



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AMANDA LETÍCIA FRANCELINO

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES ALÉLICAS
POLIMÓRFICAS NO EIXO QUIMIOCINA RECEPTOR
CXCL12/CXCR4 E DA IMUNOMARCAÇÃO DE *CXCR4*
EM AMOSTRAS TUMORAIS MALIGNAS DE
PRÓSTATA METASTÁTICAS E NÃO
METASTÁTICAS**



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



Programa de
Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular

AMANDA LETÍCIA FRANCELINO

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES ALÉLICAS
POLIMÓRFICAS NO EIXO QUIMIOCINA RECEPTOR
CXCL12/CXCR4 E DA IMUNOMARCAÇÃO DE *CXCR4*
EM AMOSTRAS TUMORAIS MALIGNAS DE
PRÓSTATA METASTÁTICAS E NÃO
METASTÁTICAS**

AMANDA LETÍCIA FRANCELINO

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES ALÉLICAS
POLIMÓRFICAS NO EIXO QUIMIOCINA RECEPTOR
CXCL12/CXCR4 E DA IMUNOMARCAÇÃO DE *CXCR4*
EM AMOSTRAS TUMORAIS MALIGNAS DE
PRÓSTATA METASTÁTICAS E NÃO METASTÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Roberta Losi Guembarovski.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Karen Brajão de Oliveira.

Londrina
2023

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

F815i Francelino, Amanda Letícia .
Investigação de variantes alélicas polimórficas no eixo quimiocina receptor *CXCL12/CXCR4* e da imunomarcagem de CXCR4 em amostras tumorais malignas de próstata metastáticas e não metastáticas / Amanda Letícia Francelino. - Londrina, 2023.
69 f. : il.

Orientador: Roberta Losi Guembarovski.
Coorientador: Karen Bração de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Genética Molecular - Tese. 2. Polimorfismo - Tese. 3. Imunohistoquímica - Tese. 4. Câncer - Tese. I. Losi Guembarovski, Roberta. II. Bração de Oliveira, Karen. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 575.1

AMANDA LETÍCIA FRANCELINO

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES ALÉLICAS
POLIMÓRFICAS NO EIXO QUIMIOCINA RECEPTOR
CXCL12/CXCR4 E DA IMUNOMARCAÇÃO DE *CXCR4*
EM AMOSTRAS TUMORAIS MALIGNAS DE
PRÓSTATA METASTÁTICAS E NÃO METASTÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dr^ª Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª Dr^ª. Nádia Calvo Martins Okuyama
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de abril de 2023.

“Minha avó tinha uma teoria: ainda que nasçamos com uma caixa de fósforos em nosso interior não podemos acendê-los sozinhos, precisamos de oxigênio e uma vela. O oxigênio viria da respiração da pessoa que você ama; a vela seria qualquer tipo de comida, música, palavra que faça disparar a explosão que acende um dos fósforos... então um calor agradável cresce dentro de nós que irá desaparecendo pouco a pouco até que uma nova explosão ocorra. Cada pessoa tem que descobrir qual é o seu detonador para viver, pois a combustão que ocorre quando um fósforo é inflamado que nutre a alma.”

Laura Esquivel, Como Água para Chocolate

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Cesar Francelino e Lucinéia Francelino, por todo o apoio e incentivo durante toda a minha vida. Por todo amor e compreensão nos momentos em que tive que priorizar a vida acadêmica e por cuidarem de mim todos os dias. Sem eles nada teria sido possível, são parte fundamental de todas as minhas conquistas.

Agradeço a todas as professoras que são responsáveis pelo LAMON por proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho e em especial à minha orientadora professora Dr^a Roberta Losi Guembarovski pela orientação, por me fazer sentir acolhida como uma filha, por todo apoio e suporte durante o projeto e por ser positiva diante de todos os obstáculos. Obrigada por continuar me orientando e me ajudar a crescer profissionalmente como cientista.

Agradeço a todos os meus amigos que desde 2016 sempre estiveram ao meu lado na jornada da vida e mesmo a vida nos levando para caminhos diferentes sempre se fazem presentes, seja Rio de Janeiro, Ilhéus ou Nova Zelândia.

Agradeço a todas as meninas do LAMON por toda a parceria e companheirismos, obrigada por deixarem os meus dias mais alegres e obrigada por me ajudarem a construir lembranças lindas. Em especial, agradeço à minha querida amiga Laís Pinheiro que compartilha comigo pensamentos, perrengues, alegrias, choros e surtos desde a nossa graduação. Obrigada pela parceria, a nossa amizade é para a vida.

Agradeço as novas amigas Isabely, Nádia e Beatriz, e as não tão novas também Érica Romão por todo o carinho, ajuda e cumplicidade.

Agradeço a todos os envolvidos no projeto, principalmente a minha Coorientadora professora Dra. Karen Brajão de Oliveira por gentilmente ter cedido matérias para o meu projeto e agradeço as meninas do LAGMI pelo carinho, ajuda e paciência. Agradeço também a patologista Dra. Alda Fiorina Maria Losi Guembarovski por fazer a leitura de todas as lâminas, sendo assim possível a realização desse projeto.

Francelino, A.L. **Investigação de variantes alélicas polimórficas no eixo quimiocina receptor *CXCL12/CXCR4* e da imunomarcção de *CXCR4* em amostras tumorais malignas de próstata metastáticas e não metastáticas.** 2023. 69 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, 2023.

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia maligna que mais acomete os homens e no Brasil é uma das maiores causas de morte em indivíduos que desenvolvem tumores malignos. A doença possui maior incidência a partir dos 65 anos e pode ser detectada através da alteração dos níveis séricos do Antígeno Prostático Específico (PSA) e do toque retal. Comumente, os sintomas estão presentes apenas no estágio avançado ou na presença de metástases. Sabe-se que o eixo quimiocina ligante *CXC Motif 12*/Receptor de quimiocina *CXC Motif 4* (*CXCL12/CXCR4*) está envolvido em vias de sobrevivência e migração celular, sendo importante no processo de metástase e podendo constituir um bom marcador no câncer. Variantes alélicas polimórficas podem alterar a expressão gênica e/ou a proteína das respectivas moléculas. Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a frequência das variantes polimórficas rs2228014 (*CXCR4*) e rs1801157 (*CXCL12*) e a imunomarcção da proteína *CXCR4* como candidatos a marcadores de prognóstico e metástase no CaP. As amostras (n=60) foram separadas em grupos prognósticos (com e sem metástase ao diagnóstico) e a imunomarcção avaliada por imunohistoquímica indireta. A genotipagem foi feita por reação em cadeia da polimerase seguida por restrição enzimática (PCR-RFLP). Houve associação significativa entre o alelo C rs2228014 (*CXCR4*) e presença de extensão extraprostática (p=0,043). Com relação a imunomarcção de *CXCR4*, observou-se uma predominância de marcação fraca e citoplasmática e uma diferença significativa entre o tecido tumoral maligno *versus* não tumoral adjacente (p=0,041), com maior expressão da proteína no tecido tumoral. Observou-se ainda uma associação significativa entre a marcação no tumor com estadiamento TNM (p=0,023) e valores de PSA (p=0,029). Nenhuma das variantes alélicas interferiu na imunomarcção tumoral de *CXCR4*. Os grupos prognósticos não diferiram quanto à frequência das variantes alélicas e nem quanto ao perfil de imunomarcção. De acordo com o observado no presente estudo, o receptor *CXCR4* parece não ser o principal responsável por um pior prognóstico ou pela metástase no CaP, mas pode possuir um papel na carcinogênese prostática, que merece investigações futuras.

Palavras-chave: polimorfismo genético; prognóstico; metástase; imunohistoquímica.

Francelino, A.L. **Investigation of polymorphic allelic variants in the chemokine receptor *CXCL12/CXCR4* axis and CXCR4 immunostaining in metastatic and non-metastatic prostate cancer samples.** 2023. 69 p. Dissertation presented to the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, at the State University of Londrina, as a requirement for obtaining the Master's degree, 2023.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is a malignant neoplasm that most affects men and is one of the leading causes of death in Brazil in individuals who develop a malignant tumor. The disease occurs more frequently after the age of 65 and can be detected by a change in the serum level of Prostate Specific Antigen (PSA) and a digital rectal examination. Usually, symptoms are present only in the advanced stages or in the presence of metastases. The chemokine ligand *CXC Motif 12*/chemokine receptor *CXC Motif 4* (*CXCL12/CXCR4*) axis is known to be involved in cell survival and migration pathways, thus playing an important role in metastasis and being able a good marker in cancer. Polymorphic allelic variants can alter gene expression and/or the associated protein. In this context, the aim of the present study was to evaluate the frequency of the polymorphic variants rs2228014 (*CXCR4*) and rs1801157 (*CXCL12*) and immunostaining of CXCR4 protein as candidates for prognostic markers and metastasis in PCa. The samples (n=60) were divided into patient groups (with and without metastasis at diagnosis), and the immunostaining was evaluated by indirect immunohistochemistry. Genotyping was performed by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme (PCR-RFLP). There was a significant association between polymorphic allele C rs2228014 (*CXCR4*) and the presence of extraprostatic expansion (0.043). Weak and cytoplasmic staining predominated in CXCR4 immunostaining, as well as a significant difference between malignant versus non-tumor adjacent tumor tissue (p=0.041), with higher expression of the protein in tumor tissue. In addition, a significant association was found between tumor labeling with TNM staging (p=0.023) and PSA level (p=0.029). None of the allelic variants interfered with CXCR4 tumor immunostaining. The prognostic groups did not differ in the frequency of allelic variants or in the immunostaining profile. According to what was observed in the present study, the CXCR4 receptor does not seem to be the main pathway responsible for PCa worst prognosis or metastasis, but may play a role in prostate carcinogenesis, which should be considered in the future.

Key-words: genetic polymorphism; prognosis; metastasis; immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Gradação ISUP de acordo com a análise histológica tumoral	19
Figura 2:	Vias de sinalização mediadas pelo eixo <i>CXCL12/CXCR4</i>	24
Figura 3:	Perfil de fragmentos eletroforéticos para as variantes alélicas dos genes <i>CXCL12</i> (rs1801157) e <i>CXCR4</i> (rs2228014)	32
Figura 1:	Perfil de imunomarcção da proteína CXCR4 pela técnica imunohistoquímica indireta em tecidos tumorais malignos de mama (controle positivo) e próstata.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Classificação ISUP de estratificação tumoral para o CaP	18
Tabela 2:	Classificação de risco para direcionamento do tratamento do CaP.....	21
Tabela 1:	Distribuição dos genótipos das variantes alélicas rs1801157 (<i>CXCL12</i>) e rs2228014 (<i>CXCR4</i>) entre os grupos prognósticos	42
Tabela 2:	Análises de associação e correlação entre as variantes alélicas rs1801157(<i>CXCL12</i>) e rs2228014 (<i>CXCR4</i>) e parâmetros prognósticos dos pacientes com CaP	43
Tabela 3:	Distribuição do perfil de imunomarcção de CXCR4 entre os grupos prognósticos.....	44
Tabela 4:	Comparação entre parâmetros prognósticos e perfil de imunomarcção de CXCR4 nas amostras de tecidos tumorais malignos dos pacientes com CaP	46
Tabela 5:	Análises de comparação entre as variantes polimórficas de <i>CXCL12</i> e <i>CXCR4</i> e a imunomarcção proteica de CXCR4 em amostras de tecidos tumorais de pacientes com CaP.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Sistema de estadiamento TNM para o câncer de próstata	20
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIACOES

ADT	Terapia de privação androgênica
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CaP	Câncer de próstata
<i>CXCL12</i>	Quimiocina ligante <i>CXC Motif 12</i>
<i>CXCR4</i>	Receptor de quimiocina <i>CXC Motif 4</i>
DAB	Cromgeno diaminobenzidina
DNA	cido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EG	Escore de Gleason
GPCR	Receptores acoplados  proteína G
GDP	Grupo guanlico guanosina difosfato
GTP	Grupo guanlico guanosina trifosfato
HE	Eosina/Hematoxilina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HRP	Enzima peroxidase de rábano
HPV	Papilomavírus Humano
IGRT	Radioterapia guiada por imagem
IHQ	Imunohistoquímica
ISUP	Sociedade Internacional de Patologistas Urológicos
LAMON	Laboratório de Mutagênese e Oncogenética
LMA	Leucemia Mielóide Aguda

MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MP	Melhor prognóstico
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NRSF	Fator silenciador restritivo de neurônios
PBS	Tampão fosfato-bicarbonato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PLC-β	Fosfolipase C-β
PI3K	Fosfatidilinositol-3-OH quinase
PPSM	Pior prognóstico sem metástase ao diagnóstico
PPCM	Pior prognóstico com metástase ao diagnóstico
PSA	Antígeno prostático específico
<i>PTEN</i>	Fosfatase homóloga à tensina
RXRA	Receptor alfa do retinóide X
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
Sox	Fator de transcrição SOX
<i>Taq</i>	DNA polimerase termoestável
TCGA	<i>The human protein atlas</i>
TNM	Sistema tumor-nódulo-metástase
<i>TP53</i>	Proteína de tumor P53
TRUS	Ressonância magnética guiada por ultrassom transretal
USGTR	Ultrassonografia transretal
3' UTR	Sequências flanqueadoras localizadas no final da sequência codificadora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1	Câncer de próstata e seus fatores de risco	14
2.2	Diagnóstico e tratamento do câncer de próstata.....	16
2.3	Eixo quimiocina receptor CXCL12/CXCR4.....	22
2.4	Polimorfismos rs1801157 (CXCL12) e rs2228014 (CXCR4).....	25
2.5	O processo de metástase no câncer	27
3	METODOLOGIA	28
3.1	Seleção das amostras.....	28
3.2	Imunohistoquímica (IHQ) de CXCR4.....	29
3.3	Genotipagem.....	30
3.4	Análise estatística	32
4	OBJETIVOS	34
4.1	Objetivo geral.....	34
4.2	Objetivos específicos.....	34
1	CAPÍTULO 1.....	35
	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	57
	CONCLUSÕES.....	58
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS.....	66
	ANEXO A – Aprovação pelo comitê de ética envolvendo pesquisa com seres humanos da UEL.....	66
	ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	67

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é considerado um problema de saúde mundial pois é um câncer que apresenta alta incidência, sendo um dos tipos que mais acomete os homens mundialmente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022a). Além disso, no Brasil é considerado uma das maiores causas de morte em homens que desenvolvem tumores malignos (INCA, 2022a).

É uma doença de etiologia multifatorial que se desenvolve lentamente. Por muitas vezes se comportar de forma indolente alguns pacientes são diagnosticados após os 65 anos – fase em que os sintomas se manifestam – pois o câncer já se encontra em estágio avançado (INCA, 2022b). Mesmo o CaP sendo considerado de melhor prognóstico quando detectado precocemente e possuindo formas de detecção eficazes, existem obstáculos que dificultam a identificação das formas mais agressivas da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022b; INCA, 2022b).

Os sintomas, como incontinência urinária e sangue na urina, normalmente aparecem nos estágios avançados do desenvolvimento tumoral ou quando a doença se encontra em fase de metástase. Essa fase é caracterizada pelo alto desequilíbrio dos processos de crescimento e proliferação celular que acabam resultando na migração das células tumorais para tecidos adjacentes, agravando o quadro da doença (PIERCE, 2016). Existem medidas terapêuticas distintas para cada fase em que o tumor maligno se encontra, como por exemplo a castração cirúrgica, uso de radioterapia ou de terapia de privação hormonal. Dessa forma, torna-se fundamental a detecção das formas agressivas para que o tratamento dos pacientes seja melhor direcionado (PONTE, 2021).

Alguns dos métodos de triagem para rastreamento do CaP são exame de toque retal e detecção de níveis séricos do antígeno prostático específico (PSA), que é uma proteína presente naturalmente no sangue, sendo utilizada como biomarcador. Caso algum desses testes apresentem anormalidade são recomendados exames adicionais, como a biópsia, para confirmação ou não de malignidade. Porém, esses testes não têm 100% de precisão, podendo apresentar resultados falso-positivos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022b).

