



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALEXSANDRO KOIKE

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES
COM HIPERPLASIA BENIGNA DA PRÓSTATA E
ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO:
ASSOCIAÇÃO COM O PROGNÓSTICO**

Londrina
2018

ALEXSANDRO KOIKE

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES
COM HIPERPLASIA BENIGNA DA PRÓSTATA E
ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO:
ASSOCIAÇÃO COM O PROGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini

Co-orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão

Londrina
2018

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

Koike, Alexsandro.

Avaliação do Estresse Oxidativo em Pacientes com Hiperplasia Benigna da Próstata e Adenocarcinoma Prostático: Associação com o Prognóstico / Alexsandro Koike. - Londrina, 2018.
77 f. : il.

Orientador: Rubens Cecchini.

Coorientador: Andréa Name Colado Simão.

dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Câncer de Próstata - . 2. Hiperplasia Benigna da Próstata - . 3. Estresse Oxidativo - .
4. Tióis Plasmáticos - . I. Cecchini, Rubens. II. Simão, Andréa Name Colado. III.
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

ALEXSANDRO KOIKE

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM
HIPERPLASIA BENIGNA DA PRÓSTATA E ADENOCARCINOMA
PROSTÁTICO:
ASSOCIAÇÃO COM O PROGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marco Aurélio de Freitas Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Isaias Dichi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 01 de outubro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que participaram deste estudo. Meus sinceros agradecimentos, pois sem eles, não haveria sentido de realizar tal trabalho.

Aos funcionários do Hospital Evangélico de Londrina, Hospital do Câncer de Londrina e da Clínica de Urologia Urolit, que tanto ajudaram na coleta dos exames, como tiveram paciência na triagem e abordagem dos pacientes.

Aos professores que compartilharam grande parte de seu tempo e sabedoria.

Aos colegas e amigos do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário de Londrina, especialmente à equipe de pós-graduandos que, de mutirão em mutirão, se reuniram para realizar as análises dos exames.

À Ana Gabriela da Silva Bonacini e à Brunna Emanuella França Robles, amigas, participantes ativas neste projeto e que tanto tiveram paciência comigo.

Meus sinceros agradecimentos ao professor Rubens Cecchini, que me concedeu a honra de ser seu orientado.

À Doutora Andréa Name Colado Simão que tanto me ensinou, orientou e teve a paciência de me acompanhar nesta trajetória.

Aos meus pais e irmãos que me ajudaram a chegar aqui com ensinamentos e doces lembranças da família.

E por fim, agradeço à Léia, minha esposa, e à Júlia, minha filha, que são a razão da minha vida, de proporcionar a mim a força para buscar sempre o meu melhor.

KOIKE, Alexsandro. **Avaliação do estresse oxidativo em pacientes com hiperplasia benigna da próstata e adenocarcinoma prostático: associação com o prognóstico.** 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O estresse oxidativo (EO) é um fator importante no desenvolvimento e na progressão da hiperplasia prostática benigna (HPB) e do adenocarcinoma de próstata (CaP). A alta prevalência dessas 2 patologias, frequentemente coexistentes, leva a busca por novos biomarcadores para melhorar o diagnóstico do CaP. Após a introdução do PSA na década de 80, a incidência do CaP teve um aumento expressivo e, através do diagnóstico precoce, o número de sobretratamento de doença indolente também aumentou. Portanto, a necessidade de diferenciar a doença indolente da agressiva é primordial. Desse modo, os objetivos deste estudo foram: 1º) Avaliar os perfis de estresse oxidativo entre pacientes com diagnóstico de HPB e CaP; 2º) Identificar biomarcadores de estresse oxidativo que pudessem diferenciar a HPB do CaP; 3º) Verificar se biomarcadores de EO poderiam ser utilizados como preditores de prognóstico e estadiamento do CaP. Este é um estudo prospectivo de caso-controle constituído de 204 pacientes sendo, 73 pacientes com CaP, 67 pacientes com HPB e 64 voluntários saudáveis definidos como grupo controle (HC). Foram dosados em amostras de sangue: o antígeno prostático específico (PSA); hidroperóxidos lipídicos (CL-LOOH); proteína carbonila plasmática (PCB); produtos avançados de oxidação protéica (AOPP); capacidade antioxidante total pelo método TRAP e dosagem de grupos tióis protéicos (SH). Verificou-se que os diagnósticos (HC vs HPB vs CaP) foram significativamente associados à relação do PSA com o EO. Os níveis de SH foram significativamente menores no CaP que no HC e na HPB, enquanto que não houve diferenças significativas entre a HPB e o HC. AOPP foi significativamente aumentado nos pacientes com HPB e CaP em comparação ao HC, enquanto que a PCB foi maior no CaP do que no HC e HPB. Os níveis de CL-LOOH nos glóbulos vermelhos (mas não no plasma) foram significativamente mais altos tanto na HPB e CaP do que no HC. Os níveis de TRAP foram menores no CaP quando comparados com o HC. Melhor correlação diagnóstica do CaP foi obtida utilizando PSA total e SH combinados com PCB, sendo que 91,1% dos casos foram corretamente classificados com sensibilidade de 85,7% e especificidade de 94,0%. As mesmas três variáveis renderam também uma boa predição de CaP versus HPB, sendo 87,1% de todos os casos corretamente classificados com sensibilidade de 87,3% e especificidade de 86,9%. Este estudo demonstrou uma associação robusta entre vários biomarcadores com a fisiopatologia do CaP e sua progressão. Os níveis de SH foram um preditor de diagnóstico e poderia ser usado em conjunto com a medição do PSA para o rastreamento de pacientes com HPB e CaP, melhorando a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico. Este é o primeiro estudo a propor modelos utilizando biomarcadores de estresse oxidativo, dados clínicos e laboratoriais para prever prognóstico no CaP.

Palavras-chave: Grupos tiólicos plasmáticos. Estresse oxidativo. Câncer de próstata. Hiperplasia prostática benigna.

KOIKE, Alexsandro. **Evaluation of oxidative stress in patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma: association with prognosis.** 2018. 77 p. Dissertation (Master Degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2018.

ABSTRACT

Oxidative stress (OS) is an important factor in the development and progression of benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa). The high prevalence of these diseases, often coexisting, leads to the search for new biomarkers to improve the diagnosis of PCa. After the introduction of PSA in the 80's, the incidence of PCa increased significantly and, through early diagnosis, the number of overtreatment of indolent disease increased too. Therefore, the need to differentiate between indolent and aggressive is necessary. Thus, the objectives of this study were: 1^o) Evaluate the oxidative stress profiles among patients diagnosed with BPH and PCa; 2^o) Identify oxidative stress biomarkers that could differentiate BPH from PCa; 3^o) Verify if OS biomarkers could be used as predictors of prognosis and staging of PCa. This is a prospective case-control study consisting of 204 patients, with 73 patients with PCa, 67 patients with BPH and 64 healthy volunteers defined as control group (HC). In blood samples were dosed: prostate specific antigen (PSA); lipid hydroperoxides (CL-LOOH); plasma carbonyl protein (PCB); advanced protein oxidation products (AOPP); total antioxidant capacity by the TRAP method and dosage of protein thiol groups (SH). It was found that diagnoses (HC vs BPH vs PCa) were significantly associated with the PSA to OS ratio. SH levels were significantly lower in PCa than HC and BPH, whereas there were no significant differences between BPH and HC. AOPP was significantly increased in patients with BPH and PCa compared to HC, whereas PCB was higher in PCa than HC and BPH. CL-LOOH levels in red blood cells (but not plasma) were significantly higher in both BPH and PCa than HC. TRAP levels were lower in PCa when compared to HC. The best diagnostic correlation of PCa was obtained using total PSA and SH combined with PCB, and 91.1% of the cases were correctly classified with sensitivity of 85.7% and specificity of 94.0%. The same three variables also yielded a good prediction of PCa versus BPH, with 87.1% of all cases being correctly classified with sensitivity of 87.3% and specificity of 86.9%. This study demonstrated a robust association between several biomarkers with the pathophysiology of PCa and its progression. SH levels were a diagnostic predictor and could be used in conjunction with PSA measurement for the screening of patients with BPH and PCa, improving the sensitivity and specificity of the diagnosis. This is the first study to propose models using oxidative stress biomarkers, clinical and laboratory data to predict prognosis in PCa.

Key Words: Plasma thiol groups. Oxidative stress. Prostate câncer. Benign prostatic hyperplasia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espécies Reativas ao Oxigênio e evolução à malignidade	15
Artigo	30
Figura 1 – <i>Association between Total Prostate-Specific Antigen (tPSA) and thiol group (SH) values</i>	58
Figura 2 – <i>Values of Total Prostate-Specific Antigen (tPSA) / O&NS (oxidative and nitrosative stress) biomarkers in controls and patients with benign prostate hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa)</i>	59
Figura 3 – <i>Biomarkers in patients with metastasis versus all other participants</i>	60
Figura 4 – <i>Biomarkers in patients with a suspicious rectal examination versus a normal examination</i>	61
Figura 5 – <i>Biomarkers in PCa patients divided according to AV groups. Data were transformed into z score. Data are shown in +/- standard error</i>	62

LISTA DE TABELAS

Artigo	30
Tabela 1 –	<i>Demographic, clinical and biomarker data in controls, patients with prostate hyperplasia (BPH) and prostate carcinoma (PCa)</i>	52
Tabela 2 –	<i>Results of multivariate Generalized Linear Model analysis with biomarkers as dependent variables</i>	53
Tabela 3 –	<i>Model-generated estimated marginal means of the significant biomarkers as well as results of post-hoc comparisons in controls (HC) and patients with benign prostate hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa)</i>	54
Tabela 4 –	<i>Results of binary logistic regression analysis with prostate cancer (PCa), metastasis and an suspicious digital rectal examination as dependent variables</i>	55
Tabela 5 –	<i>Results of ROC analysis</i>	56
Tabela 6 –	<i>Results of multiple regression analysis with prostate size and ultrasound and total Prostate-Specific Antigen (PSA) as dependent variables</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOPP	Produtos Avançados de Oxidação Protéica
AR	Receptor Androgênico
BT	Braquiterapia
CAT	Catalase
CaP	Câncer de Próstata
cGMP	Guanosina Monofosfato Cíclico
CL-LOOH	Hidroperóxidos Lipídicos
Cu	Cobre
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EBRT	Radioterapia Externa
EO	Estresse Oxidativo
ERN	Espécies Reativas ao Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas ao Oxigênio
GSH	Glutathiona Reduzida
GST	Glutathiona S Transferase
GSH-P	Glutathiona Peroxidase
GSH-R	Glutathiona Redutase
H ₂ O ₂	Peróxido de Oxigênio
HC	<i>Health Control</i> ou Grupo Controle
HDR	Taxa de Alta Dose
HOCl	Ácido Hipocloroso
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido Nitrico Sintase Induzível
MDA	Malondialdeído
NAC	N-Acetil-Cisteína
NO	Óxido Nítrico
NO ₂	Nitrito
NO ₃	Nitrato

ONOO-	Peroxinitrito
OH-	Radical Hidroxila
OS	<i>Oxidative Stress</i>
O ₂ -	Radical Superóxido
O ₂ .	Oxigênio Singleto
PCB	Proteína Carbonílica
PSA	Antígeno Prostático Específico
RNA	Ácido Ribonucléico
RO-	Radical Alcoxil
ROO-	Radical Peroxil
SH	Grupos Tióis
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade Antioxidante Total Equivalente
TRAP	<i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i>
TWIST1	Twist-Proteína 1 Relacionada
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
YB-1	<i>Y-Box Binding Protein 1</i>
Zn	Zinco
8-isoPGF _{2α}	8-Iso Prostaglandina F2-Alfa
8-OHdG	8-Hidroxi-Deoxiguanidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Próstata	11
1.2	Hiperplasia Prostática Benigna	11
1.3	Câncer de Próstata	12
1.4	Estresse Oxidativo	14
1.5	Alteração do Estado Redox em Pacientes com Hiperplasia Prostática Benigna	16
1.6	Alteração do Estado Redox em Pacientes com Câncer de Próstata	17
1.7	Alteração do Estado Redox, Hiperplasia Prostática Benigna e Câncer de Próstata	22
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo Geral	26
3.2	Objetivo Específico	26
4	SUJEITOS E MÉTODOS	27
5	RESULTADOS	30
6	CONCLUSÕES	63
7	REFERÊNCIAS	64
8	ANEXOS	74
8.1	Anexo 1 – Ficha de Coleta	74
8.2	Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Próstata

A próstata é uma glândula que faz parte do sistema urogenital masculino e está localizada em posição inferior à bexiga e anterior ao reto. Ela circunda a uretra proximal e participa na produção de secreções seminais. Sua secreção corresponde a cerca de 20% do volume do ejaculado. O restante é produzido quase que totalmente pelas vesículas seminais. A próstata pode ser dividida em zona de transição, central, periférica e a parte anterior formada por um estroma fibromuscular (McNEAL, 1981).

A glândula prostática depende de hormônios esteróides para ter um adequado desenvolvimento e estímulo para a sua função secretora. Esse processo é estimulado pela testosterona e pela di-hidrotestosterona que têm a função primordial no desenvolvimento prostático (McGINLEY et al., 1992).

Na infância, a próstata tem um volume pequeno, cerca de 7cm^3 aos 9 anos. Ao início da adolescência, cessa-se a dormência hormonal e inicia-se o aumento do seu volume, concomitante com a sua produção glandular alcançando um tamanho de cerca de $15\text{-}20\text{ cm}^3$ na fase adulta. Após os 30 anos, a velocidade de crescimento é de cerca de $0,5\text{ cm}^3$ por ano podendo se acelerar nos portadores de hiperplasia benigna da próstata (HPB). Com o avanço da idade surgem alterações no tecido prostático associado a outras doenças da próstata, decorrente não só pelo aumento de volume, como alterações histológicas. As duas formas clinicamente mais importantes e prevalentes do crescimento anormal da próstata são a HPB e o câncer da próstata (CaP) (XIA et al., 2002).

1.2 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A HPB se caracteriza por um processo histológico proliferativo dos elementos celulares da próstata, aumento volumétrico (principalmente da zona de transição) e a disfunção miccional resultante do seu aumento e da obstrução infravesical. A prevalência histológica da HPB é de aproximadamente 40% dos homens com 50 anos e de 80% em homens acima de 80 anos. A sintomatologia nem sempre é concomitante ao volume prostático. Cerca de 50% dos homens com HPB desenvolverão aumento volumétrico e somente 25-50% apresentarão sintomas urinários decorrentes da obstrução mecânica causada pelo aumento de volume (AARON et al., 2016). Basicamente, os sintomas provenientes das alterações prostáticas decorrem da combinação de 2 alterações (aumento volumétrico e alterações fibromusculares). O tecido muscular periuretral presente no colo vesical, cápsula prostática e estroma fibromuscular são ricas em receptores alfa 1 adrenérgicos. Estes são participantes ativos na gênese dos sintomas através da sua

contração e levam à obstrução do lúmen da uretra prostática. Além disso, a hiperplasia da parte adenomatosa prostática da zona de transição e periuretral leva a compressão mecânica da uretra prostática. Sintomas urinários irritativos (urgência, polaciúria) podem ser devidos à presença do crescimento da zona periuretral para o interior da bexiga causando a hiperatividade do detrusor (WALSH et al., 2002).

O tratamento da HPB se baseia no alicerce obstrução mecânica/dinâmica e sintomas irritativos. O uso de medicamentos alfa bloqueadores atuam no relaxamento da atividade muscular periuretral diminuindo a compressão uretral. Agentes que atuam nos receptores adrenérgicos alfa 1 específicos como a Tamsulosina têm sido utilizados com maior efetividade pelos menores efeitos de hipotensão postural (LEPOR et al., 2011).

O uso de inibidores da enzima 5 alfa redutase (como Finasterida e Dutasterida), atuam na inibição da conversão da testosterona em dihidrotestosterona. Conseqüentemente, levam à diminuição do estímulo da proliferação glandular e sua conseqüente hipotrofia glandular e diminuição do volume prostático (DHINGRA et al., 2011).

1.3 Câncer de Próstata (CaP)

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) a incidência estimada para o biênio 2018-2019 no Brasil será de aproximadamente 68.220 casos. O CaP, depois dos tumores de pele não melanoma, é o mais incidente entre homens de todas as regiões do país, com incidência estimada para este biênio de 96,85 homens/100 mil no Sul; 66,75/100 mil no Centro-Oeste; 69,83/100 mil no Sudeste; 56,17/100 mil no Nordeste e 29,41/100 mil no Norte. No estado do Paraná, em 2016, houve 5.260 casos diagnosticados com CaP. No Brasil houveram 14.484 mortes pelo tumor no ano de 2015 (INCA, 2017). No mundo, a incidência é altamente variável, ocorrendo variações na ordem de 25 vezes (4,4 casos por 100.000 habitantes na Índia a até 118,2 casos por 100.000 habitantes nos Estados Unidos). Há múltiplos fatores atuantes, que vão desde características demográficas e genéticas à eficiência do sistema de saúde pública para o diagnóstico da doença (CENTER et al., 2012).

O CaP tornou-se um sério problema de saúde pública no Brasil, em função de suas altas taxas de incidência e mortalidade (AMORIM et al., 2011). No mundo, o número de casos novos do CaP vem aumentando a cada ano, sendo atualmente a quarta neoplasia mais frequente quando considerada ambos os sexos (INCA, 2017). Já a mortalidade do CaP tem diminuído nos países mais desenvolvidos. A causa desse decréscimo ainda é desconhecida, mas pode ser devida ao aumento do tratamento e do diagnóstico precoce pela introdução do PSA (CHU et al., 2003). Há também uma considerável variação da relação incidência:mortalidade no mundo, sendo mais alta nos países da América do Norte

(7,6:1), mais baixa no norte da Europa (4,5:1) e quase igualitária em países da África (1,4:1) (WONG et al., 2016). Essas discrepâncias podem estar relacionadas às características regionais, populacionais e a um maior acesso ao rastreamento, o que leva ao diagnóstico precoce da doença e maior probabilidade de cura (JOHANSSON et al., 2004). Por outro lado, o aumento do diagnóstico de tumores de baixa agressividade tem levado ao aumento da morbidade decorrente do tratamento sem aumento da sobrevida global dos pacientes (ETZIONI et al., 2002; ALBERTSEN et al., 2005).

Diversos fatores têm sido apontados como determinantes para o aumento da incidência do CaP: melhora no atendimento básico às populações; aumento de campanhas informativas e preventivas de identificação da doença; aumento na expectativa de vida e a evolução dos métodos diagnósticos. A introdução do antígeno prostático específico (PSA) em meados da década de 80 como marcador para o CaP foi, dentre todos os marcadores tumorais, o que talvez tenha tido o maior impacto na história na incidência de uma neoplasia. Desde então, houve um aumento exponencial do diagnóstico em todos os países na qual seu uso se estabeleceu (WONG et al., 2016).

