKUMAR, D. N. A
16 comparative study of serum protein-bound sialic acid in benign and malignant prostatic
17 growth: possible role of oxidative stress in sialic acid homeostasis. **Prostate Cancer**
18 **and Prostatic Diseases**, v.10, n.4, p.356–59, 2007.
- 19 GRUNDY, S. M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American
20 Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Current**
21 **Opinion Cardiology**, v.21, p.1-6, 2006.
- 22 HALLIWELL, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. **Encyclopedia of**
23 **Life Science**, Nature Publishing Group, UK, 2005.
- 24 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 5º
25 Edição. Cidade: New York. Oxford, 2015.
- 26 HALLIWELL, B.; WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in
27 vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal**
28 **of Pharmacology**, v.142, no2, p.231–55, 2004.

- 1 HIRAGA, T. Bone metastasis: Interaction between cancer cells and bone microenvironment.
2 **Journal of Oral Biosciences**, v.61, n.2, p.95-98, 2019.
- 3 HOLL, M. et al. ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and
4 survival of prostate carcinoma cells. **Molecular Carcinogenesis**, v.55, p.27-39, 2016.
- 5 INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil.
6 Disponível em <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em:
7 05 Nov. 2018.
- 8 INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **GLOBOCAN 2018:**
9 **estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018**. Lyon, France:
10 IARC; 2018 Nov Available from: <http://globocan.iarc.fr/>
- 11 IYNEM, A. H. et al. The effect of prostate cancer and antiandrogenic therapy on lipid
12 peroxidation and antioxidant systems. **International Urology and Nephrology**, v.36, p.57-
13 62, 2004.
- 14 KACHUR, E. Prostate Cancer Review. **U.S. Pharmacist**, v.43, n.8, p.7-13, 2018.
- 15 KALIKS, R. A.; GIGLIO, A. D. Management of advanced prostate cancer. **Rev. Assoc. Med.**
16 **Bras.**, v. 54, n. 2, p. 178-82, 2008.
- 17 KANG, J. J. et al. Ultrasensitive prostate specific antigen after prostatectomy reliably
18 identifies patients requiring postoperative radiotherapy. **J Urol.**, v.193, n.5, p.1532-8, 2015.
- 19 KAYA, E. et al. Oxidative stress parameters in patients with prostate cancer, benign prostatic
20 hyperplasia and asymptomatic inflammatory prostatitis: A prospective controlled study.
21 **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v.26, n.7, p.1095–99, 2017.
- 22 KHANDRIKA, L.; KUMAR, B.; KOUL, S.; KOUL, H. K. Role of oxidative stress in
23 prostate cancer. **Cancer Letters**, v.282, n.2, p.125–36, 2009.
- 24 KIMURA, T; EGAWA, S. Epidemiology of prostate cancer in Asian countries. **International**
25 **Journal of Urology**, v.25, n. 6, p.524-31, 2018.
- 26 KLOTZ, T.; BLOCH, W.; VOLBERG, C.; ENGELMANN, U.; ADDICKS, K. Selective
27 expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. **Cancer**, v.82,

- 1 n.10, p.1897–903, 1998.
- 2 KOSOVA, F.; TEMELTAS, G.; ARI, Z.; LEKILI, M. Possible relations between
3 oxidative damage and apoptosis in benign prostate hyperplasia and prostate cancer
4 patients. **Tumor Biology**, v.35, n.5, p.4295–99, 2014.
- 5 KOSTOVA, M. B. et al. PSA-alpha-2-macroglobulin complex is enzymatically active in the
6 serum of patients with advanced prostate cancer and can degrade circulating peptide
7 hormones. **Prostate**. v.78, n.11, p.819-829, 2018.
- 8 KOTRIKADZE, N. et al. Activity and content of antioxidant enzymes in prostate tumors.
9 **Experimental Oncology**, v.30, n.3, p.244–7, 2008.
- 10 KUCUKDURMAZ, F. et al. Evaluation of serum prolidase activity and oxidative stress
11 markers in men with BPH and prostate cancer. **BMC Urol**, v.17, p.116-22, 2017.
- 12 KUMAR, B.; KOUL, S.; KHANDRIKA, L.; MEACHAM, R. B.; KOUL, H. K. Oxidative
13 stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype.
14 **Cancer Research**, v.68, n.6, p.1777-85, 2008.
- 15 LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified 6 proteins.
16 **Methods Enzymology**, v.186, p.464-78, 1990.
- 17 LAUKKANEN, J. A; et al. Metabolic syndrome and the risk of prostate câncer in finnish
18 men: a population-based study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.10,
19 p.1646-50, 2004.
- 20 LITWIN, M. S.; TAN, H. J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review.
21 **JAMA**, v.317, n.24, p.2532-2542, 2017.
- 22 MACINNIS, R. J. et al. Body size and composition and prostate cancer. **Cancer**
23 **Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.12, p.1417-21, 2003.
- 24 MASSAGUÉ, J.; OBENAU, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells.
25 *Nature*, v.21, p.298-306, 2016.
- 26 MERENDINO, R. A. et al. Malondialdehyde in benign prostate hypertrophy: a useful
27 marker? **Mediators of Inflammation**, v.12, n.2, p.127-28, 2003.