Ao longo dos anos foram desenvolvidas diversas pesquisas relacionadas à busca de biomarcadores que possam atuar na detecção precoce e no tratamento de doenças, como o câncer. Diferentes técnicas como a imunohistoquímica (IHQ), que utiliza

anticorpos para identificar antígenos *in situ* (FERRO, 2014), e a reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica fragmentos específicos de DNA, permitem a busca por novos marcadores candidatos (PIERCE, 2016) e constituem ferramentas importantes atualmente na Oncologia Molecular.

Sabe-se que o eixo quimiocina ligante *CXC Motif 12/Receptor* de quimiocina *CXC Motif 4* (CXCL12/CXCR4), constituído pela quimiocina – atuante como quimiorreceptor e o receptor de membrana que está associado a ativação de vias sinalizadoras (BIANCHI; MEZZAPELLE, 2020) –, está envolvido na sobrevivência celular e desempenha um papel na tumorigênese e na migração, sendo um fator de influência no processo de metástase (BUSILLO; BENOVIC, 2007). Dessa forma, apresenta grande relevância como alvo de estudo no câncer, podendo auxiliar como indicador prognóstico em tumores com potencial metastático, como o CaP.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER DE PRÓSTATA E SEUS FATORES DE RISCO

O CaP é a neoplasia maligna de maior incidência entre os homens, sem levar em conta os tumores de pele não melanoma. Pode-se afirmar que é o câncer da terceira idade masculina, pois a maioria dos casos mundiais ocorrem a partir dos 65 anos (MIGOWSKI; SILVA, 2010). Para o ano de 2023 estima-se 72 mil novos casos no Brasil, o que corresponde a (10,2%) da incidência de câncer em homens (INCA, 2022a). Além disso, o CaP é o câncer que representa a terceira maior incidência mundial (7,3%) em homens (SUNG et al. 2022).

De acordo com o Instituto Nacional de Saúde - NIH (2022), estimam-se que 14,0% dos novos casos de câncer sejam em próstata e que a taxa de mortalidade seja em torno de 5,7%. Portanto é uma doença crescente em todo o mundo e pode ser encontrada em todos os continentes. Em muitos países essa neoplasia é comum e considerada como uma das principais causas de morte decorrentes de câncer. As maiores taxas de incidência mundial são encontradas na África, seguida da América do Norte, Europa e Ásia. Enquanto as taxas de mortalidade se apresentam maiores em países de baixa renda, incluindo África subsaariana, Caribe e América do Sul (HAAS et al., 2008; CENTER et al., 2012).

Os maiores índices de mortalidade por CaP são encontrados em homens de ascendência africana devido a maior produção de testosterona. A partir disso, com base em dados epidemiológicos, as pesquisas inferem que a incidência desse câncer pode ocorrer pela relação entre raça, etnia e localização geográfica do indivíduo, pois homens de países com menos desenvolvimento tendem a serem diagnosticados tardiamente devido ao baixo rastreamento da doença pelo sistema de saúde (REBBECK, 2017; CDC, 2021). Outro fator importante é a idade, pois segundo Chan, Stampfer e Giovannucci (1998), homens brancos com idade entre 75 e 79 anos possuem elevadas chances de desenvolver CaP quando comparados aos com idades entre 45 e 49 anos. Um trabalho mais recente também afirma que indivíduos pertencentes à faixa etária de 60 a 69 anos são os que apresentam altas chances de serem acometidos pela doença (REGO et al., 2020). Esses estudos evidenciaram que o rastreamento da doença favorece o diagnóstico precoce que, por consequência, pode auxiliar na antecipação do tratamento dos pacientes com CaP.

O histórico familiar é outro fator de risco importante pois quando o indivíduo possui familiares já diagnosticados com a doença, as possibilidades de desenvolvimento do CaP aumentam de 3 a 10 vezes quando comparados a demais indivíduos que não possuem essa relação. Considerando que o estilo de vida e fatores genéticos também influenciam nessa probabilidade (MEDEIROS; MENEZES; NAPOLEÃO, 2011). O risco também depende de qual membro da família é afetado, pois dentro da relação de parentesco, possuir um irmão com CaP representa maiores chances de incidência quando comparado a ter o pai com a doença (KICIŃSKI; VANGRONSVELD; NAWROT, 2011; CDC, 2021).

Alterações genéticas influenciam no desenvolvimento da doença, pois alguns genes exercem funções reguladoras do ciclo celular, apoptose, angiogênese dentre outros. Sabe-se que alterações na proteína de tumor P53 (*TP53*) e fosfatase homóloga à tensina (*PTEN*) estão relacionados ao aumento da progressão, incidência e agressividade do CaP (GARCÍA-PERDOMO; ZAPATACOPETE; SÁNCHEZ, 2018). A expressão de hormônios e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) também estão envolvidos com o aparecimento desta neoplasia. Estudos sugerem que a identificação de polimorfismos tem grande importância para o avanço no desenvolvimento de novas alternativas de detecção precoce da doença (VIANA, N.I. 2017; SALDANHA, E. L. D. D. 2018). Dessa forma é fundamental ressaltar a importância dos estudos que buscam investigar quais

fatores podem influenciar na carcinogênese, a fim de auxiliar no direcionamento do tratamento.

2.2 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

O CaP normalmente se desenvolve de forma assintomática, mas pode ser rastreado precocemente. Os métodos de triagem conhecidos são os exames de toque retal, do antígeno prostático específico (PSA) e da ultrassonografia transretal (USGTR) (DORNAS et al., 2008; EL BAROUKI, 2012).

Assim, um dos exames de rotina utilizado na detecção do CaP é o teste do PSA. Por se tratar de uma molécula produzida naturalmente pelo tecido prostático é considerado um marcador tumoral importante. Com o passar da idade ocorre o aumento da próstata e por consequência os níveis de PSA se elevam. Em células tumorais o nível sérico de PSA está acima dos valores considerados normais, sendo um parâmetro utilizado na detecção do CaP (DORNAS et al., 2008; ADHYAM; GUPTA, 2012).

O teste é feito por meio da avaliação do nível de PSA (ng/mL) presente no sangue do paciente e o parâmetro utilizado é 4ng/mL. Alguns fatores podem influenciar no aumento dos níveis de PSA no sangue, tais como: hiperplasia prostática benigna (HPB) condição caracterizada pelo aumento da próstata, porém não cancerosa; envelhecimento sem anormalidades na próstata ou prostatite (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022b). Dessa forma, valores superiores a 10 ng/mL é indicativo de tumor, intervalo limítrofe de 4 a 10 ng/mL indica chances de desenvolvimento de câncer de próstata e valores limites até 4 ng/mL são aceitos como normais, porém alguns tumores apresentam PSA abaixo desse valor (BRASIL, 2002; EL BAROUKI, 2012; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022b). Portanto, valores acima de 4 ng/mL podem ser indicativos de alterações na próstata, sendo necessário o auxílio de demais métodos de triagem para sua confirmação (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022b).

O exame do toque retal é feito pelo urologista e possui alto valor preditivo e permitindo a avaliação da glândula, porém, não em sua totalidade, sendo necessária a biópsia prostática em caso de suspeita de alteração (SOUZA; SILVA; PINEIRO, 2011). Existem diferentes tipos de biópsia que podem ser guiadas por ultrassom ou ressonância magnética, alguns exemplos são: percutânea, transperineal e guiada por ultrassom

transretal (TRUS) (NCCN, 2020). A TRUS é a mais usada para a biópsia prostática cuja função é mapear a próstata e detectar tumores em estágios iniciais. É realizada de forma rápida e segura (SANTOS; MILITO; MARCHIORI, 2006). Possui um papel importante na confirmação histopatológica, sendo eficaz em programas de rastreamento que buscam a detecção precoce do CaP, pois através de microagulhas são retirados 12 fragmentos do tecido para posterior análise (MILITO, 2013).

O diagnóstico é feito através de estudos histopatológicos dos tecidos prostáticos obtidos por meio da biópsia (BRASIL, 2002). A avaliação de estágio da doença consiste no uso do Escore de Gleason (EG) que avalia a agressividade tumoral, uso do Sistema de Estadiamento Tumor Nódulo Metástase (TNM), para classificação e estadiamento do tumor (BRASIL, 2002; DORNAS et al., 2008), e o sistema *ISUP grading system* que atua em conjunto ao EG (EPSTEIN et al., 2016).

O método original de classificação utilizado era o EG que de forma comparativa infere a agressividade do tumor. Para a avaliação são analisados parâmetros histopatológicos que caracterizam a diferenciação das células e subsequente gradação do tecido tumoral de 1 a 5 (EPSTEIN et al., 2016). Para alcançar o escore final é necessário que seja feita a gradação das duas áreas mais abundantes do tumor, para então somar os resultados. Anteriormente, escores com valores de 8 a 10 indicavam maior letalidade e recorrência após tratamento primário, já valores de 2 a 6 indicavam menores chances. Gleason de valor 7 era um valor intermediário, pois pode decorrer das somas 4 + 3, associando-se a um escore mais agressivo, ou 3 + 4, associando-se a um escore menos agressivo (LÖBLER et al., 2012).

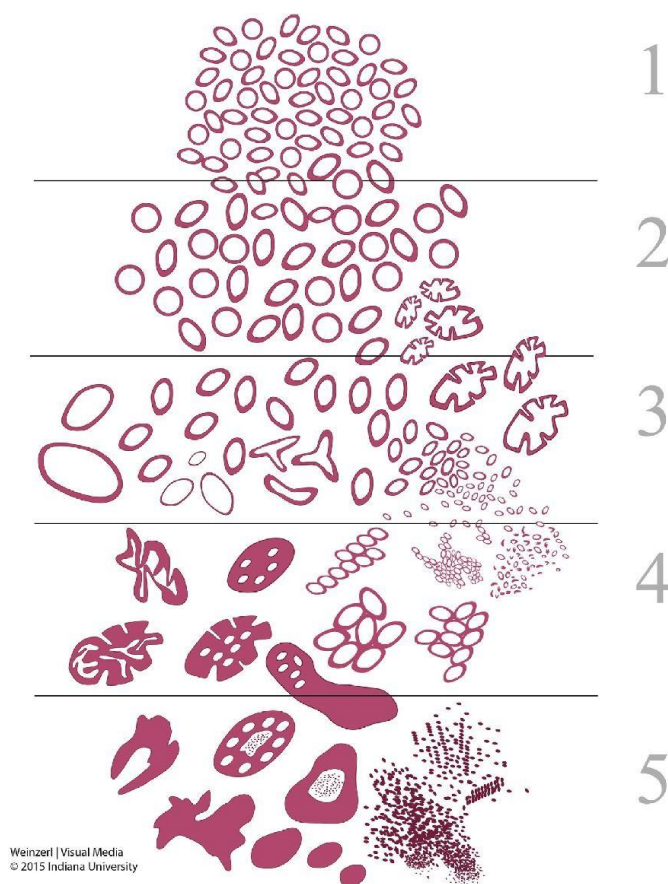
Porém esse método veio sofrendo alterações ao longo dos anos, até que em 2014 foi realizada uma conferência pela Sociedade Internacional de Patologistas Urológicos (ISUP) e um novo sistema foi estabelecido, denominado *ISUP grading system*, que possui uma melhor estratificação tumoral permitindo uma classificação mais precisa que auxilia no direcionamento do tratamento do CaP de forma mais eficaz. A gradação continua sendo feita de 1 a 5, porém as características histopatológicas correspondentes foram modificadas (Figura 1), e a classificação ocorre da mesma forma comparativa seguido da soma das duas áreas mais abundantes, porém os escores foram modificados (Tabela 1) (EPSTEIN et al., 2016)

Tabela 1: Classificação ISUP de estratificação tumoral para o CaP.

Grau Grupo 1 (escore de Gleason 6 = 3+3)	Apenas glândulas bem formadas discretas individuais
Grau Grupo 2 (escore de Gleason 3+4=7)	Glândulas predominantemente bem formadas com menor componente de glândulas mal-formadas/fundidas/cribiformes
Grau Grupo 3 (escore de Gleason 4+3=7)	Glândulas predominantemente mal-formadas/fundidas/cribiformes com menor componente de glândulas bem formadas
Grupo Grau 4 (escore de Gleason 4+4=8; 3+5=8; 5+3=8)	Apenas glândulas mal-formadas/fundidas/cribriformes ou Glândulas predominantemente bem formadas e glândulas sem componente menor ou Glândulas predominantemente ausentes e componente menor de glândulas bem formadas
Grau Grupo 5 (escore de Gleason 9-10)	Falta de formação de glândulas (ou com necrose) com ou sem glândulas mal-formadas/fundidas/cribiformes

Fonte: EPSTEIN et al., 2016.

Figura 1: Gradação ISUP de acordo com a análise histológica tumoral.



Fonte: Adaptado de SRIGLEY et al., 2019. Graus de diferenciação celular do tecido tumoral prostático: 1 - Células uniformes e pequenas, glândulas regulares com pouca variação e distribuídas homogêneas. 2 - Variação no tamanho e forma, glândulas uniformes, frouxamente agrupadas e com bordas irregulares. 3 - Glândulas discretas, bem formadas, de tamanho variável, (microcísticas e pseudo-hiperplásicas), sem glândulas cribriformes, 4 - Glândulas cribriformes, malformadas, fundidas ou glomeruloides, 5 - Células individuais, cordões, arranjos lineares e agrupamentos sólidos (Adaptado de EPSTEIN, 2018).

O estadiamento para o CaP é feito através do sistema TNM que corresponde a T= tumor primário, N= linfonodos regionais e M= metástase a distância. Sua função é avaliar o tamanho do tumor e se ocorreu extravasamento para outras partes do corpo, portanto, o tumor pode se encontrar localizado (confinado à próstata); localmente avançado (áreas próximas à próstata) ou avançado (outras partes do corpo). (DORNAS et al., 2018). Além disso, o sistema TNM é referência para prognósticos, gerenciamento da doença, registro de dados, auxiliar em ensaios clínicos e investigação (PANER et al., 2018). O estadiamento ocorre de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1: Sistema de estadiamento TNM para o câncer de próstata.

T – Tumor primário		
T1	TX	O tumor primário não pode ser avaliado
	T0	Sem evidência do tumor primário
	Tumor clinicamente não palpável ou visível por método de imagem	
	T1a	Tumor incidental – Tumor em 5% ou menos do tecido ressecado
	T1b	Tumor incidental – Tumor em mais de 5% do tecido ressecado
	T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha (PSA elevado mas tumor não palpável ao toque)
	T2	Tumor confinado à próstata
	T2a	Tumor compromete até metade de um lobo, ou menos
	T2b	Tumor compromete mais da metade de um lobo, porém não ambos os lobos
	T2c	Tumor compromete ambos os lobos
T3	Tumor além da cápsula prostática	
	T3a	Extensão extraprostática (unilateral ou bilateral); inclui comprometimento microscópico do colo vesical
	T3b	Tumor invade a(s) vesícula(s) seminal(is)
T4	Tumor fixo ou invade estruturas adjacentes além das vesículas seminais colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores ou parede pélvica	
N – Envolvimento linfonodal regional		
	Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
	N0	Sem metástase em linfonodos regionais
	N1	Metástases linfonodais regionais
M – Metástases a distância		
	M0	Ausência de metástase a distância
	M1	Metástase a distância
	M1a	Linfonodos não regionais
	M1b	Ossos
	M1c	Outras localizações

Fonte: AJCC Cancer Staging Manual, 2017.

A partir da combinação de todos esses parâmetros é possível inferir o risco geral da doença, ou seja, a avaliação permite classificar os indivíduos em grupos de risco e auxiliar na escolha do tratamento. Os grupos de risco são: muito baixo, baixo, intermediário, alto, muito alto (NCCN, 2020).

Tabela 2: Classificação de risco para direcionamento do tratamento do CaP.

	Risco muito baixo	Risco baixo	Risco intermediário	Risco alto	Risco muito alto
Estadiament o	T1c	T1 a T2a	T2b ou T2c	T3a	T3b a T4
PSA	< 10 ng/mL	< 10 ng/mL	10,01<PSA<2 0 ng/mL	> 20,01 ng/mL	> 20,01 ng/mL
ISUP	Grau 1	Grau 1	Grau 2 ou 3	Grau 4 ou 5	Grau 4 ou 5

Fonte: NCCN, 2020.