Em relação aos fatores de risco para o CaP, a idade é o principal fator (STANGELBERGER et al., 2008; PAIVA et al., 2010). BELL e colaboradores (2015) numa revisão sistemática de 29 estudos, englobando o período de 1948 a 2013 em autópsias de pacientes, demonstrou que o CaP aumenta com a idade variando de uma prevalência de 5% em pessoas com menos de 30 anos, à cerca de 59% em indivíduos com mais de 79 anos de idade. A história familiar é outro fator bem conhecido (CARTER et al., 1992). A chance de um indivíduo ter CaP, antes dos 75 anos de idade quando há 1 irmão com CaP, é 2 vezes maior que o da população geral e o risco é de 9% de ter um CaP de alto risco. Quando há 1 irmão e seu pai com CaP, a probabilidade aumenta 3 vezes e, a probabilidade desse câncer ser de alto risco praticamente dobra (BRATT et al., 2016). Em relação à raça, estudos epidemiológicos mostram que afro-americanos tem maior incidência, apresentam-se em idade mais precoce, são mais propensos a doença localmente avançada ou com metástases e doença de alto risco em relação aos caucasianos-americanos (PIETRO et al., 2016; SMITH et al., 2017). Outros fatores também apontados para o CaP são o componente genético (COOK et al., 2014), a presença de síndrome metabólica (LAUKKANEN et al., 2004), gordura saturada e carne vermelha (KIMURA et al., 2018), obesidade (MACINNIS et al., 2003) e doenças inflamatórias (SFANOS et al., 2012).

1.4 Estresse Oxidativo (EO)

Durante o processo metabólico fisiológico de uma célula, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são produzidas. O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes e que podem levar à geração excessiva de ERO e ERN com potencial dano celular (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

Os principais exemplos destas espécies são o oxigênio molecular (O_2), radical hidroxil (OH^\cdot), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical peroxil (ROO^\cdot), radical alcoxil (RO^\cdot), óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (AHSAN et al., 2003; ROSA e COIMBRA, 2009; HALLIWELL, 2015).

As ERO e as ERN podem afetar diversas moléculas biológicas como o DNA (Ácido Desoxirribonucleico), RNA (Ácido Ribonucléico), proteínas, lipídeos e carboidratos, além de promover lesões secundárias devido aos metabólitos formados durante a oxidação lipídica. (BARREIROS et al., 2006).

Para antagonizar os efeitos deletérios das ERO e ERN, o organismo desenvolveu um sistema de defesa antioxidante, que tem a função de limitar os níveis intracelulares e extracelulares de espécies reativas e inibir ou reduzir os danos celulares e teciduais (AHSAN et al., 2003).

Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente dos sistemas enzimáticos com essa função. O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, estando presentes tanto no organismo, localizados no interior das células ou nos compartimentos extracelulares (VASCONCELOS et al., 2007).

As principais enzimas antioxidantes são a superóxido-dismutase (SOD), catalases (CAT) e glutationa-peroxidase (GSH-P) (BIANCHI e ANTUNES, 1999; HALLIWELL, 2015).

Dos componentes não-enzimáticos que participam das defesas antioxidantes destacam-se alguns minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e ferro), vitaminas (ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A), carotenóides (betacaroteno, licopeno e luteína), bioflavonóides (genisteína, quercetina) e taninos (catequinas) (BIANCHI e ANTUNES, 1999; VALKO et al., 2007).

Fatores de origem endógena e exógena podem promover a geração de EROs e podem atuar no DNA, levando a alterações cromossômicas e conseqüentemente à carcinogênese. Outra via de ação das EROs seriam alterações em fatores transcricionais que acabam por levar a perpetuação celular da célula neoplásica já gerada (figura1) (SAHA et al., 2017). Estudos ainda apontam um papel do estado redox em vários processos

celulares associados à proliferação celular e à transformação neoplásica (MEHRAEINGHOMI et al., 2008; WOŹNIAK et al., 2012). A lesão tecidual da próstata e o estresse oxidativo podem levar a proliferação celular com crescimento hiperplásico, migração celular, além de iniciar e propagar processos oncogênicos (KHANDRIKA et al., 2009; MINCIULLO et al., 2015).

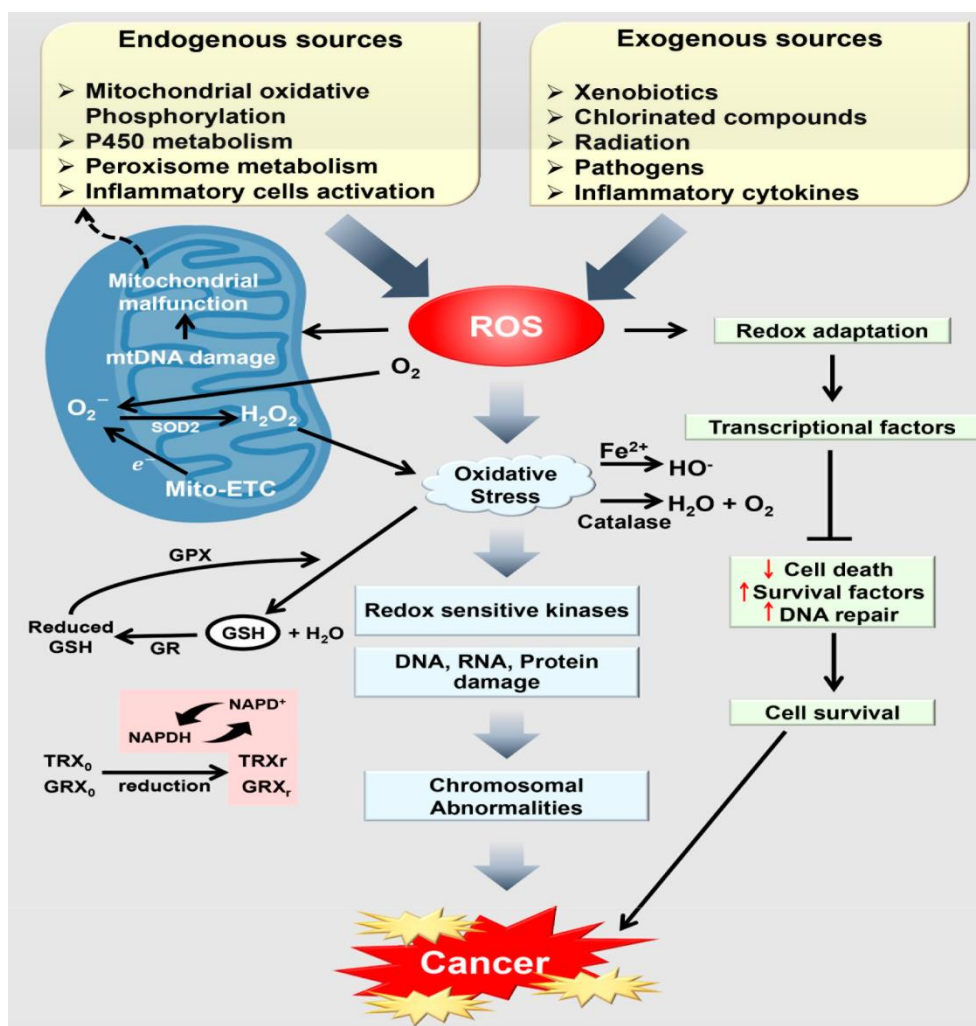


Figura 1 – Espécies Reativas ao Oxigênio e Evolução à Malignidade. A geração de espécies reativas ao oxigênio podem levar a danos ao DNA, gerando anormalidades cromossômicas e afetar fatores de transcrição que levam à transformação neoplásica e perpetuação celular.

DNA: desoxyribonucleic acid; e⁻: eletron; Fe²⁺: ferrous iron; GSH: Glutathione reduced; GR: Glutathione redutase; GPX: Glutathione peroxidase; GRX: Glutaredoxin; HO[•]: Hydroxyl radical; Mito-ETC: mitochondrial electron transport chain; mtDNA: mitochondrial deoxyribonucleic acid; NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced; O₂⁻: superoxide radical; ROS: reactive oxigen species; RNA: ribonucleic acid; SOD: superoxide dismutase; TRX: Thioredoxin

Fonte: adaptado de SAHA et al., 2017.

O HPB e o CaP são comumente associados a uma mudança no equilíbrio redox, resultando em estresse oxidativo. Vários estudos têm demonstrado a associação do estresse oxidativo no desenvolvimento e progressão da HPB e do CaP (SARAFINOVSKA et al., 2009; BATTISTI et al., 2011; WOŹNIAK et al., 2012; ROUMEGUERE et al., 2017).

1.5 Alteração do Estado Redox em Pacientes com Hiperplasia Prostática Benigna

Em relação à HPB, vários estudos têm demonstrado sua relação com o desequilíbrio redox (KULLISAAR et al., 2012; VITAL et al., 2016).

O excesso da formação das EROs podem levar a lesão das membranas celulares através da lipoperoxidação lipídica. As EROs atacam os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos das membranas, levando a perda da seletividade de trocas iônicas e moleculares, liberação de enzimas de organelas e formações de derivados citotóxicos, como o Malondialdeído (MDA). O MDA é o produto de lipoperoxidação mais estudado e sua dosagem pode ser feita pela sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), um processo inespecífico já que outras substâncias também reagem com esse ácido, ou, pode ser dosada por cromatografia, uma metodologia mais específica. Níveis elevados de MDA têm sido encontrados em pacientes com HPB. Em 2003, Merendino e colaboradores encontraram níveis aumentados de MDA no plasma de 22 pacientes com HPB em comparação a 22 indivíduos saudáveis, além de uma correlação positiva entre os níveis de PSA total e MDA. Estes dados representam a primeira evidência do aumento dos níveis de MDA circulante em pacientes com HPB. Resultado semelhante foi encontrado por ARYAL e colaboradores (2007), que avaliaram o EO em 48 pacientes com HPB e 46 indivíduos saudáveis (controles). Os níveis de MDA, determinados pela metodologia de TBARS, estavam aumentados em pacientes com HPB, enquanto houve uma redução nos níveis de vitaminas C e E quando comparados aos controles. Esses dados sugerem o desequilíbrio redox presente nesta doença.

VITAL e colaboradores (2016) utilizando amostras de tecido de próstatas humanas, avaliou os níveis de 8-OHdG (8-hidroxi-deoxiguanidina, um marcador oxidativo de dano de DNA) na zona de transição hiperplásica em comparação com amostras de próstatas normais. Esses tecidos foram retirados de adenomectomias prostáticas de 32 pacientes com HPB. Os tecidos da zona de transição hiperplásica continham níveis maiores de 8-OHdG do que os tecidos da zona de transição normal. Além disso, os níveis de 8-OHdG foram correlacionados com o peso da próstata. Os autores concluíram que o estresse oxidativo e o dano oxidativo do DNA são importantes na patogênese da HPB.

Em outro trabalho, também de 2016, ZABAIU e colaboradores avaliaram o estado redox diretamente de tecidos prostáticos de pacientes com HPB. Para isso, foram avaliados 24 pacientes entre 58 e 85 anos submetidos a adenomectomia prostática. De acordo com a massa da hiperplasia benigna estimada por ultrassom, os pacientes foram divididos em quatro grupos: grupo 1 (6 indivíduos) com próstatas de peso estimado de 20-40g; grupo 2 (6 indivíduos) com próstatas de 41-60g; grupo 3 (6 indivíduos), próstatas de 61-80g; e grupo 4 (6 indivíduos), próstatas com peso estimado de mais de 100g. Os pacientes do primeiro grupo, os quais tiveram a menor massa de HPB foram recrutados como controles. Este estudo verificou que próstatas maiores apresentavam níveis de MDA maiores e, em próstatas menores, níveis de antioxidantes e glutathiona menores. Além disso, as enzimas SOD e catalase (CAT) também apresentaram diminuição nos grupos 3 e 4. Os achados do presente estudo sugere que o desenvolvimento da HPB é acompanhado de aumento do estresse oxidativo.

1.6 Alteração do Estado Redox em Pacientes com Câncer de Próstata

Vários estudos têm mostrado a relação do estresse oxidativo/nitrosativo na etiologia do câncer tais como, mama (NOURAZARIAN et al., 2014), intestino (BHATTACHARYYA et al., 2014) e próstata (ROUMEGUERE et al., 2017).

Durante a última década, estudos experimentais (SHIOTA et al., 2012) e clínicos (PANDE et al., 2013) têm implicado o estresse oxidativo no desenvolvimento e progressão do CaP. Acredita-se que o aumento das ERO possam levar à transformação oncogênica e modular a resposta celular das células neoplásicas levando a proliferação celular, expansão clonal seletiva e metástase (KUMAR et al., 2008, HOLL et al., 2016).

SURAPANENI e colaboradores (2006) avaliaram níveis de peroxidação lipídica e o estado antioxidante em pacientes com CaP. Neste estudo foram avaliados 30 pacientes com CaP e 30 indivíduos saudáveis com média de 60 anos de idade. Observou-se que os pacientes com câncer de próstata apresentaram níveis reduzidos de GSH e níveis aumentados de MDA quando comparados ao grupo controle. A atividade da SOD também estava aumentada nos pacientes com câncer quando comparados ao grupo controle. Os autores sugerem que o estresse oxidativo estaria envolvido no CaP. Além disso, sugerem que o aumento da atividade enzimática poderia ser uma regulação compensatória em resposta ao dano oxidativo.

WOZNIAK e colaboradores (2012) avaliaram os marcadores de estresse oxidativo no CaP em 60 pacientes submetidos a altas doses de braquiterapia (BT) com radioterapia externa (EBRT). Amostras de sangue foram coletadas antes do tratamento, logo em

seguida, depois de 1,5-3 meses do término do tratamento e aproximadamente 2 anos de sua finalização. O grupo controle foi constituído por 30 homens saudáveis. Atividade da GSH-P nos pacientes com CaP estava reduzida em todos os períodos (34%, 50%, 30% e 61%, respectivamente) quando comparada àquela obtida em indivíduos saudáveis. Após 2 anos do término do tratamento, a atividade das enzimas estudadas demonstraram uma tendência decrescente em relação anterior à terapia. A concentração de TBARS em eritrócitos em pacientes com CaP foi maior em todos os momentos e, após 2 anos do término do tratamento, os níveis de TBARS eritrocitário reduziram e foi semelhante ao observado no grupo controle, o que sugere uma tendência a normalização dos processos de oxidação-redução sistemicamente. No entanto, a concentração plasmática de TBARS não diminuiu, demonstrando que uma restauração completa do balanço oxidante-antioxidante não foi obtida. Desta forma, os autores concluíram que dois anos poderiam não ser um período de tempo suficiente para que os processos de oxidação-redução atinjam níveis semelhantes aos controles.

Em uma metanálise, publicada no ano de 2016, OH e colaboradores avaliaram 23 estudos caso-controle que determinaram diversos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com câncer de próstata. Em 21 estudos, os controles foram indivíduos saudáveis (sendo que, em 2 deles, foram indivíduos saudáveis com biópsias negativas para câncer de próstata) e, em outros 2 estudos, os caso-controle foram indivíduos com HPB. Esses estudos abrangeram um total de 6377 pacientes, sendo 3558 pacientes portadores de câncer de próstata. Uma variedade de marcadores oxidantes e antioxidantes foram avaliados por esses trabalhos, sendo o MDA, SOD e a GSH-P os mais estudados. Dos 23 estudos, 21 relataram pelo menos 1 marcador de Estresse Oxidativo (EO) alterado nos pacientes com CaP em relação aos grupo-controle. Quatorze estudos mostraram que o MDA estava aumentado no CaP. Um estudo relacionou níveis de MDA em pacientes com tumores pobremente diferenciados (Gleason maior que 8). Dois estudos encontraram níveis de Isoprostanos aumentados em pacientes com câncer. Para avaliar a peroxidação de proteínas, 3 estudos encontraram metabólitos do NO aumentados e outros 3 estudos também encontraram níveis de 8-OhdG aumentados nos pacientes com CaP. Onze estudos avaliaram marcadores de antioxidantes endógenos, sendo que desses estudos: 5 mostraram baixos níveis de atividade de SOD (contrastando com 2 estudos mostraram o contrário e 1 sem diferença estatística); 6 estudos mostraram níveis de atividade da CAT baixa (contrastando com 2 estudos sem diferença na atividade da CAT); 4 estudos mostraram baixo níveis de GSH nos pacientes com câncer (contrastando com 2 que mostraram níveis maiores); 7 estudos mostraram níveis de atividade de GSH-P diminuídos e

2 estudos mostraram níveis de atividade de GST aumentados. Os níveis de MDA e a atividade do SOD e GSH-P foram utilizados para efeito de comparação na meta-análise. Destes: 3 estudos, o MDA foi significativamente mais alto nos pacientes com câncer de próstata; o níveis de atividade da GSH-P foi mais baixa nos pacientes com CaP e; a atividade da SOD não diferiu entre os pacientes com CaP e grupos controle. Nesta meta-análise, os autores destacaram a limitação da comparação dos níveis de estresse oxidativo dos pacientes com câncer de próstata com seus controles. Fatores como obesidade, tabagismo, poluição, radiação poderiam ter influenciado no balanço redox e ser fatores confundidores que não foram controlados nesses estudos.

BATTISTI e colaboradores (2011) avaliaram 55 pacientes diagnosticados com CaP com base na avaliação histológica e 55 homens saudáveis com idades e condições sociais semelhantes. Para fins de análise, os pacientes com CaP foram subdivididos em grupos diferentes para cada um dos quatro parâmetros distintos: presença ou ausência de metástases, o tratamento padrão (sem tratamento prévio, acetato de goserelina, ou acetato de ciproterona) e pontuação de Gleason. Foram analisados as concentrações plasmáticas de TBARS, proteína carbonílica sérica, CAT e SOD, níveis de tióis não protéicos e os níveis séricos de vitamina C e E. A atividade da CAT e os níveis de vitamina C e vitamina E foram reduzidos em pacientes com CaP quando comparado com os controles. Os níveis de TBARS, proteína carbonílica e a atividade da SOD foram maiores no grupo com CaP. Os níveis de tióis não-protéicos (incluindo o GSH) estavam aumentados em relação ao grupo controle. E, quando comparados pacientes com metástases ósseas em relação aos de doença localizada, os níveis de tióis também foram aumentados. Este estudo sugere evidências que o nível de estresse oxidativo está alterado nos pacientes com CaP e que pacientes com tumores mais agressivos apresentam intensidade maior de estresse oxidativo em relação a tumores menos agressivos.

PANDE e colaboradores (2013) também avaliaram a relação entre o estresse oxidativo e a agressividade do câncer. Este estudo analisou 40 pacientes com CaP e 40 indivíduos saudáveis com idades entre 64 a 68 anos. Foram medidos níveis de 8-OHdG, proteína carbonílica, MDA, capacidade antioxidante total sérica avaliada pela metodologia de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), índice de proliferação celular e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). Eles verificaram que, comparando valores entre pacientes com CaP e o grupo controle, os níveis séricos de 8-OHdG, proteína carbonílica, MDA, índice de proliferação celular, níveis de VEGF foram maiores e, o TEAC foi menor nos pacientes nos pacientes com CaP. Achado semelhante e significativo também foi encontrado em relação aos níveis de PSA, estadiamento e grau de indiferenciação celular

(medido pelo Escore de Gleason) entre os pacientes com câncer. O trabalho verificou que quanto maior o PSA, estadiamento e o Gleason, maiores foram os valores de 8-OHdG, proteína carbonílica, MDA, Índice de proliferação celular e VEGF, e menores os de TEAC. Esses achados mostram que o desequilíbrio redox, a piora do índice de proliferação celular e o aumento do VEGF estão presentes no câncer de próstata e se relacionam com a progressão da doença.