- 1 MINCIULLO, P. L.; INFERRERA, A.; NAVARRA, M.; CALAPAI, G.; GANGEMI, S.
2 Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia: A systematic review. **Urologia**
3 **Internationalis**, v.94, n.3, p.249–54, 2015.
- 4 MIYAKE, H.; HARA, I.; KAMIDONO, S.; ETO, H. Oxidative DNA damage in patients
5 with prostate cancer and its response to treatment. **The Journal of Urology**, v.171, p.1533–
6 36, 2004.
- 7 MOTTET, N. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced,
8 relapsing, and castration-resistant prostate cancer. **Eur Urol.**, v.59, n.4, p.572-83, 2011.
- 9 NAVARRO-GONZALVEZ, J. A.; GARCIA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semi-automated
10 measurement of nitrate in biological fluids. **Clin Chem**, v.44, p.679-681, 1998.
- 11 NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. Disponível em:
12 <https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/>. Acesso em 06 de dezembro de 2018.
- 13 OHTAKE, S. et al. Oxidative stress marker 8-hydroxyguanosine is more highly expressed in
14 prostate cancer than in benign prostatic hyperplasia. **Mol. Clin. Oncol.**, v.9, n.3, p.302–304,
15 2018.
- 16 PACE, G.; MASSIMO, C. D.; AMICIS, D. D. CORBACELLI, M. G. T. Oxidative stress in
17 benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Urologia Internationalis**, v.85, no3, p.328–
18 33, 2010.
- 19 PANDE, D. et al. Simultaneous progression of oxidative stress, angiogenesis, and cell
20 proliferation in prostate carcinoma. **Urologic Oncology: Seminars and Original**
21 **Investigations**, v.31, n.8, p.1561–66, 2013.
- 22 PANIS, C. et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer
23 patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat**,
24 v.133, p.89-97, 2012.
- 25 PERDANA, N. R.; MOCHTAR, C. A.; UMBAS, R.; HAMID, A. R. The Risk Factors of
26 Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. **Acta Med Indones.** v.48, n.3,
27 p.228-238, 2016.
- 28 QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and

- 1 metastasis. **Nat Med.**, v.19, n.11, p.1423-37, 2013.
- 2 REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method
3 for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v.233, p.357-363, 1994.
- 4 RICE, M. A.; STOYANOVA. T. Biomarkers for diagnosis and prognosis of prostate cancer.
5 In: Prostatectomy. **IntechOpen**, 2018.
- 6 ROUMEGUERE, T. et al. Oxidative stress and prostatic diseases (Review). **Molecular and**
7 **Clinical Oncology**, v.7, p.723-28, 2017.
- 8 SAHA, K. S. et al. Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation.
9 **International Journal of Molecular Science**, v.18, n.7, p.1544-73, 2017.
- 10 SFANOS, K. S.; MARZO A. M. Prostate cancer and inflammation: the evidence.
11 **Histopatology**, v.60, p.199-215, 2012.
- 12 SHAHI, P. K.; MANGA, G. P. Cáncer de próstata metastático. **Oncología**, v. 29, n. 10, p.
13 398-404, 2006.
- 14 SHARMA, S.; ZAPATERO-RODRIGUEZ, J.; O'KENNEDY, R. Prostate cancer diagnostics:
15 Clinical challenges and the ongoing need for disruptive and effective diagnostic tools.
16 **Biotechnol Adv.**, v.35, n.2, 135-149, 2017.
- 17 SHIOTA, M. et al. Antioxidant therapy alleviates oxidative stress by androgen deprivation
18 and prevents conversion from androgen dependent to castration resistant prostate cancer.
19 **The Journal of Urology**, v.187, p.707-14, 2012.
- 20 SIMÃO, A. N. C.; et al. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage
21 induced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane). **Life Sci**, v.78, p.1202–10, 2006.
- 22 SRIVASTAVA, D. S. L.; MITTAL, R. D. Free radical injury and antioxidant status in
23 patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer. **Indian Journal of Clinical**
24 **Biochemistry**, v.20, n.2, p.162–5, 2005.
- 25 STEFFEN, R. E. et al. Rastreamento populacional para o câncer de próstata: mais riscos que
26 benefícios. **Physis**, Rio de Janeiro , v. 28, n. 2, 2018 .
- 27 SURAPANENI, K. M.; VENKATA, G. R. Lipid peroxidation and antioxidant status in