Dessa forma é fundamental que seja feita uma vigilância ativa e individual visando evitar tratamentos desnecessários, por outro lado, se a doença grave é diagnosticada precocemente as chances de tratamento são maiores. Portanto, para que o tratamento seja administrado de forma correta é necessário considerar a idade – acima dos 50 anos ou acima de 45 com histórico familiar –, níveis séricos de PSA e classificações histopatológicas – ISUP, TNM (MOTTET et al., 2020).

Os tratamentos mais indicados são prostatectomia radical que consiste na retirada total da glândula, cujo objetivo é a erradicação da doença; radioterapias sendo a radioterapia guiada por imagem (IGRT), atualmente a terapia mais indicada, e terapia hormonal que consiste na privação andrógênica (MOTTET et al., 2020). Para pacientes com baixo risco o recomendado é a vigilância ativa; para o grupo de risco intermediário, após análise caso a caso, os tratamentos indicados são prostatectomia radical e radioterapia, além da vigilância ativa. Por fim, para o grupo de alto risco são recomendados prostatectomia radical, radioterapia associados a terapia de privação androgênica (ADT) já que nesse grupo as chances de desenvolvimento de metástase são maiores (MOTTET et al., 2020). De modo geral, todos os tratamentos visam manter o controle oncológico e garantir a melhor qualidade de vida possível ao paciente (DAMIÃO et al., 2015).

Sabe-se que o CaP é uma doença complexa e de etiologia multifatorial. Dessa forma, a comunidade científica busca ressaltar a importância de estudos que encontrem novos marcadores tumorais mais específicos.

2.3 EIXO QUIMIOCINA RECEPTOR CXCL12/CXCR4

O eixo quimiocina/receptor é composto pelas moléculas CXCL12 e CXCR4, respectivamente. O gene *CXCL12* está localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q11.21) e sua função é codificar a quimiocina de mesmo nome, que foi descoberta a partir de células derivadas da medula óssea e identificada como fator de crescimento de células pré-B (SHIROZU et al., 1995). O gene *CXCR4* está localizado no cromossomo 2q2 (FEDERSPIEL et al., 1993) e codifica a proteína de membrana que atua como receptor de CXCL12, mediando a migração celular por quimiotaxia (ZLOTNIK, 2004).

As quimiocinas são citocinas de baixo peso molecular e podem desempenhar funções pró inflamatórias induzindo respostas imunes em locais de infecção ou homeostáticas, participando do controle de migração celular ou manutenção dos tecidos (PALOMINO; MARTI, 2015). E estão divididas em famílias com base no arranjo de resíduos de cisteína N-terminal: quimiocinas C, CC, CXC e CX3C (STRIETER et al. 1995), sendo a quimiocina ligante *CXC Motif 12* (CXCL12) pertencente ao grupo de quimiocinas CXC (PALOMINO; MARTI, 2015).

Os receptores de quimiocinas são proteínas que pertencem à superfamília dos 7 domínios transmembranares (POZZOBON et al 2016), caracterizados pela presença de um terminal amino extracelular, 7 hélices α hidrofóbicas que atravessam a membrana e um terminal carboxílico citoplasmático (SHENOY, 2007), sendo classificadas como receptores acoplados à proteína G (GPCR) que é uma molécula que se encontra ligada a um receptor transmembrana e ao serem estimuladas, via receptor, são responsáveis pela ativação de transdução de sinais promovendo eventos intracelulares. São compostas por 3 subunidades polipeptídicas denominadas: α , β e γ que interagem com grupos guanílicos guanosina difosfato (GDP) e guanosina trifosfato (GTP), e são classificadas em três isoformas de acordo com as características da subunidade α – Gs, Gq e Gi. Após a interação entre o ligante e a GPCR, intracelularmente, ocorre a transformação de GDP em GTP ativando a proteína G através da uma mudança conformacional na estrutura da subunidade α que resulta no início das sinalizações intracelulares de regulação de vias

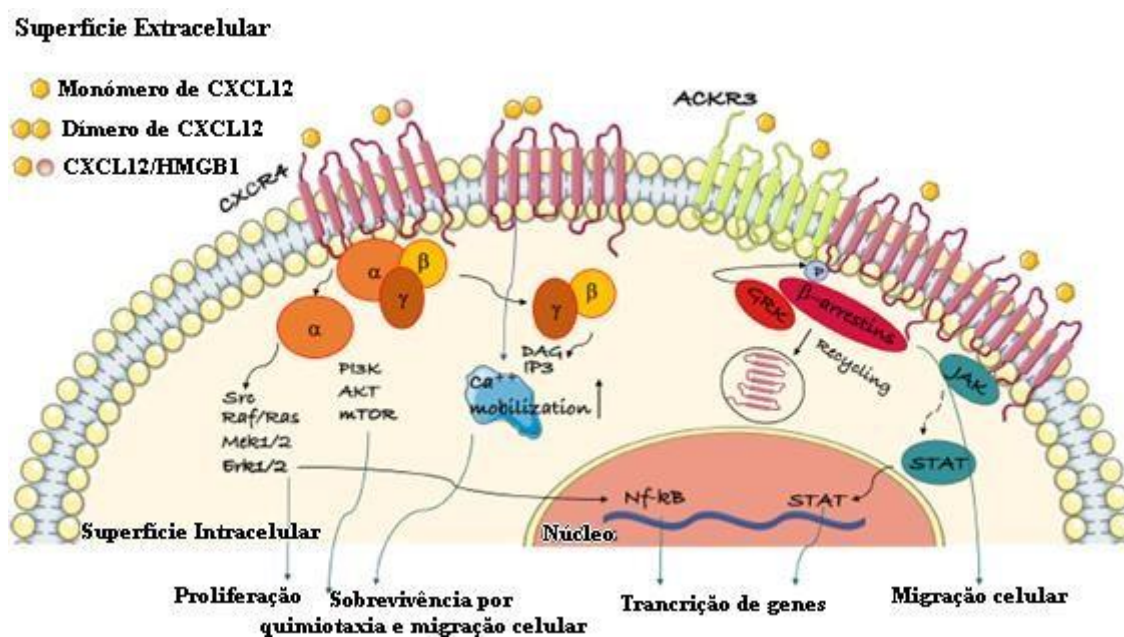
como a de sobrevivência, proliferação e diferenciação, por meio da expressão de genes associados (DE MOURA; VIDAL, 2011). O receptor de quimiocina *CXC Motif 4* (CXCR4) pertence ao grupo de receptores GPCR (PALOMINO; MARTI, 2015).

Quando o CXCL12 se liga ao CXCR4 ocorre uma mudança de conformação da proteína G dando início às cascatas de sinalização. Ocorre a dissociação das subunidades α e $\beta\gamma$ que por sua vez, ativa as enzimas fosfolipase C- β (PLC- β) e fosfatidilinositol-3-OH quinase (PI3K), cuja função é promover a transdução de sinais. Dentro da cascata, PLC- β atua ativando outras enzimas que contribuem para a migração celular, já PI3K auxilia na ativação de moléculas que promovem a reorganização do citoesqueleto de actina e alterações necessárias para a migração celular, além de ativar a via AKT que é fundamental na sobrevivência das células tumorais. (CHATTERJEE, 2014) (Figura 2).

A interação que ocorre entre ligantes/receptores GPCR estão envolvidas, especificamente, em processos que direcionam o movimento celular, a entrada e saída da célula de tecidos específicos no desenvolvimento embrionário, e os eventos de metástase e invasão tumoral. Dessa forma, CXCL12/CXCR4 atuam em conjunto ativando vias de sinalização diversas (BIANCHI; MEZZAPELLE, 2020) que resultam em respostas como sobrevivência e proliferação celular (CHATTERJEE, 2014).

CXCL12 desempenha funções importantes nos processos de angiogênese, além de atuar em processos inflamatórios. O fato de ser uma quimiocina presente em microambientes tumorais e atuar como ligante de CXCR4 promovendo quimiotaxia, favorece a hipótese de que esses dois componentes estão envolvidos no processo de metástase, como na medula óssea (NGUYEN; BOS; MASSAGUÉ, 2009). Além disso, Janssens e colaboradores (2018), apontam que o desequilíbrio na interação com seu receptor CXCR4 pode alterar a homeostase. Dessa forma, estudos envolvendo o eixo CXCL12/CXCR4 são de grande interesse, pois mostram que ele está envolvido em processos de sinalização, hematopoiese, organogênese e vascularização.

Figura 2: Vias de sinalização mediadas pelo eixo CXCL12/CXCR4.



Fonte: Vias de sinalização mediadas pelo eixo CXCL12/CXCR4. A ligação da quimiocina CXCL12 ao receptor CXCR4 ativa as subunidades da proteína G e a mobilização de Ca²⁺ a jusante, ativa as vias PI3K/Akt, PLC e ERK1/2. Isso resulta na transcrição de genes, migração celular, proliferação e sobrevivência. A oligomerização do CXCR4 também pode ativar a via JAK/STAT independente da proteína G. As b-arrestinas são recrutadas após a fosforilação GRK de CXCR4 e medeiam sua internalização. ACKR3 é outro receptor para CXCL12 que pode induzir a sinalização mediada por b-arrestina tanto por si só ou como um heterodímero com CXCR4. (Adaptado de BIANCHI; MEZZAPELLE, 2020).

Por meio da descoberta da superexpressão de CXCR4 em tecidos de câncer de mama – primários e metastáticos –, foi possível posteriormente identificar esse evento em mais de 20 tipos de cânceres incluindo o de próstata (BALKWILL, 2004; CHATTERJEE, AZAD, NIMMAGADDA, 2014). Além disso, a inibição da expressão de CXCR4, através da regulação transcricional, promove redução nas taxas de crescimento tumoral e nesse contexto, estudos apontam que a sua expressão estaria relacionada ao processo de metástase devido a sinalização do eixo CXCL12/ CXCR4 (BUSILLO; BENOVIC, 2007). Fernandis e colaboradores (2004), mostraram que no câncer de mama a ativação de CXCR4, mediada por CXCL12, estimula a produção de metaloproteínas de matriz, facilitando a saída das células tumorais do seu local de origem.

Sendo assim, a relação entre microambiente tumoral e secreção de quimiocinas têm grande relevância no evento de quimiotaxia celular. Dessa forma, células tumorais que expressam CXCR4 são atraídas para locais inflamatórios que secretam CXCL12 e essa interação tem um papel fundamental no processo de metástase sendo de grande

importância no entendimento desse mecanismo e como alvo de estudo em modelos tumorais com capacidade metastática.

2.4 POLIMORFISMOS rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*)

O entendimento de processos moleculares como replicação, transcrição, tradução, expressão gênica, entre outros, se deu por meio do desenvolvimento de técnicas moleculares que revolucionaram as pesquisas no campo da genética. A tecnologia de DNA recombinante é um exemplo, pois permite localizar, isolar e alterar segmentos de DNA. Alguns eventos importantes contribuíram para o avanço da manipulação do material genético. Na década de 60, por exemplo, foram descobertas as enzimas de restrição, cuja função é reconhecer e clivar a fita dupla de DNA em sequências específicas de nucleotídeos. Além disso, ocorreu o isolamento da *Taq polymerase* (DNA polimerase termoestável) e em 1983 o desenvolvimento da técnica PCR que permite a amplificação de fragmentos específicos de DNA. Dessa forma, o desenvolvimento dessas técnicas possibilitou a busca por marcadores candidatos de interesse para doenças (PIERCE, 2016), como o câncer.

Sabe-se que alguns genes podem apresentar variantes genéticas e desde essa descoberta tem se pesquisado a respeito de possíveis relações entre as variantes alélicas e o seu papel no desenvolvimento de doenças (GUERGNON; COMBADIÈRE, 2012). Nesse contexto, os SNPs têm sido alvo de estudos, pois podem estar envolvidos com o aparecimento e a progressão de diversas doenças, incluindo o câncer (WU et al. 2016). Podem ser definidos como alterações de base única na sequência de DNA, ou seja, são originados a partir da troca de um único nucleotídeo. Estão presentes em mais de 1% da população e pode ser encontrado em regiões codificadoras ou de função regulatória, desse modo a mudança de nucleotídeos em determinada sequência de DNA pode estar associada a algum risco de desenvolvimento de doenças, como por exemplo o câncer (CAETANO, 2009; ARAUJO et al., 2009).

Em um estudo realizado com pacientes portadores de vírus da imunodeficiência humana (HIV), Winkler e colaboradores (1998) identificaram a variação rs1801157(*CXCL12*) na região 3' não traduzida (3'UTR) e a caracterizaram como uma troca de guanina por adenina que tem como consequência o aumento da concentração da quimiocina CXCL12. A partir disso, esse SNP se tornou alvo de estudos de associação.

Como por exemplo no trabalho de Okuyama e colaboradores (2022) que analisaram o papel da variante rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*) no aumento da suscetibilidade à infecção pelo papilomavírus humano (HPV), ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas e câncer cervical, obtendo resultados significativos e sugerindo-a como um potencial biomarcador.

Em 1993, Federspiel e colaboradores, descobriram a variante rs2228014 (*CXCR4*), caracterizada pela troca de uma citosina por uma timina no códon 138. A troca é silenciosa e não altera o aminoácido, mas é uma região onde ocorre a ligação da RNA polimerase II e modificações nos sítios de ligação dos genes fator silenciador restritivo de neurônios (NRSF), receptor alfa do retinóide X (RXRA) e fator de transcrição SOX (Sox) (Haploreg v4.1). Desde então, esse SNPs se tornou alvo de estudo, Okuyama Kishima et al. (2015), revisaram trabalhos envolvendo o polimorfismo rs2228014 (*CXCR4*) no câncer de mama, observando que a expressão de *CXCR4* no tecido tumoral e sua posterior interação com o ligante é complexa, pois fatores como sistema imune e microambiente tumoral são de grande relevância.

Pelo fato da via *CXCL12/CXCR4* estar envolvida na migração celular, estudos de correlações entre as variantes polimórficas dos respectivos genes e alguns tipos de neoplasias têm sido descritos na literatura. Assim, estudos investigativos a respeito do envolvimento da via em metástases de melanoma mostraram que seu bloqueio pode evitar o processo metastático de células quimioresistentes (KIM et al., 2010). Uma revisão a respeito da expressão e função da via em tumores gástricos e seu potencial como alvo terapêutico concluiu que o eixo *CXCL12/CXCR4* desempenha um papel na progressão tumoral, sendo um bom candidato como biomarcador para uso clínico (LEE e JO, 2012). Chen et al. (2015) avaliaram a relação entre os parâmetros prognósticos de pacientes com carcinoma nasofaríngeo e os polimorfismos rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*), encontrando resultados que sugeriram o genótipo homozigoto para o alelo raro de rs1801157 (AA) como um fator prognóstico. Xu et al. (2018) por meio de meta análise avaliaram a relação entre o rs1801157 (*CXCL12*) e o câncer colorretal, concluindo que estudos adicionais com etnias diferentes são necessários para melhor esclarecer o papel desta variante. Guembarovski et al. (2018) analisaram o rs2228014 (*CXCR4*) em pacientes com câncer de mama do subtipo triplo-negativo em busca de um marcador de suscetibilidade, porém não observaram associação significativa entre a presença da variante e uma chance aumentada de desenvolvimento deste subtipo tumoral.

Conforme demonstrado, a literatura apresenta heterogeneidade de resultados, ressaltando a necessidade de mais investigações a respeito destes polimorfismos em diferentes tumores malignos, portanto o CaP constitui um modelo interessante devido ao seu potencial metastático.