A associação da atividade oxidativa com a evolução tumoral poderia indicar métodos de tratamento do câncer prostático. Autores têm buscado compreender esse mecanismo para tratamentos que levem ao equilíbrio redox e, com isso, controle da doença. IYNEM e colaboradores (2004) analisaram o sangue de 21 pacientes com metástase de CaP, antes e após 3 meses da terapêutica antiandrogênica. Esses pacientes foram comparados com um grupo controle de 20 indivíduos sem CaP. Os resultados mostraram que os níveis de GSH de eritrócitos, as atividades da GSH-R e da GSH-P e os níveis de vitamina E plasmáticos foram menores em pacientes com CaP quando comparados com o grupo controle. Os níveis de MDA estavam aumentados nos pacientes com CaP em relação ao grupo controle. Porém, após 3 meses do início da terapia antiandrogênica nos pacientes com câncer de próstata metastático, houve diminuição no nível de MDA plasmático e aumento na atividade de GST quando comparado ao estado inicial. Portanto, os autores concluíram que a terapia antiandrogênica nos pacientes com CaP metastático poderia diminuir o estresse oxidativo nesses pacientes.

Um estudo publicado em 2004, MIYAKE e colaboradores avaliaram o dano oxidativo do DNA (através da medição da 8-OHdG urinária) em 82 pacientes com CaP, antes e após 2 meses do tratamento, e em 33 homens saudáveis. Destes 82 pacientes, 42 foram submetidos a prostatectomia radical e 40 receberam terapia hormonal. A proporção de 8-OHdG na urina em pacientes com CaP foi maior que no grupo controle. Houve uma redução nos níveis de 8-OHdG urinário após 2 meses de tratamento hormonal. Nos 42 pacientes que foram operados, não houve alteração dos níveis de 8-OHdG pré e após 2 meses da realização da cirurgia. Esses achados mostram que o estresse oxidativo está presente nos pacientes com câncer e que a sua supressão poderia ser uma estratégia para inibir a progressão do CaP.

Em relação à evolução do câncer prostático resistente à castração, SHIOTA e colaboradores (2012) investigaram se o uso de antioxidantes poderia impedir a evolução para o estado de resistência à castração. Estes autores realizaram um estudo prospectivo com 31 indivíduos com CaP e que foram submetidos a prostatectomia radical, analisaram culturas com células neoplásicas LNCaP e 22Rv1 *in vitro*; e inoculação dessas células

neoplásicas LNCaP e células 22Rv1 em ratos (espécie *NCr-nu/nu*). Os indivíduos foram separados em um grupo submetido à terapia de supressão androgênica neoadjuvante e outro não. A cultura celular e a inoculação celular foram expostas ou não a andrógenos (com e sem andrógenos e orquiectomia ou não). Foram também expostos a NAC (N-acetilcisteína, um antioxidante). As amostras dos tecidos e células prostáticas neoplásicas foram submetidas a análise imunohistoquímica para avaliar a expressão do fator de transcrição TWIST1, YB-1 e de receptores de androgênios (AR). Esse trabalho demonstrou que a terapia antiandrogênica leva a superexpressão dos fatores TWIST1, YB1 e dos receptores de androgênios, fato que tende a progredir para a resistência a andrógenos. Além disso, nas células expostas a NAC, observou-se a supressão do crescimento das células neoplásicas. Isso poderia indicar que o estresse oxidativo teria um papel importante na evolução do tumor e, que o uso de antioxidantes poderiam ter um papel na prevenção da evolução para a resistência tumoral antiandrogênica.

A relação de marcadores oxidativos na evolução pré-carcinogênica foi investigada por BARROCAS e colaboradores (2011). Estes avaliaram os níveis de F2-isoprostanos na urina de 496 pacientes que foram submetidos a biópsia de próstata por suspeita de câncer. Os pacientes que apresentaram câncer de próstata e neoplasia intraepitelial de alto grau (lesão pré maligna) tinham níveis de F2-isoprostanos urinários maiores do que os obtidos em pacientes sem diagnóstico de câncer na biópsia, sugerindo que o processo oxidativo estaria presente nos casos evolutivos para a malignidade.

A análise de isoprostanos na urina de pacientes com câncer de próstata também foi realizada por BRYS e colaboradores (2012). Este estudo analisou níveis de 8-isoPGF_{2α} (8-iso prostaglandina F2-alfa) urinária em 304 pacientes com câncer de próstata e o comparou a um grupo controle de 233 indivíduos saudáveis. A amostra urinária de 8-isoPGF_{2α} foi colhida antes da biópsia de próstata. Os pacientes com câncer foram divididos em 3 grupos pelo Escore de Gleason (Grupo I: Gleason 2 a 4; Grupo II: Gleason 5 a 7; Grupo III: Gleason 8 a 10) e pelo estadiamento da doença após a prostatectomia radical (pT1-2N0M0; pT3-4N0M0 e pTxN1 ou M1). Foram encontrados níveis maiores de 8-isoPGF_{2α} nos pacientes com câncer em relação ao grupo controle. Em relação os níveis de 8-isoPGF_{2α} ao Escore de Gleason e estadio da doença, os autores encontraram níveis maiores de 8-isoPGF_{2α} urinário estatisticamente significativos em Escore de Gleason maior e em estadios mais avançados quando comparados a Gleason e estadios menores. Desta forma, os autores sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel na fisiopatologia do câncer prostático.

1.7 Alteração do Estado Redox, Hiperplasia Prostática Benigna e Câncer de Próstata

Alguns estudos compararam o estado redox em pacientes com HPB e pacientes com CaP (KAYA et al., 2017; SRIVASTAVA e MITTAL, 2005).

KLOTZ e colaboradores (1998) avaliaram a presença de anticorpos contra a enzima óxido nítrico síntase induzível (iNOS) por imunohistoquímica no tecido prostático de 16 pacientes com CaP e compararam com a mesma técnica no tecido prostático de 10 pacientes com HPB. O tecido neoplásico apresentou alto índice de iNOS, enquanto o tecido benigno não. Com isso eles demonstraram que o iNOS poderia ser usada como marcador na imunohistoquímica para o CaP. O autor sugere que a geração de NO no CaP poderia causar citotoxicidade como resultado de um mecanismo de defesa imune. Isso levaria ao aumento do fluxo sanguíneo e promoção da angiogênese mediado por produção prolongada e excessiva de NO e que posteriormente levaria à proliferação celular neoplásica.

YILMAZ e colaboradores (2004) buscaram avaliar os níveis séricos de MDA, Cu eritrocitário, Zn eritrocitário e a atividade do GSH-P e SOD entre pacientes com câncer de próstata e HPB. Eles analisaram 21 pacientes diagnosticados com CaP de acordo com a biópsia, 50 pacientes com HPB submetidos a ressecção transuretral da próstata e 50 indivíduos saudáveis com idades entre 64 a 66 anos. Os pacientes com CaP foram divididos clinicamente em 2 grupos pela classificação TNM: doença órgão confinada (cT1-2N0M0) e doença avançada (\geq cT3). Também foram divididos em 3 grupos de acordo com a biópsia: bem diferenciado (Gleason 2 a 4); moderadamente (Gleason 5 a 7) e pouco diferenciado (Gleason 8 a 10). Nos pacientes com câncer foi verificado que os níveis de MDA estavam aumentados e os níveis de Zn estavam diminuídos em relação aos pacientes com HPB e controle. A atividade do GSH-P e do SOD estavam diminuídas em relação ao grupo controle. A análise comparativa de acordo com o estadiamento do tumor demonstrou que os níveis de MDA estavam aumentados, enquanto os níveis do Zn e a atividade da SOD estavam diminuídos nos pacientes com doença avançada em relação a aqueles com doença órgão confinada. Em relação ao nível de indiferenciação tumoral avaliada pelo Gleason, não houve diferença na atividade da GSH-P. No entanto, a atividade do SOD e os níveis de Zn foram menores e, os níveis de MDA maiores nos tumores pouco diferenciados em comparação aos tumores bem e moderadamente diferenciados. Os autores concluíram que a atividade da SOD e da GSH-P e, os níveis de MDA e Zn poderiam ser ferramentas adequadas para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com CaP.

SRIVASTAVA e MITTAL (2005) analisaram o estado pró-oxidante/antioxidante em 45 pacientes com CaP, 55 com HPB e 25 indivíduos controle. Foram observados elevados

níveis de MDA e de atividade do GST em pacientes com CaP e HPB em comparação ao grupo controle. No entanto, a concentração de GSH e a atividade de GSH-P foram menores nos pacientes com CaP e HPB em comparação ao grupo controle. Os autores sugerem que a geração de radicais livres, como refletida pelo aumento da atividade de GST, e o dano oxidativo, demonstrado pelo aumento dos níveis de MDA em CaP e pacientes com HPB, poderiam ser utilizados como marcadores de prognóstico para essas doenças.

AYDIN e colaboradores (2006) em um estudo longitudinal prospectivo na Turquia, avaliaram marcadores de estresse oxidativo em pacientes com CaP e HPB. Foram selecionados 25 pacientes recém-diagnosticados com câncer de próstata, 36 pacientes com HPB e um grupo controle com 24 indivíduos saudáveis. Os pacientes com CaP e HPB não tinham histórico de nenhum tipo de tratamento prévio para as suas enfermidades. Foram analisados os níveis eritrocitários de TBARS, Cu, Zn, e a atividade das enzimas CuZn-SOD, CAT e GSH-P dos 3 grupos. Este estudo encontrou concentrações de TBARS aumentada e atividade da GSH-P e CuZn-SOD diminuídas em pacientes com CaP em relação aos grupos HPB e controle. Esses resultados demonstram que alterações na lipoperoxidação lipídica e diminuição da atividade de enzimas antioxidante estão presentes no CaP.

Posteriormente, no ano de 2009, este mesmo grupo de pesquisadores, avaliando pacientes provenientes da Turquia e Macedônia, avaliaram o estresse oxidativo/nitrosativo e a atividade das enzimas antioxidantes em pacientes com CaP e HPB. Foram selecionados 312 homens de duas populações distintas: 163 indivíduos da Macedônia (73 pacientes com CaP, 67 com HPB e 23 indivíduos controles) e 149 indivíduos provenientes da Turquia (34 pacientes CaP, 100 com HPB e 15 indivíduos controle). Um padrão semelhante de alteração nos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo/nitrosativo foi encontrado nos dois grupos estudados, macedônios e turcos. Pacientes com CaP apresentaram aumento nos níveis de MDA (avaliado pelo método por TBARS), NO₂/NO₃ (avaliados pelo método de Griess) e cGMP e, redução da atividade da GSH-P quando comparados aos grupos controles e HPB. Este estudo confirmou um desequilíbrio no estado redox e revelou aumento do estresse nitrosativo em pacientes com CaP (SARAFINOVSKA et al., 2009).

GOSWAMI e colaboradores (2007) investigaram níveis séricos de ácido siálico, um carboidrato presente na parte terminal de algumas proteínas inflamatórias de fase aguda. Neste estudo, foram avaliados pacientes submetidos a biópsia de próstata por suspeita de câncer, sendo 10 com câncer e 10 pacientes sem câncer e com diagnóstico de HPB na biópsia. Dez indivíduos saudáveis foram categorizados como controle. Foram avaliados níveis séricos de TBARS, níveis de proteína carbonílica, ácido siálico sérico, proteínas totais e PSA. Os autores encontraram nos pacientes com CaP, níveis de peróxidos lipídicos,

proteína carbonílica e ácido siálico significativamente aumentados em relação aos pacientes do grupo controle e também em relação aos pacientes com HPB. Concluem que o dano oxidativo é maior nos pacientes com CaP e que os níveis de ácido siálico poderiam ser um marcador para diferenciar o HPB do CaP.

PACE e colaboradores (2010) analisaram marcadores oxidativos em amostra de sangue de 15 pacientes portadores de HPB, 15 com CaP e 15 indivíduos controle. Foram dosados níveis de peróxidos plasmáticos totais (método cromatográfico), capacidade antioxidante equivalente total (TEAC) e atividade de SOD. A TEAC foi menor nos pacientes com CaP e HPB em relação ao grupo controle. Os níveis de peróxidos plasmáticos foram maiores nos pacientes com CaP e HPB em relação ao grupo controle. Foi encontrada uma correlação inversa entre peróxidos e TEAC em pacientes com HPB ($r=-0.821$; $p=0,023$). Contrariamente, observou-se uma correlação direta entre os níveis de peróxidos plasmáticos e a TEAC em pacientes com CaP ($r=0.627$; $p=0,039$). De acordo com os autores, em pacientes com HPB, a atividade antioxidante é capaz de neutralizar o aumento dos radicais livres (neste caso, os níveis de peróxidos) às custas do esgotamento dos níveis de TEAC. Diferentemente, em pacientes com CaP, as defesas antioxidantes são capazes de neutralizar o dano oxidativo (visto pela diminuição dos níveis de peróxidos) nas fases iniciais da carcinogênese, levando a uma diminuição dos níveis de TEAC. Esses dados confirmam o desequilíbrio redox em pacientes afetados pela HPB e CaP e sugerem um potencial envolvimento do estresse oxidativo como na patogênese dessas doenças.

KOSOVA e colaboradores (2014) determinaram os níveis séricos de MDA, 8-OHdG e caspase-3 (sinalizadoras de apoptose celular) em 20 pacientes com HPB e 20 pacientes com CaP. Os níveis de MDA e 8-OHdG estavam aumentados no grupo CaP quando comparado ao grupo HPB. No entanto, os níveis de caspase-3 foram mais baixos nos pacientes com CaP comparado com os de HPB. A perda da expressão das caspases levariam a um desequilíbrio morte-proliferação celular e, conseqüentemente, participação no processo da carcinogênese da célula prostática numa fase pré maligna. Os autores sugerem que esses marcadores seriam importantes no diagnóstico e monitoramento no tratamento do câncer.

Um estudo recente publicado por KAYA e colaboradores (2017) compararam parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em 128 participantes com média de idade entre 45 a 68 anos, sendo 30 pacientes com CaP, 41 com HPB, 26 pacientes com prostatite e 30 indivíduos controles (saudáveis). Foram encontradas aumento de MDA nos pacientes com CaP quando comparadas aos demais grupos. Observou-se também uma maior atividade de CAT em pacientes com CaP quando comparados com HPB e com o grupo

controle. Estes dados mostraram um aumento do estresse oxidativo em pacientes com CaP quando comparados com pacientes com HPB e grupo controle. Portanto, o desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante parece levar a um aumento do dano oxidativo, conseqüentemente desempenha um papel importante na fisiopatologia do HPB e CaP.

Concluindo, diversos estudos demonstram a presença de estresse oxidativo em HPB e CaP, tanto por aumento das ERO quanto pela deficiência do sistema antioxidante. Estes estudos mediram diversos marcadores de estresse oxidativo com o HPB e CaP, demonstrando que a maioria dos marcadores estão aumentados no HPB e CaP em relação a grupos controles. O marcador mais estudado para avaliar a peroxidação lipídica foi o MDA, enquanto a atividade das enzimas antioxidantes foram CAT, SOD e GSH. Evidências crescentes indicam que as ERO e ERN desempenham um papel importante na patogenia da próstata, mas estudos ainda são necessários para avaliar se esses parâmetros poderiam ser usados para fazer um diagnóstico diferencial ou prever o prognóstico de pacientes com CaP. Além disso, alguns autores destacam a limitação da comparação dos níveis de estresse oxidativo dos pacientes com HPB e CaP com seus controles, já que outros fatores como obesidade, tabagismo, doenças metabólicas concomitantes, hábitos alimentares, estilo de vida, poluição, radiação poderiam influenciar no balanço redox e, conseqüentemente, serem fatores confundidores.

2. JUSTIFICATIVA

Em tempos de escassez de recursos financeiros e aumento da sobrevida da população, o câncer de próstata se tornou um grande problema de saúde pública, não só pela sua grande incidência e prevalência, mas também pelo alto custo decorrente do seu tratamento e de suas complicações. O aumento da longevidade populacional por si só, criou uma quantidade populacional enorme de doentes, que carecem de acompanhamento médico e que só tende a aumentar com o envelhecimento da população. Há na comunidade científica atual a busca de vários biomarcadores (genéticos, laboratoriais, radiodiagnósticos) para melhorar o diagnóstico e auxiliar no tratamento do CaP. Ao mesmo tempo que a taxa de sobrevida global do doente com câncer de próstata diagnosticado e tratado em fases precoce aumentou, cresce também o número de sobretratamento de tumores indolentes. Ou seja, têm existido um aumento muito grande dos casos de pacientes tratados por CaP que não morreriam pela doença. Isso tem elevado os custos decorrentes do tratamento (custos laborais, financeiros, psicológicos e sociais). Portanto, a necessidade de se encontrar um biomarcador que possa diagnosticar precisamente o CaP e diferenciá-lo de tumores realmente agressivos e de prognóstico fatal, se faz com extrema importância.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de marcadores de estresse oxidativo em pacientes com HPB, CaP e indivíduos saudáveis. Nos paciente com CaP, verificar a associação dos biomarcadores com fatores prognósticos.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar os marcadores de estresse oxidativo em pacientes com CaP, HPB e indivíduos saudáveis;
- Determinar quais biomarcadores de estresse oxidativo estão associados à presença de CaP e HPB;
- Verificar quais biomarcadores de estresse oxidativo diferenciam HPB de CaP;
- Propor modelos preditores de diagnóstico e prognóstico de CaP;

4 SUJEITOS E MÉTODOS

Delineamento do Estudo

Este é um estudo transversal onde foram selecionados 73 pacientes com diagnóstico de CaP confirmado por biópsia, recrutados pelo Ambulatório de Urologia do Hospital do Câncer de Londrina e do Hospital Evangélico de Londrina, 67 indivíduos com HPB recrutados pelo Ambulatório de Urologia do Hospital Universitário de Londrina e 64 indivíduos controles, selecionados entre pacientes que compareceram para o preventivo de rotina em consultório particular.

O tamanho da amostra foi calculado para um poder estatístico de 80% e significância estatística com $p < 0,05$, e com o objetivo de identificar uma diferença estatística nas variáveis entre os grupos de pelo menos 10%. Foi utilizado o programa estatístico G Power Windows^R.

Todos os participantes deste estudo foram selecionados, respeitando-se os seguintes critérios:

a) critérios de inclusão:

- idade entre 35 e 69 anos;
- os participantes do grupo controle deveriam apresentar volume prostático de até 30cm^3 (medidos pela ultrassonografia transabdominal) e PSA total $< 1,5\text{ ng/mL}$;
- pacientes com HPB deveriam ter a próstata com volume superior a 30cm^3 medida pela ultrassonografia;
- pacientes com CaP deveriam ter o diagnóstico confirmado por biópsia.

b) critérios de exclusão:

- uso de medicamentos anti-inflamatórios;
- uso de suplementos antioxidantes;
- presença de doenças inflamatórias agudas e/ou crônicas;
- presença de doenças infecciosas agudas e/ou crônicas;
- história prévia de outros cânceres e;
- insuficiência renal crônica.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE: 56182916.7.0000.5231).