- 1 patients with carcinoma of prostate. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**,
2 v.50, n.4, p.350–4, 2006.
- 3 TAI, H. C. et al. Osteoblast-derived WISP-1 increases VCAM-1 expression and enhances
4 prostate cancer metastasis by down-regulating miR- 126. **Oncotarget**, v. **5**, n. **17**, **2014**.
- 5 TAITT, H. E. Global Trends and Prostate Cancer: A Review of Incidence, Detection, and
6 Mortality as Influenced by Race, Ethnicity, and Geographic Location. **Am J Mens Health**,
7 v.12, n.6, p.1807–1823, 2018.
- 8 UDENSI, U. K.; TCHOUNWOU, P. B. Oxidative stress in prostate hyperplasia and
9 carcinogenesis. **J Exp Clin Cancer Res**, v.35, n.1, 2016.
- 10 VALKO, M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J. Free
11 radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The**
12 **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, no1, p.44–84, 2007.
- 13 VITAL, P.; CASTRO, P.; ITTMANN, M. Oxidative stress promotes benign prostatic
14 hyperplasia. **The Prostate**, v.76, n.1, p.58–67, 2016.
- 15 WANG, M.C.; VALENZUELA, L. A.; MURPHY, G. P.; CHU, T. M. Purification of a
16 human prostate specific antigen. **Invest Urol.**, v. 17, n. 2, p.159-163, 1979.
- 17 WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of
18 Inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure. **J. Immunol**, v.161,
19 p.2524–32, 1998.
- 20 WONG, M.C.; et al. Global incidence and mortality for prostate cancer: analysis of temporal
21 patterns and trends in 36 countries. **European Urology**, v.70, p. 862-74, 2016.
- 22 WOZNIAK, A. et al. Oxidative stress markers in prostate cancer patients after HDR
23 brachytherapy combined with external beam radiation. **Oxidative Medicine and Cellular**
24 **Longevity**, v.2012, p.1–5, 2012.
- 25 XIA, S. J.; XU, X. X.; TENG, J. B.; XU, C. X.; TANG, X. D. Characteristic pattern of human
26 prostatic growth with age. **Asian Journal of Andrology**, v.4, p.269-71, 2002.

- 1 YASMIN-KARIM, S. et al. E-selectin ligand-1 controls circulating prostate cancer cell
- 2 rolling/adhesion and metastasis. **Oncotarget**, v. 5, n.23, 2016.
- 3 ZABAIYOU, N.; MABED, D.; LOBACCARO, J.M.; LAHOUEL, M. Oxidative stress in
- 4 benign prostate hyperplasia. **Andrologia**, v.48, n.1, p.69–73, 2016.

APÊNDICES

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 , urologiakoiike@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:

Telefone: 3371-2321

Alexsandro Koike

Médico urologista

RG:

Tel: 3377-1800

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

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

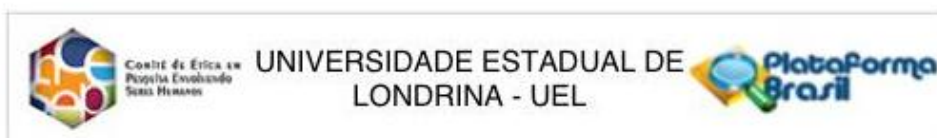
Data: _____

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

19- Infecção na data da coleta?	(☐) Sim (☐) Não Qual?
20- Tabagismo?	(☐) Sim (☐) Não (☐) Ex-fumante Quanto tempo? Período:
21- Atividade Física?	(☐) Sim (☐) Não Frequência?
22- Diabetes?	(☐) Sim (☐) Não
23- Hipertensão?	(☐) Sim (☐) Não
24- Outras doenças:	
25- Outros dados:	
Toque retal: _____ Tam. Aprox.: _____	
USG próstata. Data: ____/____/____ Tam. Aprox.: _____	

ANEXOS

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 compará-los com pacientes

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



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

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



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 Spearman. 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

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



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	folhaderostoprostate.pdf	17/05/2016	Andréa Name	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.645.118

Folha de Rosto	folhaderostoprostate.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

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br

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

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

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

Declaração de Colaboração do Hospital Evangélico de Londrina



Declaração de Concordância dos Serviços Envolvidos e/ou de Instituição

Co-Participante

Local, 20 de dezembro de 2015

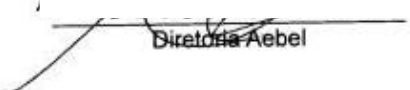
Ilma. Sra. Profa. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do CEP/UEL

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, Alessandro 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,


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 22 de dezembro de 2015

Diretoria da AEBEL
 **Eduardo Sene Cardoso**
Diretor AEBEL