Em termos de pesquisa, a técnica IHQ atualmente é considerada uma técnica padrão ouro para diagnóstico na oncologia, pois permite correlacionar o tecido histológico a um marcador em questão, sendo possível obter um perfil de imunomarcção que auxilia na escolha do tratamento e na conduta clínica (DE FREITAS VIZECHI et al., 2016), dessa forma é possível obter um perfil de imunomarcção que auxilie na determinação prognóstica, na escolha do tratamento e na conduta clínica, também. Portanto a IHQ é uma ferramenta que tem sido utilizada em investigações na busca por novos marcadores para o câncer. Como exemplo, Zhang e colaboradores (2018) concluíram que foi encontrada expressão de CXCR4 em tumores de próstata e que ela pode estar relacionada à invasão perineural. Mai et al. (2019) correlacionaram positivamente altas expressões do receptor com neoplasias malignas neuroendócrinas. Estudos apontam ainda que a avaliação da imunomarcção de CXCR4 tem alto valor prognóstico em melanomas primários (SCALA et al., 2005) e em tumores pancreáticos (GEBAUER et al., 2011).

Dessa forma, a análise simultânea de SNPs em *CXCR4* e *CXCL12*, associadas à avaliação do perfil de imunomarcção de CXCR4 em amostras de pacientes com CaP, possui relevância científica e pode ajudar a compreender o papel deste eixo quimiocina/receptor no processo metastático e na carcinogênese da próstata.

2.5 O PROCESSO DE METÁSTASE NO CÂNCER

Durante o processo de carcinogênese alguns mecanismos de regulação são perdidos resultando na proliferação e crescimento celular anormal, originando uma massa celular constituída por células indiferenciadas que por sua vez é denominada de tumor maligno. Uma vez que o CaP se desenvolve as chances de progressão para o estágio de metástase são grandes e esse fenômeno consiste na principal causa de morte decorrente do câncer (PIERCE, 2016).

Para que a metástase ocorra é necessário que o tumor passe pelas etapas de invasão local, intravasamento, sobrevivência na circulação, extravasamento e colonização. Dessa

forma as células tumorais migram do tecido de origem e se instalam em tecidos distantes, levando em consideração eventos genéticos e epigenéticos que culminam em comportamentos tumorais distintos (NGUYEN; BOS; MASSAGUÉ, 2009).

Sabe-se que as células malignas se desprendem do tumor primário devido a perda da capacidade de adesão que as mantém unidas entre si e à matriz extracelular. Em seguida, ocorre a invasão direta das células na corrente sanguínea, que ao entrarem na circulação seguem o fluxo até encontrar um novo local de proliferação (ALBERTS et al., 2017). Dentro deste contexto, o eixo CXCL12/CXCR4 é conhecido por ter um papel importante nos processos de migração celular. Partindo desse conhecimento, busca-se o entendimento da interação entre os componentes do eixo, seus mecanismos de ação e variáveis que possam influenciar no microambiente tumoral e modular o processo metastático (MORTEZAEI, 2020).

Darash-Yahana et al. (2004) analisaram a relação entre alta expressão de CXCR4 e crescimento tumoral, vascularização e metástase em CaP, encontrando resultados positivos para agressividade tumoral. Os autores sugeriram o eixo CXCL12/CXCR4 como importante alvo de estudos no processo de metástase. Akashi et al. (2008) correlacionaram a imunomarcagem de CXCR4 com parâmetros prognósticos em pacientes com CaP metastático, observando relevância em pacientes submetidos a castração química. Também foi revisado o papel da via no processo de angiogênese, sendo descrita sua importância fundamental no direcionamento celular e na progressão de maligna (SALVATORE et al., 2010). Adicionalmente, foi investigada a relação com o microambiente tumoral, concluindo-se que alterações na via podem influenciar nas terapias anticâncer (MENG, XUE e CHEN; 2018).

Dessa forma, ressalta-se a relevância científica da investigação das moléculas CXCL12/CXCR4 no prognóstico e progressão de tumores malignos, como o CaP.

3. METODOLOGIA

3.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Para o presente projeto de pesquisa, foram selecionadas a partir de um biorrepositório de amostras de pacientes com CaP do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética (LAMON) da UEL, provenientes do Hospital do Câncer de Londrina, 60

tecidos incluídos em parafina e coletados os respectivos dados clínicos e patológicos. As etapas que antecederam este estudo (obtenção das amostras, entrevistas com pacientes e coleta de dados dos prontuários) foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Registro CONEP 5231) (Anexo A). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

Os pacientes foram caracterizados em grupos de melhor prognóstico (MP) (20 amostras), pior prognóstico sem metástase ao diagnóstico (PPSM) (23 amostras) e pior prognóstico com metástase ao diagnóstico (PPCM) (17 amostras). Para isso foram seguidos os parâmetros de um guideline com os seguintes critérios: nível de PSA, grau ISUP e o sistema TNM. Pacientes com grau ISUP ≤ 2 (3+4), estadiamento TNM \leq T2a e nível de PSA ≤ 10 ng/mL foram classificados como MP. Pacientes com grau ISUP ≥ 3 (4+3), estadiamento TNM \geq T3a e nível de PSA ≥ 20 ng/mL foram considerados PPSM. Os pacientes PPCM foram classificados de acordo com a presença de invasão linfonodal e/ou metástase à distância e/ou cintilografia óssea positiva e seguiram os mesmos critérios de grau ISUP, PSA e TNM do grupo de PPSM ao diagnóstico.

3.2 IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) DE CXCR4

De todas as amostras, foram obtidos os blocos teciduais embebidos em parafina que foram avaliados quanto à presença de tecido tumoral e não tumoral adjacente por patologista através de coloração hematoxilina-eosina (HE). Utilizando-se um micrótomo (LEICA RM2265) as amostras, fixadas em formalina e embebidas em parafina, foram seccionadas com espessura entre 5 e 6 μm e fixadas em lâminas silanizadas (*Starfrost, Knittel, Alemanha*).

As amostras foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em álcool. Passaram por três ciclos de calor na recuperação antigênica utilizando-se os tampões de ácido cítrico 1,8mM e citrato de sódio di-hidratado 8,2Mm, em seguida as amostras foram tratadas com o anticorpo primário anti-CXCR4 (diluição 1:100) (*Monoclonal Antibody (12G5); ThermoFisher*) e incubadas *overnight*. O anticorpo secundário (*Mouse/Rabbit Immuno detector HRP/DAB, Bio SB INC, Santa Barbara, CA, USA*) foi adicionado e incubado. Ao final, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina para que as estruturas

teciduais que não foram imunomarcadas pela interação específica antígeno-anticorpo, sejam visíveis e as lâminulas foram fixadas utilizando-se *Entelan*.

A padronização da imunomarcção foi realizada em tecido considerado controle positivo (tumor maligno de mama do subtipo triplo negativo com expresso positiva para CXCR4). Foram realizados controles negativos de especificidade do anticorpo primrio em todas as baterias, onde o mesmo foi substituído por tampo fosfato-bicarbonato-salina (PBS) e controles positivos (tecido da mesma paciente com cncer de mama utilizado na padronizao da diluio do anticorpo).

A leitura das lminas foi feita em microscpio ptico (*Eclipse-E200, Nikon, Japo*) por mdica patologista. A anlise do perfil de imunomarcção foi realizada nos tecidos tumoral maligno e no tumoral adjacente e avaliada nas regies citoplasmtica, nuclear e de membrana. A classificao semiquantitativa por sistema de cruces foi baseada em intensidade da colorao: (-) ausncia de marcao, (+) marcao fraca, (++) marcao moderada e (+++) marcao forte.

3.3 GENOTIPAGEM

Realizou-se a amplificao por PCR; restrio enzimtica e genotipagem dos polimorfismos rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*). Para isso, foram utilizados os DNAs obtidos de sangue perifrico disponveis no Biorrepositrio do LAMON. Alguns pacientes do grupo amostral no possuíam DNA disponvel armazenado. Dessa forma, foi realizada a extrao do material a partir de blocos de parafina pertencentes aos respectivos pacientes.

Primeiro, utilizando-se um micrtomo (LEICA RM2265) as amostras emblocadas em parafina foram seccionadas com espessura de 10 μ m e em seguida de 1 a 8 cortes foram armazenados em *effendorfs* (1,5 ml). A extrao foi feita utilizando o *Kit de Purificao de DNA GeneJET FFPE (Thermo Scientific)* de acordo com as etapas estipuladas pelo protocolo do fabricante. Ao final as amostras de DNA foram eluidas com 60 μ L da soluo tampo fornecida no kit e armazenadas a -20 $^{\circ}$ C. A quantificao do DNA foi feita a 260 nm em um *NanoDrop Lite EspectrofotmetroTM (Thermo Fisher Scientific, USA)* e a pureza foi avaliada pela razo A260/A280.

Para anlise de *CXCL12* foram utilizados os *primers* especficos: (sense 5-CAGTCAACCTGGGCAAAGCC-3) e (antisense 5-

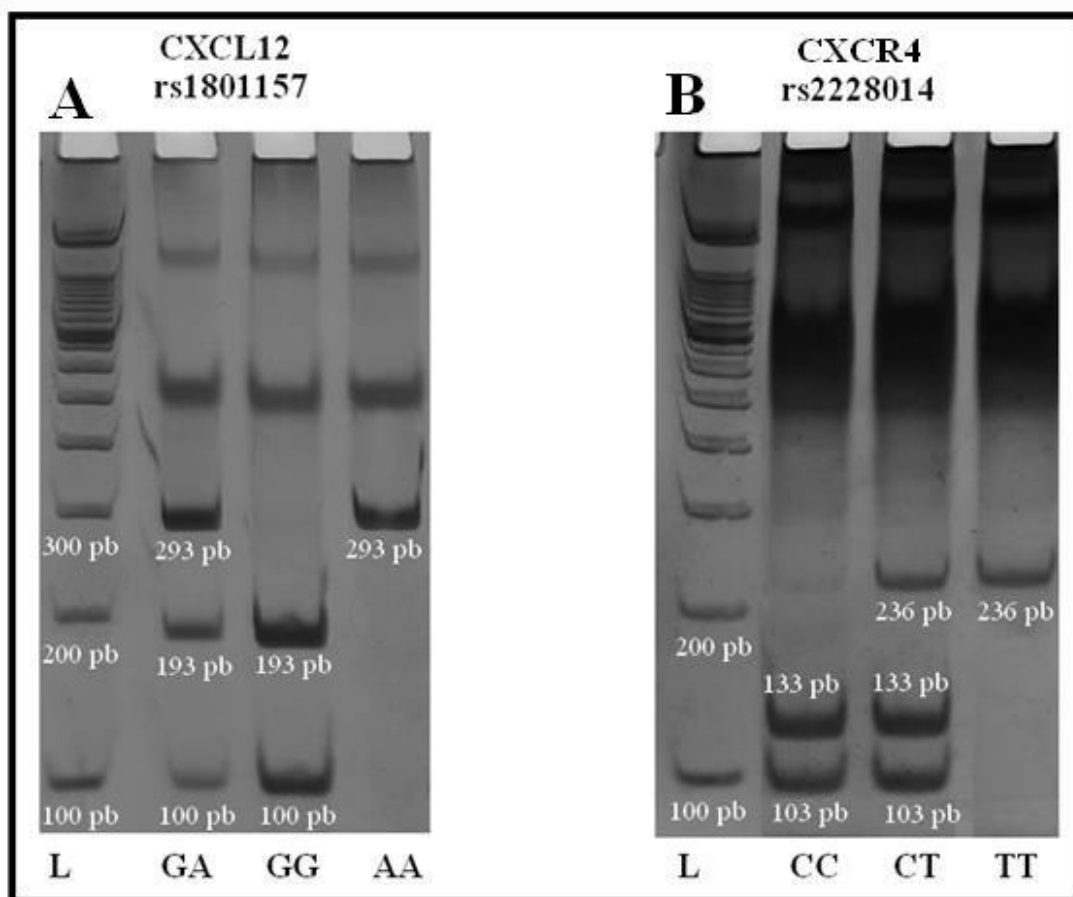
CCTGAGAGGTCCTTTTGCGGG-3). As amostras foram amplificadas usando 10x *Buffer*; 100 nM de dNTPs, 0.25 μ M; 50mM MgCl₂; 1U de *Taq polymerase* (Invitrogen™), e submetidas às condições da PCR: 5 min de desnaturação a 94° C seguidos por 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 60° C e 1 minuto a 72° C, e 10 min de alongamento a 72° C em um termociclador (*Veriti^r 96-Well Thermal Cyclers – Applied Biosystems^r*) gerando um fragmento de 293 pb, correspondente ao genótipo raro.

Para análise de *CXCR4* utilizou-se os *primers* específicos: (sense 5-AGCATGACGGACAAGTACAGG-3) e (antisense 5-GATGAAGTCGGGAATAGTCAGC-3). As amostras foram amplificadas usando 1x *Buffer*; 100 nM de dNTPs, 0.25 μ M; 1,5 nM de MgCl₂; 1U de *Taq polymerase* (Invitrogen™), sob às condições da PCR: 5 min de desnaturação a 94° C seguidos por 35 ciclos de 40 segundos a 94° C, 40 segundos a 60° C e 40 segundos a 72° C, e 10 min de alongamento a 72° C em um termociclador (*Veriti^r 96-Well Thermal Cyclers – Applied Biosystems^r*) gerando um fragmento de 236 pb, correspondente ao genótipo raro

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão de restrição por incubação das enzimas *MspI* e *BccI*, respectivamente por 2 h a 37° C sob as condições: *Buffer* (1 μ L); H₂O (3,8 μ L); Enzima (0,2 μ L = 0,2 U de enzima) e 5 μ L de produto de PCR. Para o *CXCL12*, após a clivagem dos fragmentos pela *MspI*, formam-se fragmentos de 100 e 193 pb. Para o *CXCR4*, após a clivagem dos fragmentos pela *BccI*, formam-se fragmentos de 103 e 133 pb. Um perfil eletroforético formado por três fragmentos corresponde ao genótipo heterozigoto e por dois fragmentos ao genótipo prevalente, para ambos os genes.

Todos os produtos foram aplicados em géis de poliacrilamida (10%) separados por eletroforese a 80-110V por cerca de 1h e foram corados utilizando-se uma solução de nitrato de prata (0,15%). Posteriormente foram examinados em transiluminador de luz branca e registrados por fotodocumentação (Figura 3).

Figura 3: Perfil de fragmentos eletroforéticos para as variantes alélicas dos genes *CXCL12* (rs1801157) e *CXCR4* (rs2228014).



Legenda: L – marcador de tamanho de fragmento de 100pb. A – Gel de poliacrilamida 10% correspondente ao padrão de fragmentos eletroforéticas da variante rs1801157 (*CXCL12*) após a digestão enzimática pela enzima *MspI* (GA – fragmentos 100pb, 193pb e 293pb; GG – fragmentos de 100pb e 193pb; AA – fragmento de 293pb). B – Gel de poliacrilamida 10% correspondente ao padrão de fragmentos eletroforéticas da variante rs2228014 (*CXCR4*) após a digestão enzimática pela enzima *BccI* (CC – fragmentos 133pb e 103pb; CT – fragmentos 133pb, 103pb e 236pb; TT – fragmento 236 pb).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Através do teste do Qui-quadrado de Pearson foi testada a distribuição dos genótipos das variantes rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*) e a associação em relação aos parâmetros prognósticos. O teste Tau B de Kendall foi utilizado para analisar as correlações entre os genótipos de ambas as variantes e os parâmetros prognósticos dos pacientes.

A comparação entre a imunomarcagem de *CXCR4* nos tecidos tumoral maligno e não tumoral adjacente foi feita por meio do teste de McNemar para amostras relacionadas. Pelo teste do Qui-quadrado de Pearson foi testada a distribuição da

imunomarcção e a associao em relao aos parâmetros prognósticos. O teste Tau B de Kendall foi utilizado para analisar as correlaoes entre o perfil de imunomarcção de CXCR4 no tecido tumoral maligno em relao aos parâmetros prognósticos e em relao aos genótipos.