Análises Laboratoriais

A coleta de sangue dos pacientes foi realizada após 8 horas de jejum. Todos os pacientes com CaP, na data da colheita dos exames, tinham o diagnóstico há pelo menos 60 dias (prazo médio entre o encaminhamento do serviço à data do tratamento oncológico).

As amostras de sangue foram centrifugadas à 3.500 rpm e o plasma aliquoteado e congelado à -80°C para posterior avaliação. As hemácias foram lavadas 3 vezes com solução salina 0,9% e utilizadas para avaliação de estresse oxidativo.

Análises Imunológicas e Hematológicas

A determinação de PSA total e sua fração livre foram realizados por quimioluminescência em micropartículas no equipamento Architect (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Os níveis séricos de Proteína C Reativa (PCR) de alta sensibilidade foram determinados por turbidimetria. A velocidade de hemossedimentação (VHS) foi avaliada por automação (Ves-MaticCUBE 30, DIESSE, Siena, Italy). A análise de ferritina foi efetuada em um auto-analisador bioquímico (Dade AR®), utilizando-se kits Dade Behring®.

Avaliação do Estresse Oxidativo

- **QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR T-BUTIL HIDROPERÓXIDOS (QM):** os níveis plasmáticos e eritrocitários de hidroperóxidos lipídicos foram avaliados por quimioluminescência induzida por tert-butil hidroperóxido de acordo com a metodologia proposta por Flecha e colaboradores (1990). A QM estimulada por t-butil hidroperóxido foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidante não enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos. A avaliação plasmática avalia principalmente a formação de hidroperóxidos lipídicos oriundos da oxidação de partículas de LDL oxidada enquanto a avaliação eritrocitária avalia principalmente a lipoperoxidação de lipídeos presentes na membrana celular (Simão *et al.*, 2006).

- **DETERMINAÇÕES DE PROTEÍNA CARBONÍLICA PLASMÁTICA:** foram determinados de acordo com o método de Levine e colaboradores (1990). Os valores foram expressos em nmoles/mg de proteína.

- **DETERMINAÇÕES DE PRODUTOS AVANÇADOS DA OXIDAÇÃO PROTÉICA (AOPP):** foram determinados no plasma de acordo com o método proposto por Witko-Sarsat e colaboradores (1998). Os valores foram expressos em μ moles/L de equivalente de cloramina.

- **CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PLASMÁTICA:** foi determinada no plasma e nos eritrócitos de acordo com a metodologia de TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) segundo Repetto e colaboradores (1996). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma. Os resultados foram expressos em uM de Trolox/MG.

- **DETERMINAÇÃO DE GRUPAMENTOS TIÓIS PROTÉICOS:** A quantificação de grupamentos Tióis (SH) de proteínas foi avaliada no plasma por espectrofotometria, de acordo com o método descrito por Hu (1994). Esta técnica baseia-se na reação do ácido 2,2 ditiobisnitrobenzólico (DTNB) com o grupo tiol das proteínas, como descrito previamente por REZNICK e PACKER (1994). Os resultados foram expressos em μM .

Análise Estatística

O teste de Análise de Variância (ANOVA) foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. A análise das tabelas de contingência (X²-teste) foi utilizada para verificar associações entre as variáveis nominais. Foi realizada a análise de regressão logística binária para delinear as variáveis mais significativas que predizem o CaP versus controles e/ou a HPB, ajustando para possíveis fatores confundidores (incluindo idade, sexo, MetS). O modelo linear generalizado multivariado (GLM) foi utilizado para avaliar os efeitos de variáveis explicativas (incluindo o diagnóstico) sobre os biomarcadores, sendo controlado para possíveis fatores confundidores. Testes para efeitos entre indivíduos foram usados para avaliar os efeitos de variáveis explicativas significativas nos biomarcadores separadamente. A média marginal estimada do modelo estimado (SE) foram calculados com base na análise GLM multivariada e análises *posthoc* protegidas e foram empregadas para verificar as diferenças entre o CaP, o HPB e os controles. Os resultados de múltiplas comparações foram corrigidos para falsas taxas de descoberta (BENJAMINI e HOCHBERG, 1995). A análise ROC foi usada para calcular a área sob a curva ROC (AUC ROC). As análises estatísticas foram realizadas usando o IBM SPSS Windows versão 22.0. Os testes foram bicaudais e um nível alfa de 0,05 indicou um efeito estatisticamente significativo. *Support Vector Machine* (SVM) com função de base radial do núcleo foi usada para calcular os casos de CaP e de controle corretamente classificados usando biomarcadores como variáveis explicativas (*Unscrambler*) após 10 vezes de validação cruzada.

5. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação foram apresentados no artigo intitulado “Thiol Group as a Biomarker for the Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer” que será submetido posteriormente à periódico científico com QUALIS A1 ou A2.

Thiol Groups as a Biomarker for the Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer

ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress (OS) may trigger the development of prostate carcinoma (PCa). The aims of this study are to identify OS biomarkers which could help diagnose and prognose for PCa.

Subjects and Methods: This prospective case-control study recruited 204 subjects, 73 patients with PCa, 67 patients with prostatic benign hyperplasia (BPH), and 64 healthy volunteers (HC). Clinical examination, prostate-specific antigen (PSA) test and assays of Tert-Butyl Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence (CL-LOOH), plasmatic carbonyl protein (PCB), advanced oxidation protein products (AOPP), total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) and protein thiol groups (SH) were performed.

Results: PCa was significantly associated with PSA/OS biomarkers explaining 43.2% of their variance. PCa was characterized by lowered SH and red blood cell TRAP levels and higher PSA, AOPP and PCB levels as compared with BPH or HC. Support vector machine with 10-fold cross-validation showed that both PSA values together with SH, PCB and AOPP yielded a training accuracy of 97.8% and a validation accuracy of 96.34% for the differentiation of PCa from BPH and HC. The areas under the ROC curve using PSA and SH with or without PCB and differentiating PCa from BPH and controls were both 0.945. Lowered SH is associated with metastasis and high risk groups for progression.

Conclusion: This study shows a robust association between OS biomarkers and PCa and its progression. An algorithm based on SH and PSA values may be used to differentiate patients with PCa from those without.

Key Words: Plasma thiol groups; oxidative stress; prostate cancer; benign prostatic hyperplasia.

Introduction

Benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa) are the most frequent prostatic diseases in aging men. After non-melanoma skin cancer, PCa is the most common malignancy in men. Age represents the major risk factor for the occurrence of BPH as well as PCa. Other reported risks factors in PCa are familial history [1], genetic background [2,3], ethnicity [4], lifestyle and habitual dietary intake [5] and obesity [6]. The hypothesis of chronic prostatic inflammation as a risk factor is debated and could be considered one of the possible conditions associated with BPH, PCa or both [7,8]. However, Metabolic Syndrome (MetS) has been related to BPH but not to PCa [9]. In PCa patients, the presence of MetS seems to be related to more aggressive tumors [10].

Oxidative stress (OS) is one of the mechanisms that trigger the development and progression of BPH [11] and PCa [12,13]. In addition, increased age is also associated with activated OS pathways [14]. Reactive oxygen species (ROS) are associated with carcinogenesis through structural DNA damage, interaction with oncogenes or tumor suppressor genes and/or immunological mechanisms [11,15]. In addition, ROS could be responsible for the formation of DNA adducts, for example with malondialdehyde (MDA), a product of the peroxidation of polyunsaturated fatty acids. Any oxidative lesion which is not repaired can lead to mutations, increasing the risk of carcinogenesis and the extent of ROS-induced oxidative damage can be exacerbated by a decreased efficiency of antioxidant defense mechanisms [16].

Some studies have found increased levels of MDA in patients with BPH and PCa when compared with HC [17,18]. Meanwhile, the level of total SH is associated with aging and progression of PCa. A comparison of the levels of SH, an important participant in the antioxidant system, in BPH and PCa showed that aging influences a moderate reduction of SH in BPH patients, while in PCa patients, concentration was significantly lower [19].

In the initial stages of the PCa, differential diagnosis with BPH is not an easy task [20]. Increased tPSA values, which is the most frequent laboratorial biomarker used to identify prostatic changes [21], has moderate sensitivity to discriminate the two conditions as well as for identifying metastasis prediction [22].

The search for new biomarkers to differentiate BPH and PCa as well as to differentiate indolent prostate cancer from the more aggressive subtype is necessary. In addition, the side-effects of treatment for indolent tumors may cause increased morbidity as well as worsening

quality of life without improving overall global survival, whilst treatment delay may lead to incurable disease [23]. The examination of OS pathways in the pathogenesis of BPH and PCa may delineate the mechanisms that contribute to the pathogenesis of PCa and may provide new drug targets to treat PCa.

Hence, the main goal of this study is to identify biomarkers of OS that could differentiate BPH and PCa. The second goal is delineate which OS stress biomarkers may be used, in the clinical practice, as predictors of PCa prognosis to improve the sensitivity and specificity of existing biomarkers.

Subjects and Methods

This is a prospective case-control study that consisted of 204 subjects, 73 patients with PCa diagnosed at the Uro-Oncology Clinic of the Cancer Hospital of Londrina and 67 patients with BPH diagnosed at the Urology Clinic of the Evangelical Hospital of Londrina; 64 healthy volunteers participated in the study as the control group (HC). Patients included in this study were diagnosed with PCa based on histological evaluation (positive biopsy results) and the blood collected occurred until one week before the surgery. Only 9 patients had metastasis (12%). BPH patients had prostate volume greater than 30 cm³ (measured by transabdominal ultrasound) and all were followed at the Urology Ambulatory. Informed consent was given by all the patients included in this work. The Human Ethics Committee from the State University of Londrina approved the protocol of the study (CAAE 56182916.7.0000.5231). PCa group was subdivided according to the risk stratification National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines [24]: AV group1: very low and low risk group; AV group2: favorable and unfavorable intermediate risk group; AV group3: high and very high risk group. All participants of this study were selected according as inclusion criteria: a) age within 35 to 69 years; b) the participants in the HC had prostate volume until 30 cm³ (measured by transabdominal ultrasound) and tPSA < 1.5 ng/mL. Exclusion criteria were: a) use of anti-inflammatory drugs; b) use of antioxidant supplements; c) presence of inflammatory diseases and/or acute or chronic infection; d) prior history of other cancers and; e) chronic renal insufficiency. MetS was defined following the Adult Treatment Panel III criteria, where MetS is present if three or more of the following five criteria are met: 1) waist circumference over 94 cm; 2) fasting triglyceride levels greater than or equal to 150 mg/dL; 3) high density lipoprotein (HDL) lower than 40 mg/dL; 4) blood

pressure over 130/85 mmHg (or antihypertensive medication use) and; 5) fasting glucose levels greater than or equal to 100 mg/dL or the use of hypoglycemic medication [25].

Anthropometric measurements

Body weight was measured prior to blood collection, using electronic scales accurate to 0.1 kg, with patients wearing light clothing and no shoes; height was measured to a precision of 0.1 cm using a stadiometer. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. Waist circumference was measured with a soft tape in the region between the last rib and the iliac crest, always in the orthostatic position.

Laboratorial analysis

The samples of all biochemical and oxidative stress analysis were taken with EDTA as anticoagulant and antioxidant. Collecting tubes with a standard anticoagulant concentration (0.5 mL of EDTA for each 4.5 mL of the blood sample) were used for collection. Samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 min and stored in plasma and serum aliquots at -70 °C until used in laboratory tests. tPSA and fPSA were performed by microparticle chemiluminescence in the Architect (ABBOTT®) equipment. Serum levels of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were determined by turbidimetry. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) and, ferritin and uric acid levels were determined by auto-analyser Ves-MaticCUBE 30® and Dade Behring® equipments respectively.

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

Lipid hydroperoxides were evaluated as described by FLECHA et al., 1991 [26]. The results were expressed in relative light units (RLU).

Determinations of plasmatic carbonyl protein (PCB)

The method used for its quantification in plasma was spectrophotometric, based on the reaction of 2,4-dinitrophenylhydrazine with the carbonyl group, forming 2,4-dinitrophenylhydrazone, according to the technique described by REZNICK and PACKER, 1994 [27]. The results were expressed in nM/mg of total proteins.

Determination of advanced oxidation protein products (AOPP)

It was determined according to the method of WITKO-SARSAT et al., 1998 [28]. The values were expressed in $\mu\text{M/L}$ of T-chloramine equivalent.

Total plasma antioxidant capacity

It was evaluated by TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter) methodology described by REPETTO et al., 1996 [29]. The methodology detects hydro and liposoluble antioxidants present in the plasma. The results were expressed in μM of Trolox.

Determination of protein thiol groups (SH).

The quantification of SH of proteins was determined by spectrophotometry, according to the method described by Hu [30]. This technique is based on the reaction of the 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) with the thiol group of proteins, such as described by REZNICK AND PACKER, 1994 [27]. The results were expressed in μM .

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to assess between-group differences in scale variables. Analysis of contingency tables (X^2 -test) was used to check associations between nominal variables. We used binary logistic regression analysis to delineate the most significant variables predicting CAP versus controls and or BPH while adjusting for possible confounders (including age, MetS, BMI). Multivariate general linear model (GLM) analysis was used to assess the effects of explanatory variables (including diagnosis) on the biomarkers while controlling for possible confounders. Tests for between-subject effects were used to assess the effects of significant explanatory variables on the separate biomarkers. Model-estimated estimated marginal mean (SE) values were calculated based on the multivariate GLM analysis and protected post hoc analyses were employed to check differences between PCa, BPH and HC. We p-corrected results of multiple comparisons for false discovery rate (BENJAMIN and HOCHBERG, 1995) [31]. Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis was used to compute the area under the ROC curve (AUC ROC). Statistical analyses were performed using IBM SPSS Windows version 22. Tests were 2-tailed, and an alpha level of 0.05 indicated a statistically significant effect. Support Vector Machine (SVM) with radial basis kernel function was used to compute the correctly classified CAP and control cases using biomarkers as explanatory variables (The Unscrambler) after 10-fold cross-validation.

Results

Demographic data

Table 1 shows the demographic, clinical and biomarker data in HC, BPH and PCa patients. BPH and PCa patients were somewhat older than normal controls while there were

no significant differences in familial history of PCa, BMI, smoking rate, hypertension, and diabetes between the three groups. There were significantly more non-Caucasians people in the PCa group as compared with the BPH and control group, while BPH was associated with a greater rate of MetS as compared with controls. This table also shows the measurements of the PSA, O&NS and immune-inflammatory biomarkers in the three study groups. Table 1 shows the results of simple ANOVAs with protected post-hoc analysis but without any adjustment for the effects of extraneous variables. Therefore, we would suggest focusing on Tables 2 and 3 to interpret the adjusted biomarker data.

The intercorrelation matrix between the biomarkers showed that tPSA was significantly associated with LOOH in RBCs ($r=0.157$, $p=0.028$, $n=196$), AOPP ($r=0.172$, $p=0.014$, $n=203$), SH ($r=-0.527$, $p<0.001$, $n=204$), and TRAP in RBC ($r=-0.298$, $p<0.001$, $n=151$). **Figure 1** shows the strong association between tPSA and SH values. There was a significant relationship between fPSA and tPSA ($r=0.825$, $p<0.001$, $n=204$), SH ($r=-0.422$, $p<0.001$, $n=204$) and TRAP in RBCs ($r=-0.243$, $p=0.003$, $n=151$). Uric acid was significantly and positively correlated with TRAP in plasma ($r=0.539$, $p<0.001$, $n=181$), but less with TRAP in RBCs ($r=0.177$, $p=0.030$, $n=151$). AOPP was significantly correlated with PCB ($r=0.211$, $p=0.003$, $n=201$). There was only a modest correlation between TRAP in plasma and RBCs ($r=0.200$, $p=0.014$, $n=151$). tPSA and fPSA were not significantly associated with any of the immune-inflammatory variables (CRP, ferritin, ESR, WBCs). SH levels were significantly associated with ESR ($r=-0.279$, $p<0.001$, $n=194$) and Hb ($r=-0.334$, $p<0.001$, $n=195$) (data not shown).

Differences in biomarkers between PCa, BPH and HC

Figure 2 shows the values of PSA / O&NS biomarkers (all in z values) in HC and patients with BPH and PCa. **Table 2** shows the results of multivariate GLM analysis with the biomarkers as dependent variables while adjusting for background variables including age, BMI and MetS. The TRAP data were assessed separately because TRAP was measured in a subset only (which would yield a considerable lowered number of df's). Also the immune-inflammatory markers were entered separately because they reflect another construct. Multivariate GLM analysis #1 shows that diagnosis (HC vs BPH vs PCa) was significantly associated with PSA/O&NS biomarkers explaining 43.2% of the variance (after adjusting for age, BMI and MetS). Diagnosis had a significant impact on tPSA (46.7% of the variance), fPSA (18.9%), SH (37.5%), AOPP (11.0%), PCB and LOOH in RBCs (both <10.0%). These

differences (as well as those in both TRAP levels) remained significant after p-correction. **Table 3** shows the model-generated estimated marginal means of the significant biomarkers as well as the results of post-hoc comparisons. tPSA and fPSA were significantly different between the three subgroups and increased from HC → BPH → PCa. SH levels were significantly lower in PCa than in HC and BPH, whereas there were no significant differences between BPH and HC. AOPP was significantly increased in BPH and PCa as compared with HC, whereas PCB was higher in PCa than in HC and BPH. LOOH levels in RBCs (but not plasma) were significantly higher in both BPH and PCa than in HC. Multivariate GLM analysis #2 and Table 3 shows that diagnosis had a significant impact on TRAP in RBCs (but not plasma) with lower TRAP levels in PCa than in HC. Multivariate GLM analysis #3 (Table 2) shows that there were no significant effects of diagnosis on the immune-inflammatory biomarkers.

Effects of background variables

Age is significantly associated with tPSA ($r=0.311$, $p<0.001$, $n=204$), fPSA ($r=0.328$, $p<0.001$, $n=204$) and SH ($r=-0.402$, $p<0.001$, $n=204$). BMI is significantly associated with tPSA ($r=-0.158$, $p=0.024$, $n=203$), fPSA ($r=-0.177$, $p=0.011$, $n=203$), LOOH plasma ($r=-0.227$, $p=0.001$, $n=203$), and uric acid ($r=0.224$, $p=0.001$, $n=203$). ESR was significantly associated with age ($r=0.174$, $p=0.016$, $n=194$) and BMI ($r=0.195$, $p=0.004$, $n=193$) (data not shown).