O programa utilizado foi o software IBM® SPSS® *Statistics for Windows*, versao 20.0, considerando-se um nível de significância (α) de 5%.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os polimorfismos rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*) e a imunomarcção da proteína CXCR4, como candidatos a marcadores de prognóstico no cncer de prstata.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar a partir do biorrepositrio de amostras do LAMON, pacientes portadores de CaP e baseado no Risco D'Amico separá-los em grupos de melhor prognóstico, pior prognóstico sem metástase ao diagnóstico e pior prognóstico com metástase ao diagnóstico;

- Realizar os cortes teciduais e a montagem das lâminas referentes aos grupos amostrais tanto para análise de seleção de tecido tumoral e não tumoral do mesmo paciente, quanto para a imunomarcção;

- Padronizar a imunomarcção da proteína CXCR4 em amostras de tecido tumoral controle positivo de mama e em tecido maligno prostático;

- Avaliar a imunomarcção de CXCR4 em amostras de tecidos tumorais malignas e não tumorais adjacentes de prstata nos três grupos prognósticos, para a sua comparação;

- Realizar a genotipagem dos polimorfismos rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*) nas amostras dos pacientes pertencentes aos três grupos prognósticos;

- Analisar a possível correlação entre a imunomarcção de CXCR4 e os polimorfismos de ambos os genes, bem como em relação a parâmetros prognósticos dos pacientes;

- Avaliar o potencial dos biomarcadores candidatos CXCL12/CXCR4 para uso futuro no cncer de prstata.

1. CAPÍTULO 1

Variantes alélicas em *CXCL12/CXCR4* e imunomarcção de *CXCR4*: uma investigação de associação com prognóstico e metástase em câncer de próstata

Amanda Letícia Francelino, Érica Romão Pereira, Laís Capelasso Lucas Pinheiro,
Adrielli Caroline Soares; Ana Carla Mendonça; Alda Fiorina Maria Losi
Guembarovski, Paulo Emílio Fuganti, Karen Brajão de Oliveira, Juliana Mara Serpeloni
e Roberta Losi Guembarovski

Artigo a ser submetido a revista Pathology Research and Practice. Fator de impacto 3,3.

Variantes alélicas em *CXCL12/CXCR4* e imunomarcção de *CXCR4*: uma investigação de associação com prognóstico e metástase em câncer de próstata

Amanda Letícia Francelino¹, Érica Romão Pereira¹, Laís Capelasso Lucas Pinheiro¹, Adrielli Caroline Soares¹; Ana Carla Mendonça¹; Alda Fiorina Maria Losi Guembarovski², Paulo Emílio Fuganti³, Karen Brajão de Oliveira⁴, Juliana Mara Serpeloni¹, Roberta Losi Guembarovski^{1*}.

¹Laboratório de Mutagênese e Oncogenética, Departamento Geral de Biologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

²Laboratório Privado Micropar de Análises Histopatológicas, Londrina, PR, Brasil.

³Hospital do Câncer de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

⁴Laboratório de Genética Molecular e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

*Correspondente: Tel: +55 (43) 33715149; E-mail: robertalosi@uel.br; Endereço: Rodovia Celso Garcia Cid, PR-445, Km 380 - Universidade Estadual de Londrina - PR, Brasil (CEP: 86057-970).

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia maligna que mais acomete os homens e uma grande causa de morte. Pode ser detectado através da alteração dos níveis séricos do Antígeno Prostático Específico (PSA) e do toque digital retal, mas muitas vezes os sintomas estão presentes apenas nos estágios avançados com presença de metástases. Sabe-se que o eixo quimiocina ligante *CXC Motif 12*/Receptor de quimiocina *CXC Motif 4* (CXCL12/CXCR4) atua em vias de sobrevivência e migração celular, podendo estar envolvido com o processo metastático, e que variantes polimórficas podem alterar a expressão gênica e/ou proteica dessas respectivas moléculas. Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar duas variantes alélicas rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*) e a imunomarcação da proteína CXCR4 como candidatos a marcadores de prognóstico no CaP. As amostras (n=60) foram separadas em grupos segundo parâmetros prognósticos (com e sem metástase ao diagnóstico) e a imunomarcação avaliada por imunohistoquímica indireta. Foi observada associação significativa entre o alelo C da variante rs2228014 (*CXCR4*) e a presença de extensão extraprostática. Com relação a imunomarcação de CXCR4, observou-se uma predominância de marcação fraca e de localização citoplasmática e uma diferença significativa entre tecido tumoral maligno *versus* não tumoral adjacente, com maior expressão da proteína no tumor. Observou-se ainda uma associação significativa entre a imunomarcação tumoral de CXCR4 com estadiamento TNM (T2b-T2c) e PSA(>20ng/mL). Nenhuma das variantes alélicas interferiu na imunomarcação tumoral de CXCR4. Os grupos prognósticos não diferiram quanto à frequência das variantes alélicas e nem quanto ao perfil de imunomarcação. Diferença de perfil de expressão entre tecido tumoral maligno e não tumoral adjacente levantam a possibilidade de CXCR4 possuir um papel na carcinogênese prostática.

Palavras-chave: polimorfismo genético, imunohistoquímica, rs2228014 (*CXCR4*), rs1801157 (*CXCL12*).

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) apresenta alta incidência mundial, além de ser o câncer que mais acomete os homens (SUNG et al. 2022, AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022a). No Brasil representa 30% de novos casos, sendo considerado uma das maiores causas de morte em homens que desenvolvem tumores malignos (INCA, 2022). Apresenta etiologia multifatorial e se desenvolve de forma lenta, com sintomas que se manifestam quando a neoplasia maligna já se encontra em estágio avançado ocasionando diagnósticos tardios, comumente após os 65 anos (REGO et al. 2020).

Os métodos de detecção utilizados no rastreamento do CaP são exame de toque retal e detecção de níveis séricos do antígeno prostático específico (PSA) uma proteína presente no sangue que é utilizada como um biomarcador para alteração na próstata (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022b). No entanto, possui baixa especificidade para o câncer uma vez que homens com níveis de PSA dentro da normalidade (< 4 ng/ml) desenvolvem tumores malignos de alto grau (LIN, 2009), ressaltando a necessidade de marcadores mais específicos.

As mortes decorrentes da doença têm o risco aumentado por fatores como avanço da idade, presença de comorbidades e evolução tumoral para estágios mais elevados (BRAGA et al. 2021), como a presença de metástases. Devido à complexidade e a baixa compreensão dos detalhes do processo metastático, existem dificuldades na identificação das formas mais agressivas que se caracterizam por alta proliferação celular e migração das células tumorais para os tecidos adjacentes, agravando o quadro da doença (SAHAI, 2007). Sabe-se que para o CaP as principais regiões de metástase são os ossos e pulmão, porém os mecanismos responsáveis não são bem definidos (BUBENDORF et al. 2000), sendo fundamental o conhecimento sobre a doença na sua forma mais agressiva para a busca de novas alternativas terapêuticas visando um tratamento mais eficaz (PONTE, 2021).

Nesse contexto, já é de conhecimento que o eixo quimiocina/receptor *C-X-C Motif Chemokine Ligand 12/C-X-C Motif Chemokine Receptor 4* (CXCL12/CXCR4) está associado à ativação de vias sinalizadoras (BIANCHI; MEZZAPELLE, 2020), além de atuar na tumorigênese e na migração, influenciando no processo de metástase (BUSILLO; BENOVIC, 2007). Assim, variantes polimórficas nas moléculas que compõem este eixo, podem estar associadas ao risco de desenvolvimento de tumores malignos como o de mama (LIN et al. 2022) e próprio CaP (ISMAN et al. 2012). Adicionalmente, a

imunomarcção da proteína CXCR4, pode ser uma ferramenta importante na clínica oncológica, pois pode possuir expressão tecidual alterada da proteína, sugerindo um potencial como biomarcador tumoral (DARASH-YAHANA et al. 2004; JUNG et al. 2011).

Dessa forma, objetivou-se no presente estudo avaliar a imunomarcção da proteína CXCR4 e a genotipagem dos polimorfismos rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*), como candidatos a marcadores de prognóstico e metástase para o câncer de próstata em amostras de pacientes brasileiros.

METODOLOGIA

Seleção das amostras

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Registro CONEP 5231), todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e participaram de forma voluntária.

Foram selecionadas 60 amostras de pacientes com CaP, provenientes do Hospital do Câncer de Londrina, Londrina, Paraná (PR), Brasil (BR), correspondendo ao mesmo grupo amostral utilizado por Pereira et al. (2022). A partir de dados clínicos e patológicos previamente estabelecidos por um *guideline* das diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN versão 4.2019) – dosagem de PSA, grau ISUP e sistema TNM – os pacientes foram categorizados em grupos: melhor prognóstico (MP) (20 amostras), pior prognóstico sem metástase ao diagnóstico (PPSM) (23 amostras) e pior prognóstico com metástase ao diagnóstico (PPCM) (17 amostras).

Pacientes com grau ISUP ≤ 2 (3+4), estadiamento TNM $\leq T2a$ e nível de PSA ≤ 10 ng/mL foram classificados como MP. Pacientes com grau ISUP ≥ 3 (4+3), estadiamento TNM $\geq T3a$ e nível de PSA ≥ 20 ng/mL foram classificados como PPSM. Os pacientes PPCM foram classificados de acordo com a presença de invasão linfonodal e/ou metástase à distância e/ou cintilografia óssea positiva e seguiram os mesmos critérios de grau ISUP, PSA e TNM dos pacientes PPSM. As amostras teciduais utilizadas nas análises de imunomarcção de CXCR4 corresponderam sempre ao tumor primário dos pacientes do PPCM.

Imunohistoquímica de CXCR4

De todas as amostras, foram obtidos os blocos teciduais embebidos em parafina que foram avaliados quanto à presença de tecido tumoral e não tumoral adjacente por patologista através de coloração hematoxilina-eosina (HE). Em seguida, as amostras foram seccionadas com espessura de $6\mu\text{m}$ e fixadas em lâminas silanizadas (*Starfrost, Knittel, Alemanha*).

A análise da imunomarcagem foi realizada de acordo com Pereira e colaboradores (2022). As amostras foram tratadas com o anticorpo primário anti-CXCR4 (diluição 1:100) (*Monoclonal Antibody (12G5); ThermoFisher*) e incubadas *overnight*. Em seguida, o anticorpo secundário (*Mouse/RabbitImmuno detector HRP/DAB, Bio SB INC, Santa Barbara, CA, USA*) foi adicionado e incubado.

Em todos os testes foi realizado controle negativo de especificidade do anticorpo primário (onde este foi substituído por tampão fosfato-bicarbonato-salina (PBS)), e controle positivo (tecido tumoral maligno de mama do subtipo triplo negativo com expressão de CXCR4 previamente confirmada) o qual também foi utilizado na padronização da diluição do anticorpo primário.

A análise do perfil de imunomarcagem foi realizada exclusivamente por patologista nos tecidos tumoral maligno e não tumoral adjacente e avaliada nas regiões citoplasmática, nuclear e de membrana. A classificação semiquantitativa por sistema de cruzes foi baseada em intensidade da coloração: (-) ausência de marcação, (+) marcação fraca, (++) marcação moderada e (+++) marcação forte.

Extração de DNA e genotipagem das variantes alélicas

Foi realizada a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de restrição enzimática para a genotipagem dos polimorfismos rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*). Foram utilizados DNAs de sangue periférico (obtidos previamente em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa) ou de amostras teciduais embebidas em parafina (quando o DNA de sangue não estava disponível).

As amostras emblocadas em parafina foram seccionadas com espessura de $10\mu\text{m}$ e em seguida 8 cortes foram armazenados em *effendorfs* (1,5 mL). A extração foi feita utilizando o *Kit* de Purificação de DNA *GeneJET FFPE (Thermo Scientific)* de acordo com as etapas estipuladas pelo protocolo do fabricante. Ao final as amostras de DNA foram eluídas com $60\mu\text{L}$ da solução tampão fornecida no kit e armazenadas a -20°C . A

quantificação do DNA foi feita a 260 nm em *NanoDrop Lite* Espectrofotômetro™ (*Thermo Fisher Scientific, USA*) e a pureza foi avaliada pela razão A260/A280.

As análises das variantes de *CXCL12* e *CXCR4* foram realizadas segundo com Okuyama e colaboradores (2022). Os produtos de PCR foram submetidos à digestão de restrição por incubação com as enzimas *BccI* e *MspI*, respectivamente por 2 h a 37° C. Para o *CXCL12*, após a clivagem dos fragmentos pela *MspI*, formam-se fragmentos de 100 e 193 pb. Para o *CXCR4*, após a clivagem dos fragmentos pela *BccI*, formam-se fragmentos de 103 e 133 pb. Um perfil eletroforético formado por três fragmentos corresponde ao genótipo heterozigoto e por dois fragmentos ao genótipo prevalente, para ambos os genes.

Análise estatística

Através do teste do qui-quadrado de Pearson foi testada a distribuição dos genótipos das variantes rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*) e a associação em relação aos parâmetros prognósticos. O teste Tau B de Kendall foi utilizado para analisar as possíveis correlações entre os genótipos de ambas as variantes e os parâmetros prognósticos dos pacientes.

A comparação entre a imunomarcação de *CXCR4* nos tecidos tumoral maligno e não tumoral adjacente foi feita por meio do teste de McNemar para amostras relacionadas. Pelo teste do qui-quadrado de Pearson foi testada a distribuição da imunomarcação e a associação em relação aos parâmetros prognósticos. O teste Tau B de Kendall foi utilizado para analisar as possíveis correlações entre o perfil de imunomarcação de *CXCR4* no tecido tumoral maligno em relação aos parâmetros prognósticos e em relação aos genótipos.

O programa utilizado foi o *software IBM® SPSS® Statistics for Windows, versão 20.0*, considerando-se um nível de significância (α) de 5%.

RESULTADOS

Variantes alélicas polimórficas rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*)

Foi possível genotipar 58 amostras para a variante alélica polimórfica rs1801157 (*CXCL12*) e 54 amostras para a variante polimórfica rs2228014 (*CXCR4*), pois para alguns DNAs obtidos de tecido em parafina não foi possível a obtenção de perfil genotípico.

Para o *CXCL12* foram encontrados 43 indivíduos homozigotos prevalentes (GG - 74,1%), 14 indivíduos heterozigotos (GA - 24,1%) e 1 indivíduo homozigoto para o alelo variante (AA - 1,7%). Sendo distribuídos entre os grupos prognósticos (Tabela 1).

Em relação ao *CXCR4* foram encontrados 31 indivíduos homozigotos prevalentes (CC - 57,4%), 18 indivíduos heterozigotos (CT - 33,3%) e 5 indivíduos homozigotos para o alelo variante (TT - 9,3%). Sendo distribuídos entre os grupos prognósticos (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos genótipos das variantes alélicas rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*) entre os grupos prognósticos.

Grupos Prognósticos	<i>CXCL12</i> (rs1801157)			<i>CXCR4</i> (rs2228014)		
	GG (%)	GA (%)	AA (%)	CC (%)	CT (%)	TT (%)
MP	18 (31%)	3 (5,1%)	0	10 (18,5%)	7 (13%)	2 (3,7%)
PPSM	12 (20%)	8 (13,8%)	1 (1,7%)	14 (26%)	5 (9,2%)	1 (1,8%)
PPCM	13 (22%)	3 (5,1%)	0	7 (13%)	6 (11%)	2 (3,7%)
p valor de χ^2	0,114			0,247		

Teste Qui quadrado. Nível de significância $p < 0.05$. MP: Grupo de melhor prognóstico; PPSM: grupo de pior prognóstico sem metástase ao diagnóstico; PPCM: grupo de pior prognóstico com metástase ao diagnóstico.

Em função do número amostral, em todas as análises envolvendo os polimorfismos genéticos, os indivíduos heterozigotos e homozigotos raros para ambas as variantes alélicas foram somados para aumentar o poder estatístico, considerando, desta maneira, um modelo dominante (presença do alelo raro em heterozigose ou homozigose).

Por meio do teste de Qui-quadrado foi avaliada a distribuição dos genótipos em relação aos parâmetros prognósticos – idade, valores de PSA, grau ISUP (padrão de avaliação de agressividade tumoral), estadiamento TNM (classificação do tumor primário quanto a extensão tumoral, presença ou ausência de metástase), extensão extraprostática (invasão neoplásica no tecido adiposo), invasão perineural (invasão dos nervos presente na próstata), invasão de vesícula seminal e recidiva bioquímica (elevação dos níveis de PSA em pacientes submetidos a tratamento) – para ambas as variantes polimórficas rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*) (Tabela 2). Não foi possível obter todos os

dados clínico-patológicos devido a ausência de informações nos prontuários de alguns pacientes.

Foi encontrada associação significativa entre o alelo prevalente C da variante rs2228014 (*CXCR4*) e a presença de extensão extraprostática ($p=0,043$) (Tabela 2). Os demais parâmetros prognósticos avaliados não se mostraram estatisticamente associados às variantes genéticas.

Tabela 2: Análises de associação e correlação entre as variantes alélicas rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*) e parâmetros prognósticos dos pacientes com CaP.

Parâmetros prognósticos	p valor de χ^2	
	rs1801157 (<i>CXCL12</i>)	rs2228014 (<i>CXCR4</i>)
	(GG/GA+AA)	(CC/CT+ TT)
Idade	0,447	0,740
PSA	0,51	0,367
ISUP	0,545	0,409
TNM	0,634	0,074
Extensão Extraprostática	0,349	0,043*
Invasão Perineural	0,591	0,315
Invasão de Vesícula Seminal	0,19	0,542
Recidiva Bioquímica	0,288	0,222

Testes do Qui quadrado de Pearson. *Nível de significância $p<0,05\%$. rs1801157 (*CXCL12*): (G) – alelo prevalente; (A) – alelo raro; (GG/GA+AA) – modelo dominante de *CXCL12*; rs2228014 (*CXCR4*): (C) – alelo prevalente; (T) – alelo raro; (CC/CT+ TT) – modelo dominante de *CXCR4*.

Imunomarcção de CXCR4

Foi obtido um perfil de imunomarcção de CXCR4 satisfatório e reproduzível na diluição de 1:100 do anticorpo primário, utilizando-se tecido tumoral de mama considerado controle positivo para a expressão desta proteína (Figura 1).

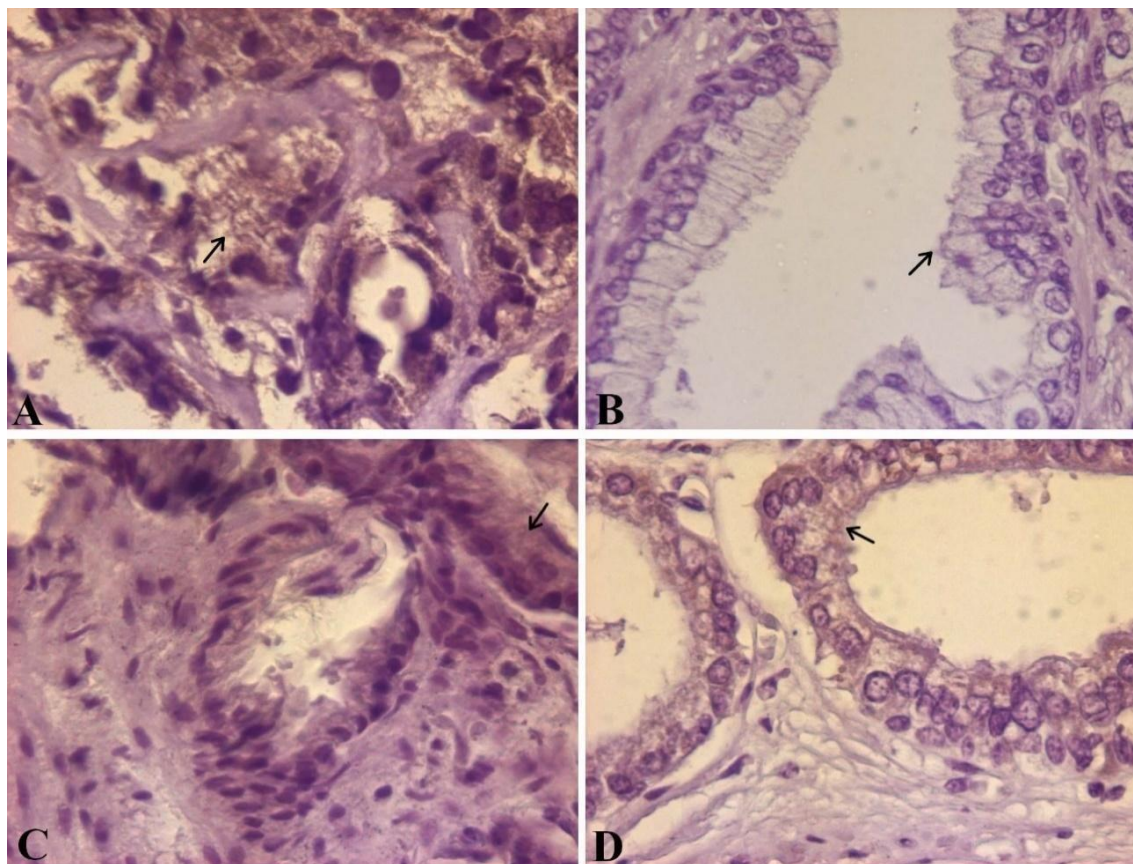
Foram analisadas 60 amostras de forma comparativa entre os tecidos tumoral maligno e não tumoral adjacente. Observou-se predominância de marcação citoplasmática fraca (+) tanto no tecido tumoral maligno (16/60 - 26,7%) quanto no não tumoral adjacente (12/59 - 20%). De um modo geral, os grupos prognósticos apresentaram um perfil de imunomarcção fraca (+) para CXCR4, que não diferiu estatisticamente (Tabela 3). Adicionalmente, foram observadas marcações moderadas (++) apenas em pacientes pertencentes aos grupos PPSM e PPCM. Não foram observadas marcações de membrana e/ou nucleares em nenhuma das amostras analisadas, tanto no tecido tumoral maligno quanto no não tumoral adjacente (Figura 1).

Tabela 3: Distribuição do perfil de imunomarcção de CXCR4 entre os grupos prognósticos.

Grupos	Perfil de imunomarcção		p valor de χ^2
	Ausência (-)	Marcação (+/++)	
MP	13 (35,1%)	8 (34,8%)	0,938
PPSM	13 (35,1%)	9 (26,1%)	
PPCM	11 (29,7%)	6 (39,1%)	

Nível de significância $p < 0.05$. MP: Grupo de melhor prognóstico; PPSM: grupo de pior prognóstico sem metástase ao diagnóstico; PPCM: grupo de pior prognóstico com metástase ao diagnóstico.

Figura 1: Perfil de imunomarcção da proteína CXCR4 pela técnica imunohistoquímica indireta em tecidos tumorais malignos de mama (controle positivo) e próstata.



Legenda: controle positivo (tecido tumoral de mama triplo negativo); (a) ausência de marcação (b); marcação fraca (c); marcação moderada (d). Aumento 400X.

Pelo teste McNemar foi observada uma diferença significativa entre a imunomarcção do tecido tumoral maligno *versus* não tumoral adjacente ($p=0,041$). Pelo teste de Qui quadrado de Pearson foi observada associação significativa entre a marcação citoplasmática tumoral e o estadiamento T2b - T2c ($p=0,023$) e pelo teste Tau B de Kendall foi observada correlação significativa entre a marcação citoplasmática tumoral e valores de PSA acima de 20 ng/mL ($p=0,029$) (Tabela 4). Os demais parâmetros prognósticos avaliados não se mostraram estatisticamente associados ao perfil de imunomarcção de CXCR4.

Adicionalmente não foram observados resultados significativos nos testes de associação e/ou correlação entre a imunomarcção de CXCR4 e as variantes polimórficas, considerando-se um modelo dominante de análise (Tabela 5 do Material suplementar).

Tabela 4: Comparação entre parâmetros prognósticos e perfil de imunomarcção de CXCR4 nas amostras de tecidos tumorais malignos dos pacientes com CaP.

Parâmetros Clínicos-Patológicos	Ausência de Marcação	Marcação Fraca	Marcação Moderada	p valor de χ^2	p valor de Kendall (valor de Tau)
	(-)	(+)	(++)		
	Citoplasma tumoral	Citoplasma Tumoral	Citoplasma tumoral	Citoplasma tumoral	Citoplasma tumoral
Idade (n=60)				0,280	0,389 (0,108)
≤64 anos	15 (40,5%)	3 (18%,8)	3 (42,9%)		
≥65 anos	22 (59,5%)	13 (81,3%)	4 (57,1%)		
ISUP (n=59)				0,177	0,169 (0,165)
1	14 (38,9%)	3 (18,8%)	1 (14,3%)		
2-3	14 (38,9%)	11 (68,8%)	3 (42,9%)		
4-5	8 (22,2%)	2 (12,5%)	3 (42,9%)		
TMN (n=54)				0,023*	0,075 (0,225)
≤T2a	13 (38,2%)	1 (7,1%)	0		
T2b - T2c	4 (11,8%)	6 (42,9%)	1 (16,7%)		
≥T3a	17 (50%)	7 (50%)	5 (83,3%)		
PSA (ng/mL) (n=60)				0,128	0,029* (0,259)
<10	18 (48,6%)	6 (37,5%)	1 (14,3%)		
10 a 20	11 (29,7%)	4 (25%)	1 (14,3%)		
>20	8 (21,6%)	6 (37,5%)	5 (71,4%)		

Tabela 4: Comparação entre parâmetros prognósticos e perfil de imunomarcção de CXCR4 nas amostras de tecidos tumorais malignos dos pacientes com CaP.

Parâmetros Clínicos- Patológicos	Ausência de marcação	Marcação Fraca	Marcação Moderada	p valor de χ^2	p valor de Kendall (valor de Tau)
	(-)	(+)	(++)		
	Citoplasma tumoral	Citoplasma Tumoral	Citoplasma tumoral	Citoplasma tumoral	Citoplasma tumoral
Invasão de Vesícula (n=51)				0,093	0,568 (0,076)
Sim	8 (25%)	4 (28,6%)	1 (16,7%)		
Não	24 (75%)	10 (71,4%)	4 (66,7%)		
Extensão Extraprostática (n=53)				0,325	0,383 (0,117)
Sim	17 (51,5%)	7 (50%)	5 (83,3%)		
Não	16 (48,5%)	7 (50%)	1 (16,7%)		
Invasão Perineural (n=50)				0,563	0,384 (0,120)
Sim	6 (18,8%)	3 (23,1%)	2 (40%)		
Não	26 (81,3%)	10 (76,9%)	3 (60%)		
Recidiva Bioquímica (n=42)				0,613	0,450(-0,114)
Sim	16 (57,1%)	3 (37,5%)	3 (50%)		
Não	12 (42,9%)	5 (62,5%)	3 (50%)		

Testes do Qui quadrado de Pearson e Tau B de Kendall. *Nível de significância $p < 0.05$.

DISCUSSÃO

De acordo com nossos conhecimentos até o presente momento, este é o primeiro estudo a avaliar variantes alélicas no eixo CXCL12/CXCR4 em combinação com a imunomarcagem de CXCR4 em amostras de CaP provenientes de pacientes brasileiros de diferentes perfis prognósticos. Dentre os principais resultados observados no presente estudo tem-se que a variante polimórfica de CXCR4 se mostrou associada e correlacionada com presença de extensão extraprostática. Além disso, a imunomarcagem de CXCR4 diferiu entre os tecidos tumoral e não tumoral adjacente, mostrando-se associada e correlacionada a parâmetros prognósticos do CaP. Os grupos amostrais prognósticos não diferiram quanto à frequência das variantes alélicas e nem quanto ao perfil de imunomarcagem de CXCR4.

Sabe-se que o processo inflamatório contribui para a tumorigênese e dentro deste contexto, variantes polimórficas no eixo CXCL12/CXCR4 podem influenciar na suscetibilidade, prognóstico e/ou metástase de diferentes cânceres. Wu e colaboradores (2016), através de uma meta análise, encontraram que a variante rs2228014 (*CXCR4*) pode estar correlacionada ao risco aumentado de desenvolvimento de tumores malignos em populações asiáticas e foi observado que o genótipo heterozigoto desta mesma variante associou-se significativamente com câncer de pulmão em indivíduos de origem turca (OZBAYER et al. 2023). Em outro estudo, envolvendo tumor maligno de diferente comportamento biológico (neuroblastoma infantil), observou-se que a variante rs1801157 (*CXCL12*) associou-se à suscetibilidade em amostra de pacientes brasileiros da região Sul do Brasil (VIEIRA-FILHO et al. 2020).

Assim, a interação entre variantes polimórficas de quimiocinas inflamatórias pode desempenhar um papel na carcinogênese da próstata, mas essa interação não está bem elucidada (TINDALL; HAYES e PETERSEN, 2010). No presente estudo foram avaliadas as possíveis associações entre duas variantes alélicas no eixo CXCL12/CXCR4 em três subgrupos amostrais de pacientes com CaP, categorizados de acordo com parâmetros prognósticos e presença de metástase. Reconhecidamente, fatores prognósticos podem indicar uma maior ou menor agressividade tumoral, como é o caso do grau ISUP, que define os pacientes em grupos de risco (SRIGLEY et al. 2019), e do estadiamento TNM, que tem a função de avaliar a extensão anatômica do avanço tumoral e a presença ou ausência de metástases (BRIERLEY et al. 2021). Estes parâmetros não

se mostraram significativamente associados às variantes avaliadas em nossa amostra de pacientes com CaP. Entretanto, observou-se associação significativa entre o alelo C (rs2228014 (*CXCR4*)) e a presença de extensão extraprostática, um parâmetro de caráter invasivo que pode representar um risco aumentado de recidiva bioquímica (NETO et al. 2022).

Como exemplo de outros resultados que investigaram esta variante em relação a parâmetros tumorais importantes, segundo Matsusaka e colaboradores (2017), a variante rs2228014 (*CXCR4*) foi capaz de prever sobrevida livre de doença em pacientes com câncer colorretal metastático. Quin e colaboradores (2018) observaram resultados significativos para estadiamento TNM com os genótipos CT e TT deste mesmo polimorfismo sugerindo associação com o avanço do carcinoma hepatocelular. Já Zheng e colaboradores (2016) demonstraram não haver associação entre a variante rs2228014 (*CXCR4*) e disseminação tumoral em leucemia mieloide aguda (LMA), como também observaram ausência de associação quando levada em consideração a combinação das variantes rs2228014 (*CXCR4*) e rs1801157(*CXCL12*).

Em relação a variante rs1801157 (*CXCL12*), Isman e colaboradores (2012) encontraram que pacientes com o genótipo homocigoto raro AA apresentaram maior risco de desenvolver CaP em estágios avançados e que isto poderia influenciar a progressão e a metástase óssea nestes pacientes. Hirata e colaboradores (2007), avaliaram este mesmo polimorfismo em amostras de CaP e também observaram uma maior frequência do genótipo AA em pacientes com metástase linfonodal. No presente estudo, nenhuma associação e/ou correlação significativa entre esta variante foi observada em relação aos parâmetros prognósticos, incluindo metástase e recidiva bioquímica. Isto corrobora o observado por Quin e colaboradores (2018), que não obtiveram resultados significativos entre a mesma variante e metástase linfonodal ou à distância, porém avaliando pacientes com carcinoma hepatocelular.

Os resultados da literatura são divergentes e requerem cautela em sua avaliação. A maioria dos estudos encontrados a respeito das variantes polimórficas rs1801157 (*CXCL12*) e rs2228014 (*CXCR4*), foram realizados em populações asiáticas e europeias, que são populações homogêneas quando comparadas as populações da América do Sul, como é o caso do Brasil, um país caracterizado por alta miscigenação. Dentro deste contexto, nosso estudo contribui com os resultados da literatura sobre uma possível

influência deste eixo quimiocina receptor na neoplasia maligna da próstata, em especial quando considera-se uma amostra populacional brasileira.