Multivariate regression #1 (Table 2) shows that not only age, but also MetS and BMI had a significant impact on tPSA and O&NS biomarkers. AOPP was significantly higher in subjects with MetS than in those without MetS ($F=15.93$, $df=1/186$, $p<0.001$). Age was significantly associated with SH ($F=10.02$, $df=1/186$, $p=0.002$, $R^2=0.051$) and AOPP ($F=5.73$, $df=1/186$, $p=0.018$, $R^2=0.030$), while BMI was correlated with uric acid ($F=8.46$, $df=1/186$, $p=0.004$, $R^2=0.043$). We found no significant effects of familial anamnesis of PCa on the dependent variables listed in table 2 ($F=1.57$, $df=1/180$, $p=0.136$). There was a significant effect of ethnicity on SH groups ($F=5.46$, $df=1/187$, $p=0.020$) with lower SH levels in black people (mean in z-values= -0.389 , $SE=0.193$) than in Caucasians + Asians (mean= $+0.090$, $SE=0.069$) (data not shown).

We have also examined possible effects of the drug state of the patients; 19 subjects were treated with doxazosine, 7 with finasteride, 84 with antihypertensive drugs, 30 with hypercholesterolemia drugs, 23 with hypoglycemic drugs and 16 with non-steroidal anti-

inflammatory drugs (NSAIDs). Introducing these drug state variables in Regression #1 showed that doxazosine ($F=0.77$, $df=8/173$, $p=0.629$), finasteride ($F=0.19$, $df=8/173$, $p=0.992$), antihypertensive drugs ($F=0.28$, $df=8/173$, $p=0.972$), hypercholesterolemia drugs ($F=0.72$, $df=8/173$, $p=0.68$), hypoglycemic drugs ($F=1.68$, $df=8/173$, $p=0.106$) and NSAIDs ($F=1.52$, $df=8/173$, $p=0.153$) had no significant effects, while the effects of diagnosis remained significant ($F=14.89$, $df=16/348$, $p<0.001$). In addition, all tests of between-subject effects of all drug state variables on tPSA / O&NS biomarkers were non-significant, except a positive association (without p-correction) between NSAIDs and fPSA ($F=4.71$, $df=1/$, $p=0.031$). There were no significant effects of the drug state variables on both TRAP values and the immune-inflammatory variables. Finally, there were no significant effects of smoking and diabetes on any of the biomarkers examined (data not shown).

Prediction of PCa using the biomarkers

Table 4 shows the results of binary logistic regression analyses with PCa as dependent variable and either BPH or BPH+HC as reference group. Regression #1 shows that PCa (versus BPH+HC) was significantly predicted using tPSA, SH and age as explanatory variables ($X^2=153.09$, $df=3$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.724, 85.8% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 79.5% and a specificity of 89.3%). Without age (Regression #2) a similar prediction was established ($X^2=149.47$, $df=2$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.713; whereby 87.3% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 82.2% and a specificity of 90.1%). As a consequence, we have computed a new z weighted composite score as z value of tPSA (zPSA) – zSH (reflecting the ratio between both variables). This ratio yields a comparable result ($X^2=149.40$, $df=1$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.713, 88.2% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 83.6% and a specificity of 90.8%). Regression #3 shows that a somewhat better prediction of PCa was obtained using tPSA and SH combined with PCB ($X^2=144.89$, $df=3$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.761, 91.1% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 85.7% and a specificity of 94.0%). The same three variables yielded also a good prediction (Regression #4) of PCa versus BPH ($X^2=87.62$, $df=3$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.676, 87.1% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 87.3% and a specificity of 86.9%). In comparison, Regression #5 shows that a familial history of PCa, ethnicity, PCB, SH and tPSA significantly predicted PCa versus BPH+HC ($X^2=162.79$, $df=5$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.762, 89.1% of all cases were correctly

classified with a sensitivity of 81.7% and a specificity of 93.1%). Age was not significant in this regression ($p=0.093$).

Table 5 shows the results of ROC analyses separating PCa from BPH+ HC or PCa from BPH. The best separations was obtained for the combination of a familial history of PCa, ethnicity, PCB, SH and tPSA (are under the ROC curve 0.950), followed by the z composite score zPS – zSH and tPSA, SH and PCB (both have an area under the ROC curve of 0.945).

Associations among tPSA with SH, outcome and severity.

Subsequently we have examined the associations between the biomarkers and different outcome and severity of PCa, including metastasis, rectal examination, AV groups (risk stratification according NCCN Guidelines), prostate size and ultrasound. Figure 3 shows the biomarkers in patients with metastasis versus all other participants. Inspection of this graph shows that SH, but not tPSA, and ESR and Hb show some differences between both groups. Univariate GLM analysis (with age, BMI and MetS as covariates) shows that SH groups are significantly lower in those with (mean z score=-1.80 \forall 0.280) than without (mean=+0.092 \forall 0.060) metastasis ($F=43.07$, $df=1/198$, $p<0.001$, partial eta squared=0.179). Table 4, Regression #6 shows that SH performed well discriminating both groups ($X^2=41.76$, $df=1$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.572) whereby 97.1% of all cases are classified correctly with a sensitivity of 50% and a specificity of 99.5%).

Figure 4 shows the biomarkers in those with a suspicious digital rectal examination versus a normal examination. Univariate GLM analyses show that tPSA ($F=30.71$, $df=1/198$, $p<0.001$, partial eta squared=0.134), SH ($F=19.38$, $df=1/198$, $p<0.001$, partial eta squared=0.126) and AOPP ($F=13.59$, $df=1/198$, $p<0.001$, partial eta squared=0.065) were significantly associated with a suspicious digital rectal examination. Table 4, Regression #7 shows that SH, tPSA, AOPP and MetS were associated with a suspicious digital rectal examination ($X^2=49.56$, $df=4$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.336). However after bootstrapping (2000 bootstraps) tPSA was no longer significant ($p=0.06$), while SH, AOPP and MetS remained significant. **Figure 5** - Univariate GLM analysis shows that AV group 3 (risk group3) is characterized by lowered SH values ($F=8.91$, $df=1/60$, $p=0.004$) and higher ESR ($F=9.03$, $df=1/60$, $p=0.004$) than AV groups 1+2.

Table 6 shows the results of multiple regression analysis predicting prostate volume (in cubic centimeter). The best prediction of prostate volume was obtained using age in

combination with LOOH in RBCs explaining 34.0% of the variance (Regression #1), whilst SH levels were also significant and explained 9.1% of the variance (Regression #2). We found that 15.5% of the variance in ultrasound volume was explained by age and LOOH in plasma combined (Regression #3). Regression #4 shows that in patients with PCa, tPSA_I was predicted by lower SH levels, increased PCB and increased prostate volume (27.5% of the variance). Regression #5 shows that in all participants combined tPSA was significantly predicted by ethnicity, age and familial anamnesis of PCa (13.5% of the variance)

Discussion

The main findings of this study are: a) PCa is characterized by lowered plasma SH and red blood cell TRAP levels and higher plasma AOPP and PCB levels as compared with BPH or control subjects and; b) OS biomarkers may be used together with tPSA as external validating criterion for PCa. Importantly, 10-fold cross-validation showed that both tPSA and fPSA values together with SH, PCB and AOPP yielded a validation accuracy of 96.34% when differentiating PCa from BPH and HC. In the clinical practice, lowered SH may be combined with higher tPSA values to externally validate the diagnosis of PCa versus BPH and HC or versus BPH alone with an area under the ROC curve of 0.945 and 0.902, respectively. Moreover, the increased OS and lowered antioxidant defenses, including lowered SH and TRAP in red blood cells, could contribute to the pathophysiology of PCa and BPH.

Antioxidant Defenses in PCa and BPH

The main finding of our study is that SH groups are significantly decreased in PCa as compared with HC and BPH subjects. SH is a highly active form of reduced sulphur in biomolecules. It is present in amino acids such as cysteine and it is sensitive to redox reactions. When oxidated, form disulphide bounds (S-S) and it can reduced to SH again. This dynamic form, called SH-disulphide homeostasis, is crucial in several processes such as antioxidant defense, detoxification, cell signaling, transcription mechanisms, protein regulation and apoptosis. Malfunctions of redox-dependent transcription factors such as nuclear factor NF-kappa B, p53 and protein-1 activator due to SH/disulphide redox imbalance may lead to changes in cell proliferation, differentiation and apoptosis [32]. Thus, alterations in these mechanisms may develop various diseases such as diabetes, cardiovascular diseases, rheumatoid arthritis and cancer [33]. In addition, previous studies have also reported decreased SH levels in other types of cancer, such as in advanced non-small cell lung cancer [34] and advanced gastric adenocarcinoma [35]. However, a previous study found an increase

of non-protein SH levels (GSH, Reduced Glutathione) in plasma and erythrocytes in PCa patients, mainly in presence of bone metastasis. The authors suggested that the increased levels could be a compensatory mechanism to prevent tissue damage caused by oxidative stress [36]. In plasma, proteins SH levels are more abundant than glutathione, representing approximately 70% of total intracellular pool of reduced SH. However, GSH levels in plasma are very low and do not reflect all SH groups [37]. Thus, it is possible that contradictory results are due to differences in the methods used. In addition, in the present study most of PCa patients (88%) did not have metastasis. Interestingly, in our study there was a strong association between total PSA and SH levels. One hypothesis is that increased PSA peptidase activity could have caused lowered SH levels. But the PSA activity involves serine proteinase and not cysteinases [38,39]. Therefore, PSA levels would be more related to tumor aggressiveness/volume instead SH/disulphide imbalance.

Some studies reported decreased antioxidants defenses, other than SH groups, both in PCa and BPH [19]. For example, several studies have evaluated antioxidant enzymes activity, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase in patients with PCa metastasis [36,40]. However, few reports measured total antioxidant capacity, which reflects the cumulative effects of all antioxidants in the plasma, thereby providing an integrated parameter of antioxidant defenses [41]. In this respect, we measured TRAP in plasma and erythrocytes and found that TRAP in erythrocytes, but not in plasma, was decreased in patients with PCa as compared with BPH and HC. In contrast, a previous study demonstrated that antioxidant status, evaluated by TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), was reduced in plasma of PCa patients when compared with BPH and HC [43]. In addition, PANDE and colleagues (2013) [13] reported that patients with advanced stages of PCa had a reduction in TEAC, suggesting increased antioxidants consumption.

Lipid and protein oxidation in PCa and BPH

In prostate disease, the lipid peroxidation data are controversial and most authors measured TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) or MDA levels. Lipid peroxidation measured by TBARS in erythrocyte lysates was increased in BPH patients when compared with HC [43,44]. In addition, MDA levels were higher in BPH patients than HC [40,17,45,46] and strongly correlated with tPSA [17]. However, other studies found similar circulating MDA levels in BPH patients and HC [47]. In the present study, PCa and BPH patients had increased lipoperoxidation showed by enhanced lipid hydroperoxides levels in

erythrocytes. In addition, we evaluated lipoperoxidation by CL-LOOH (Tert-Butyl Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence), a methodology more sensitive and specific [48] than TBARS. Hydroperoxide is an initial product while MDA is a final product of the oxidation process. We are not aware of any study, which has evaluated lipid hydroperoxides in PCa and BPH patients.

However, the results of the present study did not show an increase in plasma lipoperoxidation. Our data are in agreement with a previous study that showed no difference in lipoperoxidation between PCa and BPH [49]. It's possible that lipoperoxidation in erythrocytes is more prominent than in plasma since erythrocytes are more exposed to oxygen tensions, have more fatty acids and a higher content of catalyzers in the oxidative stress production, such as iron [43].

In relation to protein oxidation, data from literature are scarce. A previous large nested case-control study demonstrated that there were no significant association between PCa risk or its aggressiveness and serum levels of protein carbonyl (PCB) [50]. On the other hand, PANDE and colleagues (2013) [13] demonstrated that PCB levels increased in patients with PCa compared to HC. In the current study, we demonstrated the increase of PCB and AOPP, which reveals different stages of protein oxidation. PCB may be formed by the oxidation of a few amino acid side chains via the addition of aldehydes such as those generated from lipid peroxidation. PCB is an initial and reversible product from protein oxidation and was increased in PCa when compared with the BPH and HC. In addition, PCa group had higher PCB levels than BPH group. On the other hand, AOPP is a final and irreversible product and increased in both, PCa and BPH groups.

Oxidative stress in PCa could be associated with the inflammatory process [11], but the mechanism is complex. Prostate tissue damage and oxidative stress generated from inflammation could lead to compensatory cellular proliferation with the resulting hyperplastic growth [51]. Prostatic inflammation is suggested to be involved in PCa pathogenesis and progression inciting carcinogenesis by causing cell and DNA damage and promoting cellular turnover. Inflammation could be caused by infection, urine reflux, hormones, and immune response [52,11]. However, in the present study we did not find significant links between oxidative stress and inflammation. Serum inflammatory markers (ferritin, ESR, CRP) in this study were not altered and no significant differences among PCa, BPH and HC were found,

suggesting that OS could be involved in physiopathology of PCa, independently of immune-inflammatory processes.

Oxidative stress and staging of PCa

Interestingly, our study found that there was a strong association between a suspicious rectal examination and lowered levels of SH groups (explaining 12.6% of the variance) and AOPP (explaining 6.5% of the variance), whereas the association with tPSA was no longer valid after bootstrapping. Also, these findings suggest a pathogenic role of SH and AOPP in PCa. As such, our algorithm comprising SH groups and tPSA may be used to differentiate BPH from PCa in subjects with suspicious digital rectal exam. Likewise, prostate volume was predicted by pre-surgery values of SH and LOOH in red blood cells, but not tPSA. In this respect, increased levels of tPSA were significantly predicted by lowered SH, increased PCB and prostate volume, indicating that SH groups and OS processes are involved in BPH, cancer development and increased production of tPSA. Moreover, our results show that lowered SH groups predict a high risk as indicated by the association of SH with metastasis (although only nine patients with metastasis were included) and AV risk group 3. Previously, it was shown that progressive stages in PCa are associated with more detrimental redox equilibrium [13]. In addition, it was reported that increased ROS levels are closely linked to the accelerated formation of metastasis [53].

Limitations of the study

In the present study, BPH and PCa patients were somewhat older and they showed a higher frequency of MetS, factors that could have influenced the results. Nevertheless, our data were statistically adjusted for possible effects of these and other extraneous variables while age, BMI and MetS has a moderate effects (around 10% of the variance) on the biomarkers, whilst diagnosis yielded a highly significant effect (explaining 43.2% of the variance). The effects of age on tPSA and SH (explaining around 10-16% of the variance) do not intervene with their diagnostic performance for PCa because tPSA, SH and PCa are all three associated with increasing age.

The presence of a greater number of patients with MetS in BPH group is consistent with findings in the literature that have related the pathophysiology of metabolic imbalance with the predisposition of BPH [54]. However, in PCa, data have been contradictory. GACCI and colleagues (2017) [10] in a meta-analysis comprising 24 studies including 132,589

participants concluded that patients with PCa and MetS had worse prognosis and more aggressive tumors, but the risks were not associated with each other.

Conclusion

This study showed a robust association between SH-groups, OS biomarkers and PCa and its prognosis. SH levels combined with tPSA may be used as an external validating criterion for PCa and to differentiate PCa from BPH in patients with suspicious digital rectal exam. This is the first study to propose models using oxidative stress biomarkers and clinical and laboratory data to predict prognosis in PCa. If other reports confirm our results, new drugs could be tried with SH as targets.

Acknowledgements

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

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval

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

Informed consent

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

References

- 1- LYNCH HT, LASAKI OK, LESLIE SW, RENDELL M, SHAW T, SNYDER C, D'AMICO AV, BUXBAUM S, ISAACS WB, LOEB S, MOUL JW, POWELL I. Screening for familial and hereditary prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v.138, p.2579-91, 2016.
- 2- COOK MB, WANG Z, YEBOAH ED, TETTEY Y, BIRITWUM RB, ADJEI AA, TAY E, TRUELOVE A, NIWA S, CHUNG CC, CHOKKALINGAM AP, CHU LW, YEAGER M, HUTCHINSON A, YU K, RAND KA, HAIMAN CA, HOOVER RN, HSING AW, CHANOCK SJ. A genome-wide association study of prostate cancer in West african men. **Human Genetics**, v.133, p.509-21, 2014.
- 3- EWING CM, RAY AM, LANGE EM, ZUHLKE KA, ROBBINS CM, TEMBE WD, WILEY KE, ISAACS SD, JOHNG D, WANG Y, BIZON C, YAN G, GIELZAK M, PARTIN AW, SHANMUGAM V, IZATT T, SINARI S, CRAIG DW, ZHENG SL, WALSH PC, MONTIE JE, XU J, CARPTEN JD, ISAACS W, COONEY KA. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. **The New England Journal of Medicine**, v.366, p.141-9, 2012.
- 4- POWELL IJ, BOCK CH, RUTERBUSCH JJ, SAKR W. Evidence supports a faster growth rate and/or earlier transformation on clinically significant prostate cancer in black than white american men and influences racial progression and mortality disparity. **The Journal of Urology**, v.183, p.1792-97, 2010.
- 5- FLESHNER N, BAGNELL PS, KLOTZ L, VENKATESWARAN V. Dietary fat and prostate cancer. **The Journal of Urology**, v.171, p.S19-24, 2004.
- 6- BAILLARGEON J, ROSE DP. Obesity, adipokynes and prostate cancer (Review). **International Journal of Oncology**, v.28, p.737-45, 2006.
- 7- DE NUNZIO C, KRAMER G, MARBERGER M, MONTIRONI R, NELSON W, SCHRODER F, SCIARRA A, TUBARO A. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **European Urology**, v.60, p.106-17, 2011.

- 8- GANDAGLIA G, ZAFFUTO E, FOSSATI N, CUCCHIARA V, MIRONE V, MONTORSI F, BRIGANTI A. The role of prostatic inflammation in the development and progression of benign and malignant diseases. **Current Opinion in Urology**, v.27, p.99-106, 2017.
- 9- ZOU C, GONG D, FANG N, FAN Y. Meta-analysis of metabolic syndrome and benign prostatic hyperplasia in chinese patients. **World Journal of Urology**, v.34, n^o2, p.281-9, 2016.
- 10- GACCI M, RUSSO GI, NUNZIO C, SEBASTIANELLI A, SALVI M, VIGNOZZI L, TUBARO A, MORGIA G, SERNI S. Meta-analysys of metabolic syndrome and prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v.20, n^o2, p.146-55, 2017.
- 11- UDENSI UK, TCHOUNWOU PB. Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.35, n^o1, p.1-19, 2016.
- 12- SHIOTA M, SONG Y, TAKEUCHI A, YOKOMIZO A, KASHIWAGI E, KUROIWA K, TATSUGAMI K, UCHIUMI T, ODA Y. Antioxidant therapy alleviates oxidative stress by androgen deprivation and prevents conversion from androgen dependent to castration resistant prostate cancer. **The Journal of Urology**, v.187, p.707-14, 2012.
- 13- PANDE D, NEGI R, KARKI K, DWIVEDII US, KHANNA RS, KHANNA HD. Simultaneous progression of oxidative stress, angiogenesis, and cell proliferation in prostate carcinoma. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v.31, n^o8, p.1561–66, 2013.
- 14- BADITHE TA, ALI R. The aging paradox: free radical theory of aging. **Experimental Gerontology**, v.34, p.293-303, 1999.
- 15- BARROCAS D, MOTLEY S, COOKSON MS, CHANG SS, PENSON DF, DAI Q, MILNE G, ROBERTS J, MORROW J, CONCEPCION RS, SMITH JA, FOKE JH. Oxidative stress measured by urine F2-Isoprostane level is associated with prostate cancer. **The Journal of Urology**, v.185, p.2102-07, 2011.
- 16- SAHA KS, LEE SB, WON J, CHOI HY, KIM K, YANG G, DAYEM AA, CHO S.

Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. **International Journal of Molecular Science**, v.18, n^o7, p.1544-73, 2017.

17- MERENDINO RA, SALVO F, SAIJA A, PASQUALE GD, TOMAINO A, MINCIULLO PL, FRACCICA G, GANGEMI S. Malondialdehyde in benign prostate hypertrophy: a useful marker? **Mediators of Inflammation**, v.12, n^o2, p.127-28, 2003.

18- HACER IA, ZEYNEP AA, CAN O, RIZA KA, DILDAR K, T A. The effect of prostate cancer and antiandrogenic therapy on lipid peroxidation and antioxidant system. **International Urology and Nephrology**, v.36, p.57-62, 2004.

19- CIMINO S, FAVILLA V, RUSSO GI, GALVANO F, VOLTI GL, BARBAGALLO I, GIOFRE SV, D'ÒRAZIO NA, DI ROSA A, MADONIA M, MORGIA G. Oxidative stress and body composition in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia patients. **Anticancer Research**, v.34, p.5051-56, 2014.

20- ARMITAGE TG, COOPER EH, NEWLING DWW, ROBINSON MRG, APPELYARD I. The value of the measurement of serum prostate specific antigen in patients with benign prostatic hyperplasia and untreated prostate cancer. **British Journal of Urology**, v.62, p.584-89, 1988.

21- VELONAS VM, WOOHH, REMEDIOS CG, ASSINDER SJ. Current status of biomarkers for prostate cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.11034-60, 2013.

22- PEZARO C, WOO HH, DAVIS ID. Prostate cancer: measuring PSA. **International Medicine Journal**, v.44, n^o5, p.433-40, 2014.

23- ALFORD AV, BRITO JM, YADAV KK, YADAV SS, TEWARI AK, RENZULLI J. The use of biomarkers in prostate cancer screening and treatment. **Reviews in Urology**, v.19, n^o4, p.221-234, 2017.

24- NCCN – NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. Prostate Cancer Guideline,2018,available:https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf, access in 20 Aug. 2018.

- 25- GRUNDY SM, CLEEMAN JI, DANIELS SR, DONATO KA, ECKEL RH, FRANKLIN BA, GORDON DJ, KRAUSS RM, SAVAGE PJ, SMITH SC JR, SPERTUS JA, COSTA F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Current Opinion Cardiology**, v.21, p.1-6, 2006.
- 26- FLECHA GB, LLESUY B, BOVERIS SA. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology Medicine**, v.10 ,p.93–100, 1991.
- 27- REZNICK AZ, PACKER L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v.363, p.357-63, 1994.
- 28- WITKO-SARSAT V, FRIEDLANDER M, NGUYEN T, CAPELLÈRE-BLANDIN C, NGUYEN AT, CANTELOUP S, DAYER JM, JUNGERS P, DRUEKE T, DESCAMPS-LATSCHA B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **The Journal of Immunology**, v.161, p.2524-32, 1998.
- 29- REPETTO M, REIDES C, CARRETERO MLG, COSTA M, GRIEMBERG G, LLESUY S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v.255, n°2, p.107-17, 1996.
- 30- HU ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods Enzymology**, v.233, n°5, p.380-85, 1994.
- 31- BENJAMIN Y, HOCHBERG Y. Controlling the false discovery ate – a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v.57, p.289-300, 1995.
- 32- RAHMAN I and MACNEE W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches . **Free Radical Biology & Medicine**, v.28, n° 9, p.1405-20, 2000.

- 33- BISWAS S, CHIDA AS, RAHMAN I. Redox modifications of protein–thiols: Emerging roles in cell signaling. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.551-64, 2006.
- 34- DIRICAN N, DIRICAN A, SEN O, AYNALI A, ATALAY S, BIRCAN HA, OZTÜRK O, ERDOGAN S, CAKIR M1 AKKAYA A. Thiol/disulfide homeostasis: A prognostic biomarker for patients with advanced non-small cell lung cancer? **Redox Report**, v.21, n°5, p.197-203, 2016.
- 35- HIZAL M, SENDUR MAN, BILGIN A, AKINCI MB, DEDE DS, NESELIOGLU S, EREL O, YALCIN B. Evaluation of dynamic serum thiol/disulfide homeostasis in locally advanced and metastatic gastric cancer. **Journal of Oncological Sciences**, v. 4, p.1-4, 2008.
- 36- BATTISTI V, MADERS LDK, BAGATINI MD, REETZ LGB, CHIESA J, BATTISTI IE, GONÇALVES JF, DUATE MMF, SCHETINGER MRC, MORSCH VM. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomed & Pharmacotherapy**, v.65, p.516-24, 2011.
- 37- OLIVEIRA PVS, LAURINDO FRM. Implications of plasma thiol redox in disease. **Clinical Science**, v.132, p.1257-80, 2018.
- 38- MALM J, LILJA H. Biochemistry of prostate specific antigen, PSA. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v.221, p15-22, 1995.
- 39- RAWLINGS N, BARRETT AJ. Families of cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, v.244, p.461-86, 1994.
- 40- SARAFINOVSKA ZA, EKEN A, MATEVSKA N, ERDEM O, SAYAL A, SAVASER A, BANEV S, PETROVSKI D, DZIKOVA S, GEORGIEV V, SIKOLE A, OZGOK Y, SUTURKOVA L, DIMOVSKI AJ, AYDIN A. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **Clinical Biochemistry**, v.42, n°12, p.1228–35, 2009.
- 41- GHISELLI A, SERAFINI M, NATELLA F, SCACCINI C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology Medicine**, v.29, p.1106–14, 2000.

- 42- PACE G, MASSIMO CD, AMICIS DD, CORBACELLI MGT. Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Urologia Internationalis**, v.85, n°3, p.328–33, 2010.
- 43- AYDIN A., SARAFINOVSKA ZA, SAYAL A, EKEN A, ERDEM O, ERTEN K, OZGOK Y, DIMOVSKI AJ. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Clinical Biochemistry**, v.39, n°2, p.176-79, 2006.
- 44- GOSWAMI K, NANDEESHA H, KONER BC, NANDAKUMAR DN. A comparative study of serum protein-bound sialic acid in benign and malignant prostatic growth: possible role of oxidative stress in sialic acid homeostasis. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v.10, n°4, p.356–59, 2007.
- 45- SRIVASTAVA DSL, MITTAL RD. Free radical injury and antioxidant status in patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.20, n°2, p.162–5, 2005.
- 46- ARYAL M, PANDEYA A, GAUTAM N, BARAL N, LAMSAL M, MAJHI S, CHANDRA L, PANDIT R, DAS BKL. Oxidative stress in patients with benign prostate hyperplasia. **Journal of the Nepal Medical Association**, v.46, n°167, p.103–6, 2007.
- 47- ALMUSHATAT AS, TALWAR D, MCARDLE PA, WILLIAMSON C, SATTAR N, O'REILLY DS, UNDERWOOD MA, MCMILLAN DC. Vitamin antioxidants, lipid peroxidation and the systemic inflammatory response in patients with prostate cancer. **International Journal Cancer**, v.15, p1051-53, 2006.
- 48- SIMÃO ANC, SUZUKAWA AA, CASADO MF, OLIVEIRA RD, F GUARNIER FA, CECCHINI R. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2V-Azobis (Amidinopropane). **Life Science**, v.78, p.1202-10, 2006.
- 49- DOGRU-ABBASOGLU S, TOKER GA, KOÇAK T, UNLLER E, UYSAL M. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxides in the plasma of patients with benign prostatic hyperplasia or prostate cancer are not predictive. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.125, p.402-4, 1999.

- 50- HOQUE A, AMBROSONE CB, TILL C, GOODMAN PJ, TANGEN C, KRISTAL A, et al. Serum oxidized protein and prostate cancer risk within the prostate cancer prevention trial. **Cancer Prevention Research**, v.4, p.478-83, 2010.
- 51- CHRONS M, WESTERMARCK T, ATROSHI F. Prostate cancer, inflammation and antioxidants. **Advances in Prostate Cancer**, ed.17, Gerhard Hamilton, IntechOpen, p.401-21, 2013.
- 52- GUREL B, LUCIA MS, THOMPSON Jr IM, GOODMAN PJ, TANGEN CM, PARNES HL, HOQUE A, LIPPMAN SM, SUTCLIFFES, PESKOE SB, DRAKE A, NELSON WG, MARZO AM, PLATZ EA. Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the Prostate Cancer Prevention Trial. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.23, n°5, p.847-56, 2014.
- 53- SHIOTA M, YOKOMIZO A, NAITO S. Oxidative stress and androgen receptor signaling in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. **Free Radical Biology & Medicine**, v.51, p.1320-28, 2011.
- 54- DE NUNZIO C, ARONSON W, FREEDLAND SJ, GIOVANNUCCI E, PARSONS JK. The correlations between metabolic syndrome and prostatic diseases. **European Urology**, v.61, p.560-70, 2012.

Table 1. Demographic, clinical and biomarker data in controls, patients with prostate hyperplasia (BPH) and prostate carcinoma (PCa)

VARIABLES	Healthy Controls (HC) ^A	BPH ^B	PCa ^C	F/X ²	df	p
Age	51.7 (8.6) ^{B,C}	63.3 (7.0) ^A	61.8 (7.4) ^A	44.9	2/201	<0.001
BMI	28.4 (4.3)	27.2 (4.6)	27.3 (4.1)	1.60	2/200	0.205
Ethnicity (C/NC)	59/5 ^C	66/1 ^C	56/17 ^{A,B}	17.71	2	<0.001
Smoking (N/Y)	54/10	56/11	65/8	1.01	2	0.605
MetS (N/Y)	36/28 ^B	23/44 ^A	36/37	6.66	2	0.036
Diabetes (N/Y)	59/5	54/13	62/11	3.67	2	0.159
Hypertension (N/Y)	40/24	32/35	42/31	3.01	2	0.222
Familial history (N/Y)	33/31	31/36	26/47	3.70	2	0.157
t PSA*	0.63 (0.42-0.95) ^{B,C}	2.24 (0.97-3.48) ^{A,C}	6.87 (4.57-11.58) ^{A,B}	79.65	2/201	<0.001
f PSA	0.22 (0.15) ^{B,C}	0.49 (0.39) ^{A,C}	1.24 (3.54) ^{A,B}	28.38	2/201	<0.001
LOOH plasm*	138.9 (19.5)	137.5 (21.3)	137.7 (24.7)	0.14	2/201	0.866
LOOH RBC*	264.0 (83.0)	293.5 (123.0)	280.7 (63.0)	1.60	2/201	0.204
AOPP*	119.0 (54.8) ^{B,C}	171.1 (100.2) ^A	175.9 (87.3) ^A	9.44	2/200	<0.001
Protein carbonyl*	3.30 (1.01)	3.20 (0.99) ^C	3.67 (1.37) ^B	3.22	2/199	0.042
SH*	372.8 (47.0) ^{B,C}	333.4 (47.8) ^{A,C}	251.1 (70.1) ^{A,B}	83.41	2/201	<0.001
Uric Acid	5.87 (1.31)	5.67 (1.30)	5.63 (1.47)	0.57	2/201	0.566
TRAP plasm *	919.8 (156.9)	871.9 (122.5)	876.0 (137.4)	2.27	2/178	0.106
TRAP RBC*	1664 (279) ^C	1618 (258)	1522(313) ^A	3.28	2/148	0.041
CRP*	5.44 (8.57)	3.26 (4.47)	5.40 (18.60)	1.28	2/201	0.280
Ferritin *	293.1 (229.3)	275.3 (201.1)	281.09 (262.9)	0.50	2/201	1.000
Hb	15.52 (9.41) ^C	15.33 (1.23) ^C	14.86 (1.48) ^{A,B}	5.27	2/192	0.006
WBC	6.72 (2.02)	6.87 (1.69)	6.50 (1.88)	1.05	2/192	0.353
ESR	12.47 (11.15)	13.86 (12.04)	16.17 (16.91)	1.04	2/191	0.356

All values are shown as mean (SD) except total PSA (median with q25 and q75 values) ANOVA with protected post-hoc analyses. * Processed in Ln transformation

BMI: body index mass; NC: not caucasian; N: no; Y:Yes; MetS: metabolic syndrome; tPSA: total prostate-specific antigen; fPSA: free prostate-specific antigen; LOOH: lipid hydroperoxide; RBC: red blood cell; AOPP: advanced oxidation protein products; SH: thiol group; TRAP: total reactive antioxidant potential; CRP: C-reactive protein; Hb: hemoglobin; WBC: white blood cell; ESR: erythrocyte sedimentation rate; BPH: benign prostate hyperplasia; PCa: prostate cancer.

Table 2. Results of multivariate Generalized Linear Model analysis with biomarkers as dependent variables

Tests	Dependent variable	Explanatory variables	F	df	p	Partial ETA square
Multivariate #1	tPSA _i , fPSA, SH, uric acid, AOPP, protein carbonyl, LOOH _{plasma} , LOOH _{RBC}	HC/BPH/PCa	16.99	16/35	<0.001	0.432
		MetS	2.62	8	0.010	0.105
		Age	2.48	8/179	0.014	0.100
		BMI	2.61	8/179	0.010	0.105
Between- subject Effect	tPSA	HC/BPH/PCa	81.37	2/186	<0.001	0.467
	fPSA	HC/BPH/PCa	21.63	2/186	<0.001	0.189
	SH	HC/BPH/PCa	55.69	2/186	<0.001	0.375
	AOPP	HC/BPH/PCa	11.53	2/186	<0.001	0.110
	Protein Carbonyl	HC/BPH/PCa	4.52	2/186	0.012	0.046
	LOOH _{RBC}		3.22	2/186	0.038	0.034
Multivariate #2	TRAP _{plasma} , TRAP _{RBC}	HC/BPH/PCa	2.41	4/288	0.049	0.032
Between subject effect	TRAP _{RBC}	HC/BPH/PCa	4.87	2/145	0.009	0.063
Multivariate #3	CRP, WBC, ESR, Ferritin, Hb	HC/BPH/PCa	1.25	10/36 2	0.258	0.033

GLM: generalized linear models; tPSA: total prostate-specific antigen; SH: thiol group; AOPP: advanced oxidation protein products; LOOH: lipid hydroperoxide; HC: healthy controls; BPH: benign prostatic hyperplasia; PCa: prostate cancer; MetS: metabolic syndrome; BMI: body mass index; RBC: red blood cell; TRAP: total reactive antioxidant potential; CRP: C-reactive protein; WBC: white blood cell; ESR: erythrocyte sedimentation rate; Hb: hemoglobin.

Table 3 - Model-generated estimated marginal means of the significant biomarkers as well as results of post-hoc comparisons in controls (HC) and patients with benign prostate hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa).

Variables	HC ^A	BPH ^B	PCa ^C
tPSA	-0.816 (0.096) ^{B,C}	-0.99 (0.087) ^{A,C}	+0.796 (0.080) ^{A,B}
fPSA	-0.568 (0.124) ^{B,C}	+0.055 (0.113) ^{A,C}	+0.536 (0.103) ^{A,B}
SH	+0.598 (0.108) ^C	+0.339 (0.098) ^C	-0.732 (0.090) ^{A,B}
AOPP	-0.570 (0.137) ^{B,C}	+0.182 (0.125) ^A	+0.320 (0.114) ^A
PCB	-0.168 (0.147) ^C	-0.197 (0.133) ^C	+0.274 (0.122) ^{A,B}
LOOH _{RBC}	-0.346 (0.148) ^{B,C}	+0.178 (0.135) ^A	-0.113 (0.124) ^A
Trap _{RBC}	+0.324 (0.145) ^C	-0.059 (0.156)	-0.362 (0.150) ^A

tPSA: total prostate-specific antigen; fPSA: free prostate-specific antigen; SH: thiol group; AOPP: advanced oxidation protein products; PCB: protein carbonyl; LOOH: lipid hydroperoxide; RBC: red blood cell; Trap: total reactive antioxidant potential.

Table 4 - Results of binary logistic regression analysis with prostate cancer (PCa), metastasis and an suspicious digital rectal examination as dependent variables.

Regression	Dichotomy	Explanatory variables	wald	df	P	OR	CI 95%
#1	PCa/ HC + BPH S=79,5% E=89,3%	tPSA	29.07	1	<0.001	9.07	4.07-20.12
		SH*	32.32	1	<0.001	9.82	4.47-21.59
		Age	3.40	1	0.065	0.94	0.88-1.004
#2	PCa/ HC + BPH S=82,2% E=90,1%	tPSA	27.67	1	<0.001	7.15	3.44-14.88
		SH*	29.77	1	<0.001	8.17	3.84-17.38
#3	PCa/ HC + BPH S=85,7% E=94%	tPSA	22.13	1	<0.001	11.53	4.16-31.93
		SH*	24.63	1	<0.001	10.17	4.07-25.42
		PCB	7.23	1	0.007	2.20	1.24-3.92
#4	PCa/ BPH S=87,3% E=86,9%	tPSA	15.02	1	<0.001	8.00	2.80-22.87
		SH*	20.36	1	<0.001	8.68	3.40-22.20
		PCB	7.31	1	0.007	2.22	1.25-3.95
#5	PCa / BPH+HC S=81,7% E=93,1%	Familial anamnesis	4.61	1	0.032	3.30	1.11-9.80
		Ethnicity	7.09	1	0.008	36.04	2.58-
		PCB	4.87	1	0.027	1.0	504.15
		SH*	26.71	1	<0.001	10.74	1.07-3.03
		tPSA	23.23	1	<0.001	7.62	4.37-26.42
#6	Metastasis / no S= 50% E=99,5%	SH*	17.34	1	<0.001	11.95	3.84-37.19
#7	Suspicious rectal exam/ normal examination	SH*	9.91	1	0.002	2.07	1.32-3.24
		tPSA	7.80	1	0.005	2.00	1.23-3.25
		AOPP	10.47	1	0.001	1.94	1.30-2.91
		MetS	5.14	1	0.023	0.37	0.16-0.87

HC: healthy control; BPH: benign prostatic hyperplasia; MetS: metabolic syndrome; tPSA: total prostate-specific antigen; AOPP: advanced oxidation protein products; SH: thiol group; Hb: hemoglobin; PCB: protein carbonyl; ESR: erythrocyte sedimentation rate. SH*: introduced as the inverse SH values; S: sensitivity; E: specificity.

Table 5 - Results of ROC analysis.