Quando um tumor é detectado, seu diagnóstico é feito por meio de estudos histopatológicos de fragmentos teciduais obtidos por biópsia (DO NASCIMENTO, 2022), a fim de se identificar o estágio tumoral e visando a aplicação de tratamentos mais direcionados. O eixo CXCL12/CXCR4 tem sido relacionado à proliferação celular e ao processo de metástase (GANGADHAR; NANDI; SALGIA, 2010; WANG et al. 2014) e uma das ferramentas que permite sua investigação diretamente no tecido do paciente é a avaliação da imunomarcagem de CXCR4. De acordo com um estudo de revisão, foi visto que a proteína CXCR4 está expressa em diferentes tecidos tumorais malignos como mama, rim, ovário e próstata (COJOC et al. 2013), e que ela é responsável pela iniciação de vias que promovem quimiotaxia, adesão, migração, proliferação e sobrevivência celulares (ZHOU et al. 2019).

Neste trabalho, objetivou-se também avaliar a imunomarcagem deste receptor em amostras teciduais de pacientes com CaP, considerando sempre um perfil comparativo entre os tecidos tumoral maligno e não tumoral adjacente, para todos os pacientes. Foi observada uma diferença significativa entre os tecidos tumoral maligno e não tumoral e uma imunomarcagem predominantemente citoplasmática. Guembarovski e colaboradores (2018) também encontraram marcação citoplasmática e maior no tecido tumoral maligno, quando avaliaram amostras de pacientes com câncer de mama triplo negativo. Visto que CXCR4 é um receptor transmembrana, o esperado seria encontrar uma marcação da proteína na membrana das células, porém, quando acontece a interação com a quimiocina ligante (CXCL12), já é reconhecida sua internalização seguida da ativação de vias intracelulares (HATTERMANN, et al. 2014), o que explica a imunolocalização proteica no citoplasma celular.

O fato de CXCR4 estar mais expresso nas células tumorais malignas poderia indicar uma maior propensão à migração, que tenderiam a buscar por seu ligante, podendo constituir uma via para o processo de metástase. Akashi e colaboradores (2008), em um estudo envolvendo amostras de pacientes com CaP metastático, não obtiveram resultados significativos com valores de PSA ou metástase óssea, porém observaram alta expressão de CXCR4 em pacientes que apresentaram uma pior sobrevida, sugerindo esta molécula como um fator de pior prognóstico para pacientes metastáticos. No presente estudo não

observamos diferença de perfil de imunomarcção significativa para o grupo com metástase no diagnóstico quando comparado aos grupos de melhor e pior prognóstico.

Sabe-se que variações nos níveis séricos de PSA indicam alteração no tecido prostático, porém não indicam necessariamente presença de alterações malignas (ADHYAM; GUPTA, 2012). Assim, o PSA não é um marcador específico para o tumor de próstata e a busca por novos biomarcadores mais específicos é fundamental, mas sua avaliação continua sendo um parâmetro prognóstico extremamente útil. Neste estudo a imunomarcção positiva de CXCR4 no tecido tumoral foi significativamente correlacionada a níveis elevados de PSA (>20ng/mL), sugerindo um potencial como biomarcador de agressividade para o CaP. Adicionalmente, já foi visto que a expressão de CXCR4 em tecidos malignos pode conferir um comportamento invasivo às células (BALKWILL, 2004) e, nesse contexto, neste trabalho, foi observada uma associação significativa com estadiamento T2, onde o tumor primário ainda está limitado à próstata, porém já apresenta um perfil intermediário de extensão.

Embora nosso estudo não tenha encontrado associação e/ou correlação entre a imunomarcção de CXCR4 e as variantes polimórficas avaliadas, Hirata e colaboradores (2007) observaram uma maior expressão de *CXCL12* em pacientes com os genótipos GA ou AA (presença da variante alélica) e associaram significativamente estes genótipos com expressão tecidual aumentada de CXCR4, demonstrando que a presença da variante no ligante pode influenciar a expressão do receptor e, conseqüentemente, o processo de metástase em amostras de pacientes com CaP. No banco de dados *The human protein atlas* (TCGA) não foram encontrados dados relacionados à expressão proteica de CXCR4 em amostras de tecido prostático, porém existem dados a respeito da expressão de mRNA em 494 amostras de pacientes com CaP os quais apresentam uma baixa expressão para esse receptor. Apesar destes dados serem referentes a expressão gênica e não da proteína no tecido, são provenientes de um grande número de pacientes, o que pode supor que CXCR4 realmente possua baixa expressão no tumor maligno da próstata e, desta maneira, os dados do presente estudo estariam condizentes.

Pode-se citar como pontos negativos deste trabalho a limitação do número amostral de pacientes metastáticos para comparação com os demais grupos. Por outro lado, a divisão da amostra em subgrupos prognósticos, a presença de tecido tumoral e não tumoral adjacente de todos os pacientes e a avaliação do perfil de imunomarcção por

médico patologista considerando ambos os tecidos constituem pontos fortes deste estudo e que reforçam os resultados obtidos. Adicionalmente, a avaliação simultânea de variantes alélicas e do perfil de expressão proteica de moléculas envolvidas no eixo *CXCL12/CXCR4* nas mesmas amostras e sua correlação também contribuem para a consistência dos resultados.

Sabe-se que vem ocorrendo a utilização de bloqueadores de *CXCR4* em diferentes modelos tumorais (DE CLERCQ, 2019) incluindo o CaP (GRAVINA et al. 2015), apresentando resultados positivos de inibição da sinalização do eixo *CXCL12/CXCR4* (CONLEY-LACOMB et al. 2016). Por fim, os resultados do presente estudo demonstram que o receptor *CXCR4* pode constituir um dos caminhos para a piora no prognóstico e/ou processo de metástase no CaP, o que requer investigações futuras.

REFERÊNCIAS

- ADHYAM, Mohan; GUPTA, Anish Kumar. A review on the clinical utility of PSA in cancer prostate. **Indian journal of surgical oncology**, v. 3, n. 2, p. 120-129, 2012.
- AKASHI, Takuya et al. Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. **Cancer science**, v. 99, n. 3, p. 539-542, 2008.
- American Cancer Society. Can Prostate Cancer Be Found Early?. 2022b. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/detection.html>> Acesso em: 26 de jul de 2022.
- American Cancer Society. How common is prostate cancer?. 2022a. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/key-statistics.html>> Acesso em: 26 de julho de 2022.
- BALKWILL, Fran. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2004. p. 171-179.
- BIANCHI, Marco E.; MEZZAPELLE, Rosanna. The chemokine receptor CXCR4 in cell proliferation and tissue regeneration. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 2109, 2020.
- BRAGA, Sonia Faria Mendes et al. Prostate Cancer Survival and Mortality according to a 13-year retrospective cohort study in Brazil: Competing-Risk Analysis. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 24, 2021.
- BRIERLEY, James D. et al. (Ed.). **TNM Atlas**. John Wiley & Sons, 2021.
- BUBENDORF, Lukas et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. **Human pathology**, v. 31, n. 5, p. 578-583, 2000.
- BUSILLO, John M.; BENOVIC, Jeffrey L. Regulação da sinalização CXCR4. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 4, pág. 952-963, 2007.
- COJOC, Monica et al. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. **OncoTargets and therapy**, p. 1347-1361, 2013.
- CONLEY-LACOMB, M. Katie et al. Pharmacological targeting of CXCL12/CXCR4 signaling in prostate cancer bone metastasis. **Molecular cancer**, v. 15, p. 1-13, 2016.

DARASH-YAHANA, Merav et al. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 11, p. 1240-1242, 2004.

DE CLERCQ, Erik. Mozobil®(Plerixafor, AMD3100), 10 anos após sua aprovação pela Food and Drug Administration dos EUA. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy** , v. 27, p. 2040206619829382, 2019.

DO NASCIMENTO, Eduarda Gomes et al. Epidemiologia do câncer de próstata no Brasil nos últimos 10 anos. **Revista de Saúde**, v. 13, n. 2, p. 48-52, 2022.

GANGADHAR, Tara; NANDI, Suvobroto; SALGIA, Ravi. The role of chemokine receptor CXCR4 in lung cancer. **Cancer biology & therapy**, v. 9, n. 6, p. 409-416, 2010.

GRAVINA, Giovanni Luca et al. CXCR4 pharmacological inhibition reduces bone and soft tissue metastatic burden by affecting tumor growth and tumorigenic potential in prostate cancer preclinical models. *The Prostate*, v. 75, n. 12, p. 1227-1246, 2015.

GUEMBAROVSKI, Alda Losi et al. CXCL12 chemokine and CXCR4 receptor: association with susceptibility and prognostic markers in triple negative breast cancer. **Molecular biology reports**, v. 45, p. 741-750, 2018.

HATTERMANN, Kirsten et al. Effects of the chemokine CXCL12 and combined internalization of its receptors CXCR4 and CXCR7 in human MCF-7 breast cancer cells. **Cell and tissue research**, v. 357, n. 1, p. 253-266, 2014.

HIRATA, Hiroshi et al. CXCL12 G801A polymorphism is a risk factor for sporadic prostate cancer susceptibility. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 17, p. 5056-5062, 2007.

INCA. Estatísticas de câncer. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa> >. Acesso em: 13 de fev de 2023.

İŞMAN, Ferruh K. et al. Association between SDF1-3' A or CXCR4 gene polymorphisms with predisposition to and clinicopathological characteristics of prostate cancer with or without metastases. **Molecular biology reports**, v. 39, p. 11073-11079, 2012.

JUNG, Seok Jin et al. Correlation between chemokine receptor CXCR4 expression and prognostic factors in patients with prostate cancer. **Korean journal of urology**, v. 52, n. 9, p. 607-611, 2011.

LIN, Daniel W. Beyond PSA: utility of novel tumor markers in the setting of elevated PSA. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, 2009. p. 315-321.

LIN, Shuai et al. Associations of CXCL12 polymorphisms with clinicopathological features in breast cancer: a case-control study. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 3, p. 2255-2263, 2022.

MATSUSAKA, S. et al. CXCR4 polymorphism predicts progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line bevacizumab-based chemotherapy. **The pharmacogenomics journal**, v. 17, n. 6, p. 543-550, 2017.

NETO, Antonio Brunetto et al. Aumento da Incidência de Recidiva Bioquímica após Prostatectomia Radical em Centro de Formação em Urologia Oncológica no Brasil: Doenças mais Avançadas estão sendo submetidas à Cirurgia? **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 68, n. 3, 2022.

OKUYAMA, Nádia Calvo Martins et al. CXCL12/CXCR4 axis gene variants contribute to an increased vulnerability to HPV infection and cervical oncogenesis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 148, n. 4, p. 793-802, 2022.

OZBAYER, Cansu et al. Gene Variations of Chemokine and Chemokine Receptor CXCL12/CXCR4 in Lung Cancer. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 42, n. 2, 2023.

PEREIRA, Érica Romão et al. Tissue immunostaining of candidate prognostic proteins in metastatic and non-metastatic prostate cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, p. 1-11, 2022.

PONTE, Jamille Pereira et al. Tratamento do câncer de próstata hormônio refratário atual e suas inovações: Revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 6924-6930, 2021.

QIN, Li-Feng et al. CXCL12 and CXCR4 polymorphisms and expressions in peripheral blood from patients of hepatocellular carcinoma. **Future Oncology**, v. 14, n. 13, p. 1261-1271, 2018.

REGO, Renata Furletti Nunes Barros et al. Perfil clínico epidemiológico da população atendida num programa de rastreamento de câncer de próstata. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 18, n. 65, 2020.

SAHAI, Erik. Illuminating the metastatic process. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 10, p. 737-749, 2007.

SRIGLEY, John R. et al. Controversial issues in Gleason and International Society of Urological Pathology (ISUP) prostate cancer grading: proposed recommendations for international implementation. **Pathology**, v. 51, n. 5, p. 463-473, 2019.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca Cancer Clin* 2021; 71: 209-49. **This report provides the latest global cancer statistics of incidence and mortality worldwide**, 2022.

TINDALL, Elizabeth A.; HAYES, Vanessa M.; PETERSEN, Desiree C. Inflammatory genetic markers of prostate cancer risk. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 1198-1220, 2010.

VIEIRA-FILHO, Daniel Rubens Marques et al. CCR5 and CXCL12 allelic variants: Possible association with childhood neuroblastoma susceptibility?. **Journal of Neuroimmunology**, v. 342, p. 577193, 2020.

WANG, Lunqing et al. High-level CXC chemokine receptor type 4 expression correlates with brain-specific metastasis following complete resection of non-small cell lung cancer. **Oncology Letters**, v. 7, n. 6, p. 1871-1876, 2014.

WU, Yang et al. CXC motif chemokine receptor 4 gene polymorphism and cancer risk. **Medicine**, v. 95, n. 49, 2016.

ZHENG, Qin et al. The role of polymorphisms of stromal-derived factor-1 and CXC receptor 4 in acute myeloid leukemia and leukemia cell dissemination. **Gene**, v. 588, n. 2, p. 103-108, 2016.

ZHOU, Weiqiang et al. Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 17, p. 3026-3041, 2019.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 5: Análises de comparação entre as variantes polimórficas de *CXCL12* e *CXCR4* e a imunomarcção proteica de CXCR4 em amostras de tecidos tumorais de pacientes com CaP.

Modelo Genotípico dominante das variantes polimórficas	Imunomarcção Tumoral Citoplasmática de CXR4		p valor de χ^2	p valor de Kendall (valor de Tau)	
	ausência de imunomarcção (n°)	imunomarcações (n°)			
<i>CXCL12</i>	GG	34	23	0,414	0,418 (-107)
	GA+AA	1	0		
<i>CXCR4</i>	CC	29	20	0,363	0,368 (-124)
	CT+TT	4	1		

Teste Qui quadrado de Pearson e Tau B de Kendall. *Nível de significância $p < 0.05$.

CONCLUSÕES

Como principais conclusões obtidas no presente trabalho temos:

- Foram encontradas associação e correlação significativas entre o alelo prevalente C da variante rs2228014 (*CXCR4*) e a presença de extensão extraprostática;
- Foi obtido um perfil satisfatório de imunomarcção de *CXCR4* na diluição de 1:100 do anticorpo primário, utilizando-se tecido tumoral de mama controle positivo;
- Observou-se predominância de perfil de imunomarcção citoplasmática fraca para o receptor *CXCR4*;
- Observou-se uma diferença significativa entre a imunomarcção do tecido tumoral maligno prostático em relação ao não tumoral adjacente;
- Foram observadas associações significativas entre a marcação citoplasmática tumoral de *CXCR4* com estadiamento T2b - T2c e com valores de PSA acima de 20 ng/mL;
- Os grupos prognósticos não diferiram quanto à frequência das variantes alélicas e nem quanto ao perfil de imunomarcção.
- Não foram observados resultados significativos nos testes de associação e/ou correlação entre o perfil de imunomarcção e as variantes polimórficas analisadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados observados neste trabalho mostraram que a variante alélica avaliada de CXCR4 pode influenciar no processo de invasão tumoral. Além disso, deve ser levado em consideração seu potencial como biomarcador candidato, devido ao aumento de sua imunomarcção no tecido tumoral maligno da próstata.

Assim, de acordo com o observado no presente estudo, o eixo *CXCL12/CXCR4* parece não ser a principal via responsável pela metástase e pela piora do prognóstico no câncer de próstata, mas merece investigações futuras em amostras envolvendo um maior número de pacientes metastáticos, as quais poderiam contribuir com uma maior elucidação do papel destas moléculas e sua possível aplicação clínica futura na oncologia prostática.

REFERÊNCIAS

ADHYAM, Mohan; GUPTA, Anish Kumar. A review on the clinical utility of PSA in cancer prostate. **Indian journal of surgical oncology**, v. 3, n. 2, p. 120-129, 2012.

AKASHI, Takuya et al. Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. **Cancer science**, v. 99, n. 3, p. 539-542, 2008.

ALBERTS, Bruce et al. **Molecular biology of the cell**. WW Norton & Company, 2017.

American Cancer Society. Can Prostate Cancer Be Found Early?. 2022b. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/detection.html> > Acesso em: 26 de jul de 2022.

American Cancer Society. How common is prostate cancer?. 2022a. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/key-statistics.html>> Acesso em: 26 de julho de 2022.

CDC. American Cancer Society. Who Is at Risk for Prostate Cancer?. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/cancer/prostate/basic_info/risk_factors.htm>. Acesso em: 27 de jul de 2022.

BALKWILL, Fran. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2004. p. 171-179.

BIANCHI, Marco E.; MEZZAPELLE, Rosanna. The chemokine receptor CXCR4 in cell proliferation and tissue regeneration. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 2109, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Programa nacional de controle do câncer da próstata: documento de consenso**. - Rio de Janeiro: INCA, 2002.

BUSILLO, John M.; BENOVIC, Jeffrey L. Regulação da sinalização CXCR4. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 4, pág. 952-963, 2007.

CANCER SOCIETY. 2022. Booklet a guide for people with prostate cancer.pdf. Disponível em: <<https://www.cancer.org.nz/cancer/types-of-cancer/prostate-cancer/> >. Acesso em: 28 de jul de 2022.

CENTER, Melissa M. et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. **European urology**, v. 61, n. 6, p. 1079-1092, 2012.

CHAN, June M.; STAMPFER, Meir J.; GIOVANNUCCI, Edward L. What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. In: Seminars in cancer biology. Academic Press, 1998. p. 263-273.

CHATTERJEE, Samit; AZAD, Babak Behnam; NIMMAGADDA, Sridhar. O intrincado papel do CXCR4 no câncer. **Avanços na pesquisa do câncer**, v. 124, p. 3182, 2014.

CHEN, Ruiwan et al. CXCL12 genetic variants as prognostic markers in nasopharyngeal carcinoma. **OncoTargets and therapy**, v. 8, p. 2835, 2015.

DAMIÃO, Ronaldo et al. Câncer de próstata. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto (TÍTULO NÃO-CORRENTE)**, v. 14, 2015.

DARASH-YAHANA, Merav et al. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 11, p. 1240-1242, 2004.

DE FREITAS VIZECHI, Marcelo Aparecido et al. A imuno-histoquímica como um auxílio na distinção entre tumores benignos e malignos. **Perspectivas Médicas**, v. 27, n. 1, p. 15-25, 2016.

DE MOURA, Priscila Randazzo; VIDAL, Felipe Augusto Pinto. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Scientia Medica (Porto Alegre)**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2011.

DORNAS, Maria et al. Câncer de próstata. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 7, n. 1, 2008.

EL BAROUKI, Mayene Pongeluppe. Rastreamento do câncer de próstata em homens acima de 50 anos através do exame diagnóstico de PSA. **Revista Eletrônica Gestão e Saúde**, n. 2, p. 425-437, 2012.

EPSTEIN, Jonathan I. et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. **The American journal of surgical pathology**, v. 40, n. 2, p. 244-252, 2016.

EPSTEIN, Jonathan I. Prostate cancer grading: a decade after the 2005 modified system. **Modern Pathology**, v. 31, p. 47-63, 2018.

FEDERSPIEL, B. I. *et al.* "Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen," *Genomics*, vol. 16, no. 3, pp. 707-712, 1993.

FERNANDIS, Aaron Zefrin et al. Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 23, n. 1, p. 157-167, 2004.

FERRO, A. B. **Imunohistoquímica**. 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/4569/1/Imunohistoqu%c3%admica.pdf>>. Acesso em: 04 de fev. 2022.

GARCÍA-PERDOMO, Herney Andrés; ZAPATA-COPETE, James Alejandro; SÁNCHEZ, Adalberto. Una mirada global y actualizada del cáncer de próstata. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 66, n. 3, p. 429-437, 2018.

GEBAUER, Florian et al. Prognostic impact of CXCR4 and CXCR7 expression in pancreatic adenocarcinoma. **Journal of surgical oncology**, v. 104, n. 2, p. 140-145, 2011.

GUEMBAROVSKI, Alda Losi et al. CXCL12 chemokine and CXCR4 receptor: association with susceptibility and prognostic markers in triple negative breast cancer. **Molecular biology reports**, v. 45, p. 741-750, 2018.

GUERGNON, J.; COMBADIÈRE, C. Role of chemokines polymorphisms in diseases. **Immunology letters**, v. 145, n. 1-2, p. 15-22, 2012.

HAAS, Gabriel P. et al. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. **The Canadian journal of urology**, v. 15, n. 1, p. 3866, 2008.

Haploreg v4.1. Disponível em: <<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>> Acesso em: 09 de fev. 2023.

INCA. Estatísticas de câncer. 2022a. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>>. Acesso em: 13 de fev de 2023.

INCA. Câncer de próstata. INCA. 2022b. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/prostata>>. Acesso em: 26 de jul de 2022.

JANSSENS, Rik; STRUYF, Sofie; PROOST, Paul. The unique structural and functional features of CXCL12. **Cellular & molecular immunology**, v. 15, n. 4, p. 299311, 2018.

KICIŃSKI, Michał; VANGRONSVELD, Jaco; NAWROT, Tim S. An epidemiological reappraisal of the familial aggregation of prostate cancer: a metaanalysis. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e27130, 2011.

KIM, Minah et al. CXCR4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche. **Cancer research**, v. 70, n. 24, p. 10411-10421, 2010.

LEE, Hyo Jin; JO, Deog Yeon. The role of the CXCR4/CXCL12 axis and its clinical implications in gastric cancer. **Histol Histopathol.** v. 27, p.1155-1161, 2012.

LÖBLER, Ricardo et al. Avaliação do Escore de Gleason como fator prognóstico em pacientes com câncer de próstata em hormonioterapia. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica.** Vol, v. 8, n. 27, 2012.

MAI, Rebekka et al. Different somatostatin and CXCR4 chemokine receptor expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms depending on their origin. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

MEDEIROS, Adriane Pinto de; MENEZES, Maria de Fátima Batalha de; NAPOLEÃO, Anamaria Alves. Fatores de risco e medidas de prevenção do câncer de próstata: subsídios para a enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, p. 385-388, 2011.

MENG, Wenfang; XUE, Shihang; CHEN, Ye. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. **Gene**, v. 641, p. 105-110, 2018.

MIGOWSKI, Arn; SILVA, Gulnar Azevedo. Sobrevida y factores pronósticos de pacientes con cáncer de próstata clínicamente localizado. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 2, p. 344-352, 2010.

MILITO, Miguel A. Biópsia da próstata transretal guiada por ultrassonografia: suas complicações e morbidade são subestimadas?. **Radiol Bras**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. vii, Apr. 2013.

MORTEZAEI, Keywan. CXCL12/CXCR4 axis in the microenvironment of solid tumors: A critical mediator of metastasis. **Life Sciences**, v. 249, p. 117534, 2020.

MOTTET, N. et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG. **Guidelines on Prostate Cancer**, 2020.

NCCN. Prostate Cancer: Advanced Stage. 2020. Disponível em:<<https://www.nccn.org/patients/guidelines/content/PDF/prostate-advanced-patient-PT.pdf>>. Acesso em: 31 de jul de 2022.

NGUYEN, Don X.; BOS, Paula D.; MASSAGUÉ, Joana. Metástase: da disseminação à colonização órgão-específica. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, pág. 274-284, 2009.

NIH – National Câncer Institute. 2022. Disponível em: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>>. Acesso em 27 de jul de 2022.

OKUYAMA KISHIMA, Marina et al. Genetic polymorphism and expression of CXCR4 in breast cancer. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2015, 2015.

OKUYAMA, Nádia Calvo Martins et al. CXCL12/CXCR4 axis gene variants contribute to an increased vulnerability to HPV infection and cervical oncogenesis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 148, n. 4, p. 793-802, 2022.

PALOMINO, Diana Carolina Torres; MARTI, Luciana Cavalheiro. Quimiocinas e imunidade. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, p. 469-473, 2015.

PANER, Gladell P. et al. Updates in the eighth edition of the tumor-node-metastasis staging classification for urologic cancers. **European urology**, v. 73, n. 4, p. 560-569, 2018.

PIERCE, Benjamin. A. Genética: um enfoque conceitual. reimpr. 2016.

POZZOBON, Tommaso et al. CXCR4 signaling in health and disease. **Immunology letters**, v. 177, p. 6-15, 2016.

REBBECK, Timothy R. Prostate cancer genetics: variation by race, ethnicity, and geography. In: *Seminars in radiation oncology*. WB Saunders, 2017. p. 3-10.

REGO, Renata Furletti Nunes Barros et al. Perfil clínico epidemiológico da população atendida num programa de rastreamento de câncer de próstata. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 18, n. 65, 2020.

SALVATORE, P. et al. CXCR4-CXCL12-dependent inflammatory network and endothelial progenitors. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 27, p. 3019-3029, 2010.

SANTOS, Viviane Cristine Tavares; MILITO, Miguel Angelo; MARCHIORI, Edson. O papel atual da ultra-sonografia transretal da próstata na detecção precoce do câncer prostático. **Radiologia Brasileira**, v. 39, p. 185-192, 2006.

SCALA, Stefania et al. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 5, p. 1835-1841, 2005.

SHENOY, Sudha K. Seven-transmembrane receptors and ubiquitination. **Circulation research**, v. 100, n. 8, p. 1142-1154, 2007.

- SHIROZU, Michio et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. **Genomics**, v. 28, n. 3, p. 495-500, 1995.
- SOUZA, Luccas Melo de; SILVA, Michelli Porto; PINHEIRO, Ingrid de Souza. Um toque na masculinidade: a prevenção do câncer de próstata em gaúchos tradicionalistas. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 32, p. 151-158, 2011.
- SRIGLEY, John R. et al. Controversial issues in Gleason and International Society of Urological Pathology (ISUP) prostate cancer grading: proposed recommendations for international implementation. **Pathology**, v. 51, n. 5, p. 463-473, 2019.
- STRIETER, Robert M. et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 27348-27357, 1995.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca Cancer Clin* 2021; 71: 209-49. **This report provides the latest global cancer statistics of incidence and mortality worldwide, 2022.**
- VIANA, Nayára Izabel. **Correlação entre polimorfismos genéticos relacionados á hereditariedade, fatores hormonais e o câncer de próstata.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2017.
- WINKLER, C. *et al.* Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science*, 279(5349), 389–393, 1998.
- WU, Yang et al. CXC motif chemokine receptor 4 gene polymorphism and cancer risk. **Medicine**, v. 95, n. 49, 2016.
- ZLOTNIK, Albert. Chemokines in neoplastic progression. In: *Seminars in cancer biology.* **Academic Press**, 2004. p. 181-185.

ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA ENVOLVENDO PESQUISA
COM SERES HUMANOS DA UEL



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	176/2013
CAAE:	19769913.0.0000.5231
Data da Relatoria:	19/09/2013
Pesquisador(a):	Ilce Mara de Syllos Cólus
Unidade/Órgão:	CCB - Departamento de Biologia Geral

Prezado(a) Senhor(a):

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"Estudo comparativo do perfil transcricional e genotípico de genes relacionados ao câncer de próstata entre indivíduos saudáveis e portadores desta neoplasia para o desenvolvimento de assinaturas gênicas com fins diagnósticos, prognósticos e terapêuticos."

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 27 de setembro de 2013. .

Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina



ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Ilce Mara de Syllos Cólus e Marilesia Ferreira de Souza da Universidade Estadual de Londrina o convidamos para nossa pesquisa e solicitamos sua colaboração e o seu consentimento para incluí-lo em nosso projeto de pesquisa “Estudo comparativo do perfil transcricional e genotípico de genes relacionados ao câncer de próstata entre indivíduos sadios e portadores desta neoplasia para o desenvolvimento de assinaturas gênicas com fins diagnósticos, prognósticos e terapêuticos”. O objetivo deste estudo é avaliar alguns fatores genéticos que possam auxiliar no diagnóstico, prognóstico e na terapia de pacientes portadores de câncer de próstata. Assim, solicitamos a sua colaboração como voluntário neste projeto onde vamos avaliar e comparar as semelhanças e diferenças entre dois grupos de pessoas: sadias e com câncer. Portanto, solicitamos a sua autorização para que uma pequena quantidade de seu sangue (10 ml) seja coletada via punção venosa (picada na veia) com seringa e agulha descartáveis. Esclarecemos que não haverá desconforto físico adicional para a sua pessoa, além da picada da agulha.

Caso o senhor tenha que realizar prostatectomia (operação de retirada parcial ou total da próstata), solicitamos também sua permissão para que, depois de realizada a cirurgia e da amostra da sua próstata ter sido utilizada pelo laboratório do Hospital para diagnóstico, possamos coletar uma pequena amostra deste tecido que não foi utilizado pelo Hospital, mas que fica armazenado. Desta forma, a coleta do material para análise genética ocorrerá somente após a finalização do seu diagnóstico e não trará riscos adicionais ao seu tratamento.

Pedimos sua autorização para que moléculas (DNA, RNA ou proteínas) obtidas a partir da amostra de sangue e/ou tecido possam ser armazenadas para estudos futuros no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, quando será solicitada nova autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEL para a realização das pesquisas posteriores. O material obtido ficará armazenado no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, sob responsabilidade dos pesquisadores responsáveis por esta pesquisa. Esclarecemos ainda que a autorização para manutenção destas amostras é por prazo indeterminado, podendo ser cancelada por aviso escrito à responsável pelo Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina.

Solicitamos também sua autorização para que possamos consultar seu prontuário médico (que fica no Hospital do Câncer de Londrina) e obter alguns dados clínicos. Solicitamos-lhe o preenchimento de um questionário sobre seu estilo de vida, histórico de exposição ocupacional, onde o senhor será identificado apenas por um código, preservando sua identidade. Este questionário ficará armazenado no laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina e somente poderão ter acesso a ele os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa.

Sua identidade não será revelada e será mantido o caráter confidencial de todas as informações obtidas. Esclarecemos que o senhor a qualquer momento tem a liberdade de se recusar a contribuir com o estudo, sem ser prejudicado no seu tratamento e acompanhamento médico. Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, preservando sua identidade.

Esclarecemos que sua participação é voluntária, não lhe trará nenhum gasto e que o senhor não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados desta pesquisa. Provavelmente os resultados desta pesquisa não trarão benefícios para a sua pessoa, mas poderão contribuir, no futuro, para uma melhora nos testes diagnósticos e prognósticos, assim como na conduta terapêutica para pacientes com câncer de próstata, melhorando assim, a qualidade de vida destes pacientes.

No caso de autorizado, o senhor deverá assinar este Termo de Consentimento.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo Ilce Mara de Syllos Cólus e Marilesia Ferreira de Souza, poderão ser contatados pelos telefones 3371-4608, 3371-4191, 9648-1918 ou no endereço rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Campus Universitário, Centro de Ciências Biológicas, Bloco 11, Laboratório de Mutagênese e Oncogenética. Sempre que solicitados, estarão à sua disposição para esclarecimento de quaisquer questões relacionadas a esta pesquisa. O senhor também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone 3371-2490 ou pelo endereço Rua Robert Koch, 60 – Vila Operária ou pelo e-mail:

cep268@uel.br.

Agradecemos-lhe a valiosa colaboração.

Prof^ª. Dr^ª. Ilce Mara de Syllos Cólus

Assinatura do pesquisador responsável

Marilesia Ferreira de Souza

Coletor / Entrevistador



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



Programa de
Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular

202120650001

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

DEFESA DE TESE DE MESTRADO

Discente: AMANDA LETÍCIA FRANCELINO

Título: Investigação de variantes alélicas polimórficas no eixo quimiocina receptor CXCL12/CXCR4 e da imunomarcagem de CXCR4 em amostras tumorais malignas de próstata metastáticas e não metastáticas

Data da Defesa: 13/04/2023, às 08:30 horas

Banca Examinadora

PRESIDENTE:

Dr^a. ROBERTA LOSI GUEMBAROVSKI PRESIDENTE - UEL

TITULARES:

Dr^a. MARLA KARINE AMARANTE - UEL

Dr^a. NADIA CALVO MARTINS OKUYAMA - UNICESUMAR

PARECER	
APROVADO	REPROVADO
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Parecer Final: Aprovada

Dr^a. ROBERTA LOSI GUEMBAROVSKI PRESIDENTE - UEL

Dr^a. MARLA KARINE AMARANTE - UEL

Dr^a. NADIA CALVO MARTINS OKUYAMA - UNICESUMAR