Dichotomy	Variables	Area	SE	p-value	CI 95%
PCa/BPH + HC	tPSA	0.890	0.028	<0.001	0.836-0.944
	fPSA	0.754	0.037	<0.001	0.682-0.825
	SH*	0.881	0.025	<0.001	0.833-0.929
	zPSA- zSH	0.945	0.014	<0.001	0.917-0.974
	tPSA+ SH+PCB	0.945	0.014	<0.001	0.917-0.973
	FA+Eth+PSA+SH+PCB	0.950	0.013	<0.001	0.929-0.982
PCa/BPH	tPSA _l	0.838	0.035	<0.001	0.789-0.907
	fPSA	0.653	0.046	<0.001	0.562-0.743
	SH	0.832	0.033	<0.001	0.766-0.897
	zPSA- zSH	0.902	0.025	<0.001	0.853-0.950
	tPSA+ SH+PCB	0.901	0.025	<0.001	0.852-0.949
	FA+Eth+tPSA+SH+PCB				
		0.937	0.020	<0.001	0.898-0.975

PCa: Prostate cancer. HC: healthy control; BPH: benign prostate hyperplasia; tPSA: total prostate-specific antigen; fPSA: free prostate-specific antigen; SH: thiol group; PCB: protein carbonyl; FA: familial anamnesis; Eth: ethnicity.

FA+Eth+PSA+SH+PCB: based on logistic regression analysis with familial anamnesis, ethnicity, tPSA, SH-groups and PCB as explanatory variables.

* Processed in Ln transformation

Table 6 - Results of multiple regression analysis with prostate size and ultrasound and total Prostate-Specific Antigen (PSA) as dependent variables.

Regression	Dependent variable	Explanatory variables	F	p	F model	df	p	Partial Eta Squared
#1	Prostate Size	Age	+8.65	<0.001	39.60	2/154	<0.001	0.340
		LOOH _{RBC}	+2.27	0.024				
#2	Prostate Size	SH	-3.93	<0.001	15.42	1/155	<0.001	0.091
#3	Ultrasound*	Age	+3.35	0.001	9.72	2/106	<0.001	0.155
		LOOH _{plasma}	+2.50	0.014				
#4	tPSA	SH	-5.00	<0.001	21.85	3/173	<0.001	0.275
		PCB	+2.01	0.046				
		Prostate size	+4.22	<0.001				
#5	tPSA	Ethnicity	+2.85	0.005	10.41	3/200	<0.001	0.135
		Age	+4.34	<0.001				
		Familial A	+2.14	0.034				

tPSA: total prostate-specific antigen; fPSA: free prostate-specific antigen; LOOH: Lipid hydroperoxide; SH: thiol group; PCB: protein carbonyl.

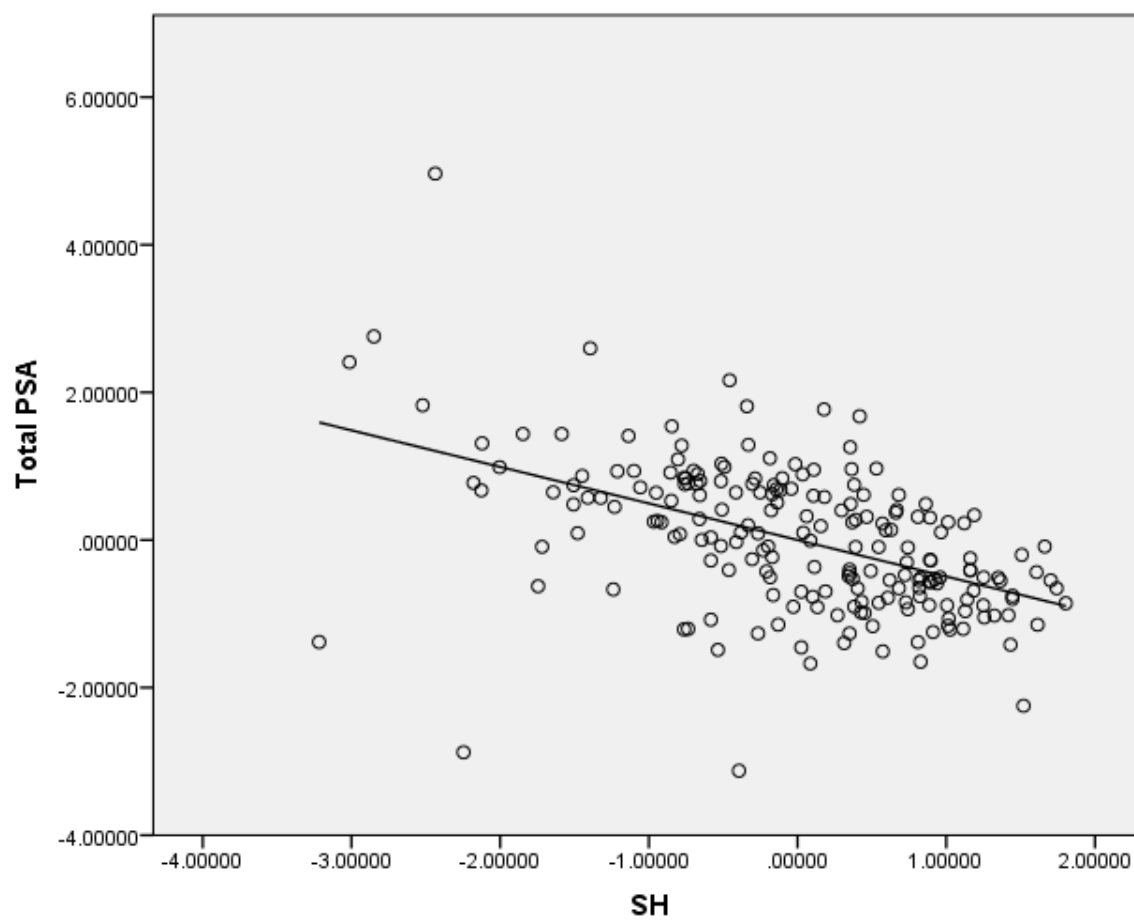


Figure 1 Association between Total Prostate-Specific Antigen (tPSA) and thiol group (SH) values.

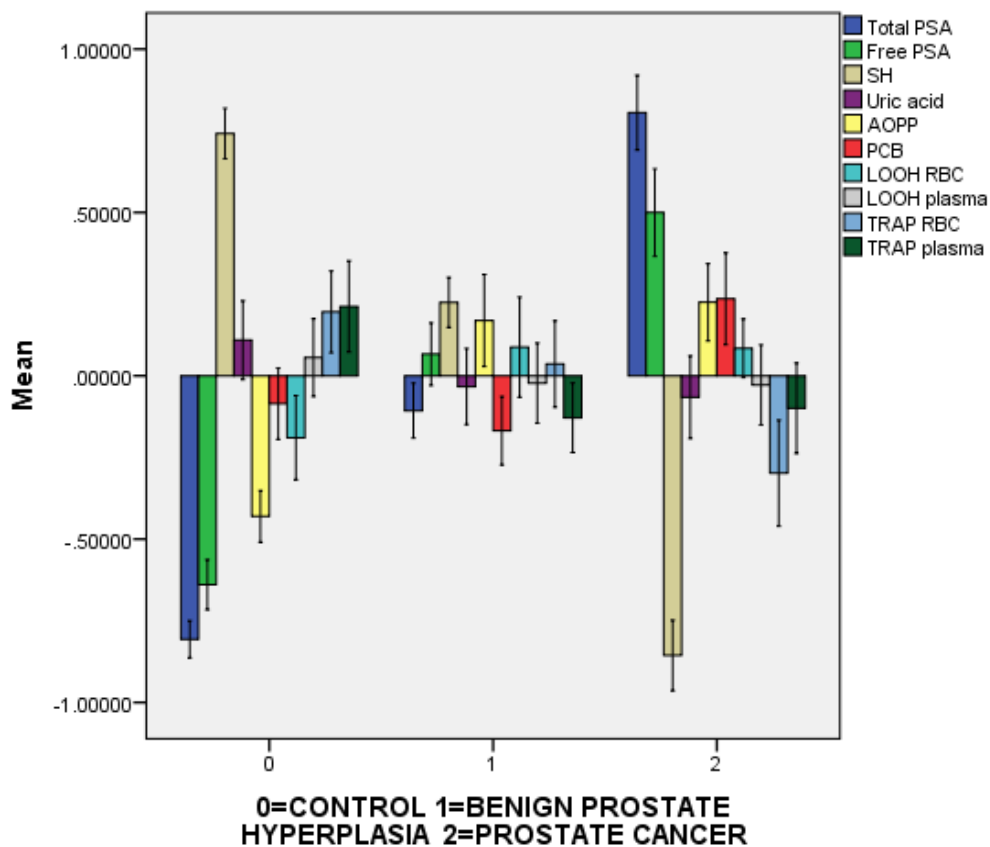


Figure 2 Values of Total Prostate-Specific Antigen (tPSA) / O&NS (oxidative and nitrosative stress) biomarkers in controls and patients with benign prostate hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa)

SH: thiol group, AOPP: advanced oxidation protein products; PCB: protein carbonyl; LOOH: Lipid hydroperoxide; RBC: red blood cell; TRAP: Total Reactive Antioxidant Potential. Data were transformed into z score. Data are shown in +/- standard error.

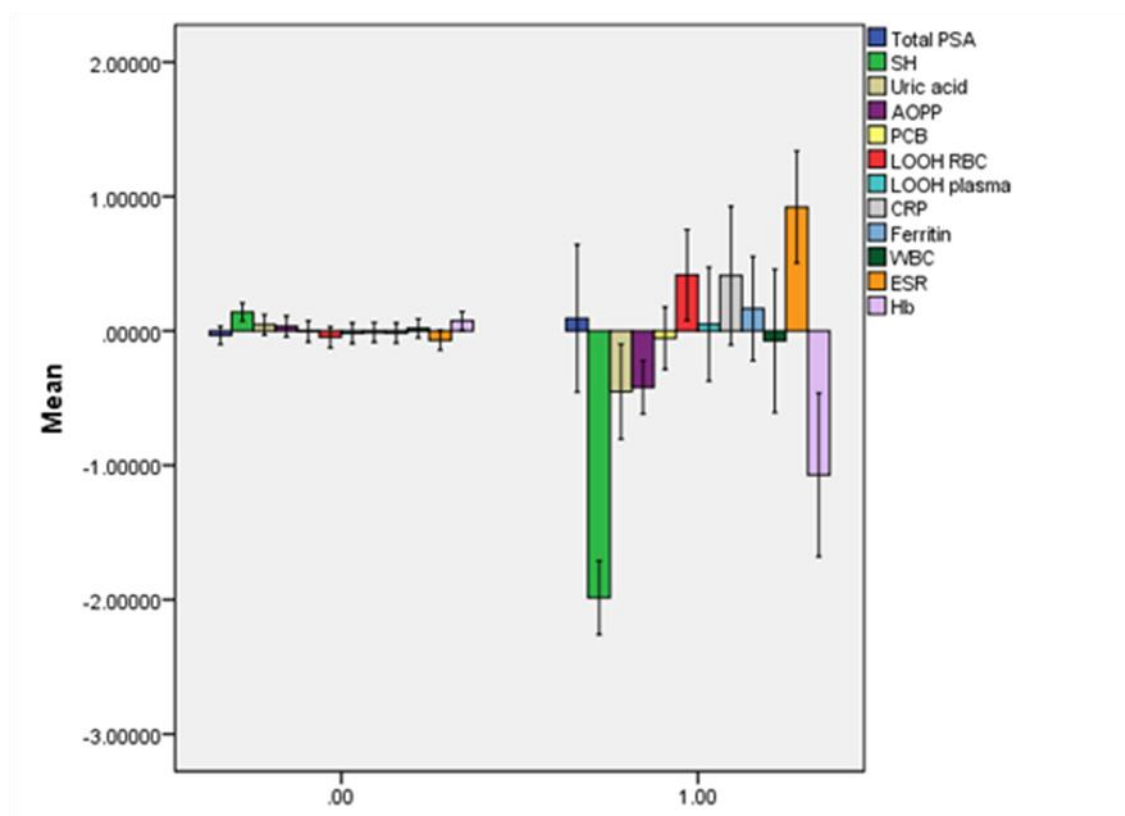


Figure 3 Biomarkers in patients with metastasis versus all other participants.

tPSA: total Prostate-Specific Antigen; SH: thiol group, AOPP: advanced oxidation protein products; LOOH: Lipid hydroperoxide; RBC: red blood cell; CRP: C-reactive protein; WBC: white blood cell; ESR: erythrocyte sedimentation rate; Hb: hemoglobin. Data were transformed into z score. Data are shown in +/- standard error

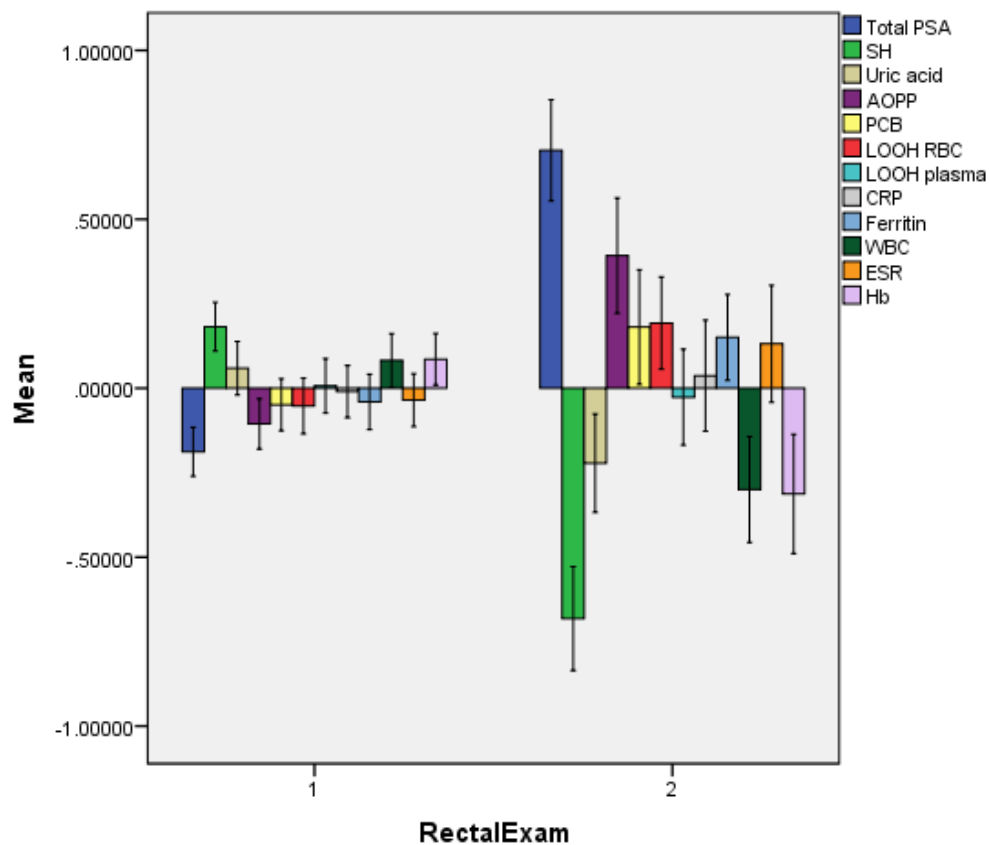


Figure 4 Biomarkers in patients with a suspicious rectal examination versus a normal examination.

PSA: Prostate-Specific Antigen total; SH: thiol group, AOPP: advanced oxidation protein products; PCB: protein carbonyl; LOOH: Lipid hydroperoxide; RBC: red blood cell; CRP: C-reactive protein; WBC: white blood cell; ESR: erythrocyte sedimentation rate; Hb: hemoglobin. Data were transformed into z score. Data are shown in +/- standard error.

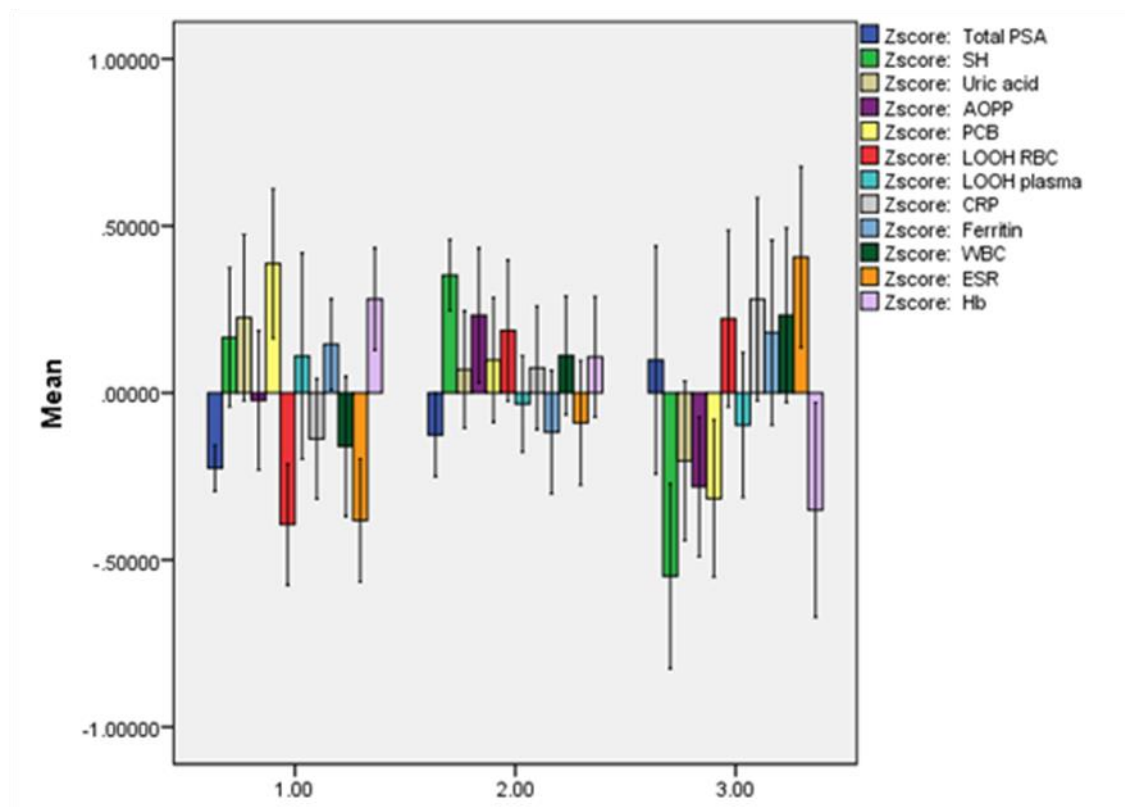


Figure 5 Biomarkers in PCa patients divided according to AV groups. Data were transformed into z score. Data are shown in +/- standard error.

tPSA: total Prostate-Specific Antigen; SH: thiol group, AOPP: advanced oxidation protein products; PCB: protein carbonyl; LOOH: Lipid hydroperoxide; RBC: red blood cell; CRP: C-reactive protein; WBC: white blood cell; ESR: erythrocyte sedimentation rate; Hb: hemoglobin.

AV groups: risk groups classification based for NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Guideline, version 2.2018.

AV group1: very low and low risk group;

AV group2: favorable and unfavorable intermediate risk group;

AV group3: high and very high risk group.

6. CONCLUSÕES

- Pacientes com CaP e HPB apresentam alteração no estado redox quando comparados entre si e à indivíduos saudáveis;
- Pacientes com CaP apresentam aumento nos níveis plasmáticos de PCB e redução de SH quando comparados a pacientes com HPB e indivíduos saudáveis;
- PCB e SH poderiam ser utilizados para a diferenciação entre HPB e CaP;
- Os níveis séricos de SH e PCB foram associados à presença de CaP, independentemente da idade, IMC e MetS;
- Os níveis plasmáticos de AOPP e LOOH de eritrócitos foram associados a pacientes com CaP e HPB, independentemente da idade, IMC e MetS;
- O melhor modelo para prever CaP foi a utilização concomitante dos níveis de PSA total, SH e PCB;
- Os níveis de SH, mas não de PSA total, foram associados a presença de metástase.

7. REFERÊNCIAS

AARON L, FRANCO OE, HAYWARD SW. Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of benign prostatic hyperplasia. **Urologic Clinics of North America**, v.43, n°3, p.279–88, 2016.

AHSAN H, ALI A, ALI R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. **Clinical and Experimental Immunology**, v.131, n°3, p.398–404, 2003.

ALBERTSEN PC, HANLEY JA, FINE J. 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. **JAMA**, v.293, p.2095-101, 2005.

AMORIM VMSL, BARROS MBA, CÉSAR CLG, GOLDBAUM M, CARANDINA L, ALVES MCGP. Fatores associados à realização dos exames de rastreamento para o câncer de próstata: um estudo de base populacional. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v.27, n°2, p.347-56, 2011.

ARYAL M, PANDEYA A, GAUTAM N, BARAL N, LAMSAL M, MAJHI S, CHANDRA L, PANDIT R, DAS BKL. Oxidative stress in patients with benign prostate hyperplasia. **Journal of the Nepal Medical Association**, v.46, n°167, p.103–6, 2007.

AYDIN A, SARAFINOVSKA ZA, SAYAL A, EKEN A, ERDEM O, ERTEN K, OZGOK Y, DIMOVSKI AJ. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Clinical Biochemistry**, v.39, n°2, p.176-79, 2006.

BARREIROS ALBS, DAVID JM, DAVID JP. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n°1, p.113–23, 2006.

BARROCAS D, MOTLEY S, COOKSON MS, CHANG SS, PENSON DF, DAI Q, MILNE G, ROBERTS J, MORROW J, CONCEPCION RS, SMITH JA, FOKE JH. Oxidative stress measured by urine F2-Isoprostane level is associated with prostate cancer. **The Journal of Urology**, v.185, p.2102-07, 2011.

BATTACHARYYA A, CHATTOPADHYAYR, MITRA S, CROWE SEI. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiology Review**, v.94, p.329–54, 2014.

BATTISTI V, MADRES LDK, BAGATINI MD, REETZ LGB, CHIESA J, BATTISTI IE, GONÇALVES JF, DUARTE MMF, SCHETINGER MRC, MORSCH VM. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: Relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.65, n^o7, p.516–24, 2011.

BELL KJL, MAR CD, WRIGHTG, DICKISON J, GLASZIOU P. Prevalence of incidental prostate cancer: a systematic review os autopsy studies. **International Journal of Cancer**, v.7, p.1749-57, 2015.

BIANCHI MLP, ANTUNES LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n^o2, p.123–30, 1999.

BRATT O, DREVIN L, AKRE O, GARMO H, STATTIN P. Family history and probability of prostate cancer differentiated by risk category: a nationwide population-based study. **Journal of the National Cancer Institute**, v.10, n^o10, p.1-7, 2016.

BRYM M, MOREL A, FORMA E, KRZESLAK A, WILKOSZ J, ROZANSKI W, OLAS B. Relationship of urinary isoprostanes to prostate cancer occurrence. **Molecular Cell Biochemistry**, v.372, p.149–53, 2013.

CARTER BS, BEATY TH, STEINBERG GD, CHILDS B, WALSH PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p.3367–71, 1992.

CENTER MM, JEMAL A, LORTET-TIEULENT J, WARD E, FERLAY J, BRAWLEY O, BRAY F. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. **European Urology**, v.61, p.1079-92, 2012.

CHU KC, TARONE RE, FREEMAN HP. Trends in prostate cancer mortality among black and white men in the United States. **Cancer**, V.97, p.1507-16, 2003.

COOK MB, WANG Z, YEBOAH ED, TETTEY Y, BIRITWUM RB, ADJEI AA, TAY E, TRUELOVE A, NIWA S, CHUNG CC, CHOKKALINGAM AP, CHU LW, YEAGER M, HUTCHINSON A, YU K, RAND KA, HAIMAN CA, HOOVER RN, HSING AW, CHANOCK SJ. A genome-wide association study of prostate cancer in West african men. **Human Genetics**, v. 133, p.509-21, 2014

DHINGRA N, BHAGWAT D. Benign prostatic hyperplasia: an overview of existing treatment. **Indian Journal of Pharmacology**, v.43, n^o1, p.6–12, 2011.

ETZIONI R, PENSON DF, LEGLER JM, TOMMASO D, BOER R, GANN PH, FEUER EJ. Overdiagnosis due to prostate specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. **Journal of the National Cancer Institute**, v.94, p.981-90, 2002.

FITZPATRICK, JM. The natural history of benign prostatic hyperplasia. **British Journal of Urology International**, v.97, s2, p.3–6, 2006.

GOSWAMI K, NANDEESHA H, KONER BC, NANDAKUMAR DN. A comparative study of serum protein-bound sialic acid in benign and malignant prostatic growth: possible role of oxidative stress in sialic acid homeostasis. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v.10, n^o4, p.356–59, 2007.

HACER IA, ZEYNEP AA, CAN O, RIZA KA, DILDAR K, T A. The effect of prostate cancer and antiandrogenic therapy on lipid peroxidation and antioxidant system. **International Urology and Nephrology**, v.36, p.57-62, 2004.

HALLIWELL B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. **Encyclopedia of Life Science**. Nature Publishing Group, UK, 2015.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, n^o2, p.231–55, 2004.

HOLL M, KOZIEL R, SCHAFFER G, PIRCHER H, PAUCK A, HERMANN M, KLOCKER H, JANSEN-DURR P, SAMPSON N. ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and survival of prostate carcinoma cells. **Molecular Carcinogenesis**, v.55, p.27-39, 2016.

IYNEM AH, ALADEMIR AZ, OBEK C, KURAL AR, KONUKOĞLU D, AKÇAY T. The effect of prostate cancer and antiandrogenic therapy on lipid peroxidation and antioxidant systems. **International Urology and Nephrology**, v.36, p.57-62, 2004.

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

JAMES PA, OPARIL S, CARTER BL, CUSHMAN W C, DENNISON-HIMMELFARB C, HANDLER J, LACKLAND DT, LeFEVRE ML, MACKENZIE TD, OGEDEGBE O, SMITH SC Jr, SVETKEY LP, TALER SJ, TOWNSEND RR, WRIGHT JT Jr, NARVA AS, ORTIZ E. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA**, v.311, no5, p.507-20, 2014.

JOHANSSON, JE, ANDRÉN O, ANDERSSON SO, DICKMAN PW, HOLMBERG L, MAGNUSON A, ADAMI HO. Natural history of early, localized prostate cancer. **JAMA**, v.291, p. 2713-19, 2004.

KAYA E, OZGOK Y, ZOR M, EKEN A, BEDIR S, ERDEM O, EBILOGLU T, ERGIN G. Oxidative stress parameters in patients with prostate cancer, benign prostatic hyperplasia and asymptomatic inflammatory prostatitis: A prospective controlled study. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v.26, n°7, p.1095–99, 2017.

KHANDRIKA L, KUMAR B, KOUL S, KOUL HK. Role of oxidative stress in prostate cancer. **Cancer Letters**, v. 282, n°2, p.125–36, 2009.

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

KLOTZ T, BLOCH W, VOLBERG C, ENGELMANN U, ADDICKS K. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. **Cancer**, v.82, n°10, p.1897–903, 1998.

KOSOVA F, TEMELTAS G, ARI Z, LEKILI M. Possible relations between oxidative damage and apoptosis in benign prostate hyperplasia and prostate cancer patients. **Tumor Biology**, v.35, n°5, p.4295–99, 2014.

KOTRIKADZEN, ALIBEGASHVILI M, ZIBZIBADZE N, CHIGOGIDZE T, MANAGADZE L, ARTSIVADZE K. Activity and content of antioxidant enzymes in prostate tumors. **Experimental Oncology**, v.30, n°3, p.244–7, 2008.

KULLISAAR T, TURK S, PUNAB M, MANDAR R. Oxidative stress - cause or consequence of male genital tract disorders? **The Prostate**, v.72, p.977-83, 2012.

KUMAR B, KOUL S, KHANDRIKA L, MEACHAM RB, KOUL HK. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. **Cancer Research**, v.68, n°6, p.1777-85, 2008.

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

LEPOR H, KAZAZI A, DJAVAN B. Alpha-blockers for benign prostatic hyperplasia: the new era. **Current Opinion Urology**, v.22, p.7-15, 2012.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN, AMICI A, CLEMENT I, LENZ AG, AHN BW, SHALTIEL S, STADTMAN R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**, v.186, p.464-78, 1990.

LOZOVYOY MAB, SIMÃO ANC, PANIS C, DICHI I. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v.20, p.1250–59, 2011.

LYNCH HT, LASAKI OK, LESLIE SW, RENDELL M, SHAW T, SNYDER C, D'AMICO AV, BUXBAUM S, ISAACS WB, LOEB S, MOUL JW, POWELL I. Screening for familial and hereditary prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v.138, p.2579-91, 2016.

MACINNIS RJ, ENGLISH DR, GERTIC DM, HOPPER JL, GILES GG. Body size and composition and prostate cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.12, p.1417-21, 2003.

McGINLEY JI, GAUTIER T, ZIRINSKY K, HOMT, PALOMO O, STEIN E, VAUGHAN ED, MARKISZ JA, ER ARELLANO, KAZAM E. Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5-alpha reductase reficiency. **Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.75 p.1022-26, 1992.

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

MEHRAEIN-GHOMI F, LEE E, CHURCH DR, THOMPSON TA, BASU HS, WILDING G. JunD mediates androgen-induced oxidative stress in androgen dependent LNCaP human prostate cancer cells. **The Prostate**, v.68, n°9, p.924–34, 2008.

MERENDINO RA, SALVO F, SAIJA A, PASQUALE GD, TOMAINO A, MINCIULLO PL, FRACCICA G, GANGEMI S. Malondialdehyde in benign prostate hypertrophy: a useful marker? **Mediators of Inflammation**, v.12, n°2, p.127-28, 2003.

MINCIULLO PL, INFERRERA A, NAVARRA M, CALAPAI G, GANGEMI S. Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia: A systematic review. **Urologia Internationalis**, v.94, n°3, p.249–54, 2015.

MIYAKE H, HARA I, KAMIDONO S, ETO H. Oxidative DNA damage in patients with prostate cancer and its response to treatment. **The Journal of Urology**, v.171, p.1533–36, 2004.

MODESTO AAD, LIMA RLB, D'ANGELIS AC, AUGUSTO DK. Um novembro não tão azul: debatendo rastreamento de câncer de próstata e saúde do homem. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação**, Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), v.22, p 251-62, 2018.

NCCN – NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. Prostate Cancer Guideline,2018,available:https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf, access in 20 Aug. 2018.

NOURAZARIAN AR, KANGARI P, SALMANINEJAD A. Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.15, p.4745-51, 2014.

OESTERLING JE, JACOBSEN SJ, CHUTE CG, GUESS HA, GIRMAN CJ, PANSER LA, LIEBER MM. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. **JAMA**, v.270, p.860-64, 1993.

OH B, FIGTREE G, COSTA D, EADE T, HRUBY G, LIM S, ELFIKY A, MARTINE N, ROSENTHAL D, CLARKE S, BACK M. Oxidative Stress in prostate cancer patients: a systematic review of case controls studies. **Prostate International**, v.4, n°3 p.71-87, 2016.

PACE G, MASSIMO CD, AMICIS DD, CORBACELLI MGT. Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Urologia Internationalis**, v.85, n°3, p.328–33, 2010.

PAIVA, EP, MOTTA MCS, GRIEP RH. Conhecimentos, atitudes e práticas acerca da detecção do câncer de próstata. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.23, nº1, p.88–93, 2010.

PANDE D, NEGI R, KARKI K, DWIVEDII US, KHANNA RS, KHANNA HD. Simultaneous progression of oxidative stress, angiogenesis, and cell proliferation in prostate carcinoma. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v.31, nº8, p.1561–66, 2013.

PEZARO C, WOO HH, DAVIS ID. Prostate cancer: measuring PSA. **International Medicine Journal**, v.44, nº5, p.433-40, 2014.

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

RASHID MM, ALAM AK, HABIB AK, RAHMAN H, HOSSAIN AK, SALAM MA, RAHMAN S. Efficacy of lower cut off value of serum prostate specific antigen in diagnosis of prostate cancer. **Bangladesh Medical Research Council Bulletin**, v.38, p.90-93, 2012.

ROEHRBORN, C. G. Male lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH). **Medical Clinics of North America**, v.95, nº1, p.87–100, 2011.

ROSA FE, COIMBRA CV. Câncer de cólon e estresse oxidativo. **O Mundo da Saúde, São Paulo**, v.33, nº4, p.415–18, 2009.

ROUMEGUÈRE T, SFEIR J, RASSY EE, ALBISINNI S, ANTWERPEN PV, BOUDJELTIA KZ, FARÈS N, KATTAN J, AOUN F. Oxidative stress and prostatic diseases (Review). **Molecular and Clinical Oncology**, v.7, p.723-28, 2017.

SAHA KS, LEE SB, WON J, CHOI HY, KIM K, YANG G, DAYEM AA, CHO S. Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. **International Journal of Molecular Science**, v.18, nº7, p.1544-73, 2017.

SARAFINOVSKA ZA, EKEN A, MATEVSKA N, ERDEM O, SAYAL A, SAVASER A, BANEV S, PETROVSKI D, DZIKOVA S, GEORGIEV V, SIKOLE A, OZGOK Y, SUTURKOVA L, DIMOVSKI AJ, AYDIN A. Increased oxidative/nitrosative stress and

decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **Clinical Biochemistry**, v.42, n°12, p.1228–35, 2009.

SFANOS KS, MARZO AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. **Histopathology**, v.60, p.199-215, 2012.

SHAH D, KIRAN R, WANCHU A, BHATNAQAR A. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to Th1 cytokine and disease activity. **Immunology Letters**, v.129, n°1, p.7–12, 2010.

SHAMI NJIE, MOREIRA EAM. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, n°2, p.227–36, 2004.

SHIOTA M, SONG Y, TAKEUCHI A, YOKOMIZO A, KASHIWAGI E, KUROIWA K, TATSUGAMI K, UCHIUMI T, ODA Y. Antioxidant therapy alleviates oxidative stress by androgen deprivation and prevents conversion from androgen dependent to castration resistant prostate cancer. **The Journal of Urology**, v.187, p.707-14, 2012.

SILVA CT, JASIULIONIS MG. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.66, n°1, p.38-42, 2014.

SILVA WJM, FERRARI CKB. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v.14, n°1, p.441–51, 2011.

SIMÃO ANC, SUZUKAWA AA, CASADO MF, OLIVEIRA RD, GUARNIER FA, CECCHINI R. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2V-Azobis (Amidinopropane). **Life Sciences**, V.78, p.1202-10, 2006.

SMITH ZL, EGGNER SE, MURPHY AB. African-American prostate cancer disparities. **Current Urology Reports**, v.18, n°10, p.80-91, 2017.

SRIVASTAVA DSL, MITTAL RD. Free radical injury and antioxidant status in patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.20, n°2, p.162–5, 2005.

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

SURAPANENI KM, VENKATA GR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with carcinoma of prostate. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.50, n°4, p.350–4, 2006.

UDENSI UK, TCHOUNWOU PB. Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.35, n°1, p.1-19, 2016.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n°1, p.44–84, 2007.

VASCONCELOS SML, GOULART MOF, MOURA JBF, BENFATO MS, MANFREDINI V, KUBOTA LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n°5, p.1323–38, 2007.

VASHI AR, WOJNO KJ, HENDRICKS W, ENGLAND BA, VESSELLA RL, LANGE PH, WRIGHT GL JR, SCHELLHAMMER PF, WEIGAND RA, OLSON RM, DOWELL BL, BORDEN KK, OESTERLING JE. Determination of the “reflex range” and appropriate cutpoints for percent free prostate-specific antigen in 413 men referred for prostatic evaluation using the AxSYM system. **Urology**, v.49, p.19–27, 1997.

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

WALSH PC, RETIK AB, VAUGHAN ED, WEIN AJ, KAVOUSSI LR, NOVICK AC, PARTIN AW, PETERS CA. **Campbell’s Urology**, 8th edition. Philadelphia, WB Saunders, v.2, p.1237-96, 2002.

WONG MC, GOGGINS WB, WANG HH, FUNG FD, LEUNG C, WONG SY, NG CF, SUNG JJ. Global incidence and mortality for prostate cancer: analysis of temporal patterns and trends in 36 countries. **European Urology**, v.70, p. 862-74, 2016.

WOŹNIAK A, MASIAK R, SZPINDA M, KIERZENKOWSKA CM, WOZNIAK B, MAKAREWICZ R, SZPINDA A. Oxidative stress markers in prostate cancer patients after HDR brachytherapy combined with external beam radiation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2012, p.1–5, 2012.

XIA SJ, XU XX, TENG JB, XU CX, TANG XD. Characteristic pattern of human prostatic growth with age. **Asian Journal of Andrology**, v.4, pp.269-71, 2002.

YILMAZ M, SAGLAM K, SONMEZ A, GOK DE, BASAL S, KILIC S, AKAY C, KOCAR IH. Antioxidant system activation in prostate cancer. **Biological Trace Element Research**, v.98, n°1, p.13–19, 2004.

ZABAIYOU N, MABED D, LOBACCARO JM, LAHOUEL M. Oxidative stress in benign prostate hyperplasia. **Andrologia**, v.48, n°1, p.69–73, 2016.

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

8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

Prezado Senhor:

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

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

A sua participação neste estudo contribuirá para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença. Quanto aos riscos, informamos que sua participação não acarretará em qualquer risco à sua saúde nem alteração de qualquer um dos seus tratamentos. A coleta de sangue pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste: dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local. Mesmo sendo mínimos, caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos farmacêuticos responsáveis pela coleta de sangue e um dos pesquisadores deste estudo.

Caso o senhor tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar **(Alexsandro Koike, Avenida Bandeirantes, 460, Londrina, telefone 3377-1800, celular 9998-1896, urologiakoike@yahoo.com.br)** ou procurar o Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina, situada junto ao

LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

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

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

Londrina, _____ de _____ de 201__.

Pesquisadores Responsáveis:

Professora Dra. Andréa Name Colado Simão

RG: 6.226.736-4

Telefone: 3371-2321

Alexsandro Koike

Médico urologista

RG: 5.888.744-7

Tel: 3377-1800

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

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

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