

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

CARLA FERNANDA FURTADO GARDANI

AVALIAÇÃO DAS ECTONUCLEOTIDASES COMO BIOMARCADORES NA PROGRESSÃO DO
CÂNCER DE PRÓSTATA

Porto Alegre
Março, 2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

CARLA FERNANDA FURTADO GARDANI

AVALIAÇÃO DAS ECTONUCLEOTIDASES COMO BIOMARCADORES NA
PROGRESSÃO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dr^a. Fernanda Bueno Morrone

Porto Alegre
Março, 2018

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Ficha Catalográfica

G217a Gardani, Carla Fernanda Furtado

Avaliação das ectonucleotidasas como marcadores na progressão do câncer de próstata / Carla Fernanda Furtado Gardani . – 2018.

74 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone.

1. Câncer de próstata. 2. Progressão tumoral. 3. Sistema purinérgico. 4. Ectonucleotidasas. 5. CD39 e CD73. I. Morrone, Fernanda Bueno. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

CARLA FERNANDA FURTADO GARDANI

**AVALIAÇÃO DAS ECTONUCLEOTIDASES COMO BIOMARCADORES NA
PROGRESSÃO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção de Título de Mestre.

Área de concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Aprovada em: 28 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Carla Denise Bonan (PUCRS)

Prof. Dr. Fabrício Figueiró (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Liliana Rockenbach (UFRGS)

Porto Alegre

2018

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a todos os fatores e situações que conspiraram a favor da conclusão desta meta, apesar de todas as diversidades. Agradeço aos meus pais que souberam sabiamente me incentivar desde a infância sobre a importância do estudo e do diferencial que o conhecimento pode trazer a vida das pessoas. Agradeço, infinitamente ao meu marido, que me apoiou em todos momentos desta jornada de viagens para a finalização deste mestrado, certamente “se tenho asas para voar e trilhar caminhos mais distantes é porque tenho pessoas que confiam na minha capacidade”, certamente Sérgio, tu és uma destas pessoas. Aos meus filhos queridos, Nicolas e Murilo, que apesar da pouca idade compreenderam a importância para mim deste desafio e pacientemente me acompanharam neste período.

Agradeço à minha equipe no Centro de Oncologia de Cruz Alta, que foram incansáveis nas suas colaborações, principalmente a enfermeira Márcia Nazário de Souza. Agradeço aos médicos patologistas Dr. Vinícius Duval da Silva e a Dr^a Ana Maria Gaiger e principalmente a Bruna Tertuliano Silva, que colaborou ativamente na coleta de dados junto ao Hospital São Lucas da PUCRS.

Sem palavras para agradecer a Angélica Regina Cappellari por todo seu empenho e dedicação em me ajudar, sempre disponível e dedicada a transmitir seus conhecimentos. Por fim, agradeço profundamente a minha orientadora, Fernanda Bueno Morrone, que provavelmente desconhece toda minha admiração. Fernanda, obrigada pelo conhecimento transmitido, dedicação e paciência, és uma pessoa nascida para a docência e pesquisa, certamente. Obrigada!

“Que nossa preocupação
antecipada
se torne reflexão
e planejamento
adiantados.”

Winston Churchill

VII

RESUMO

AVALIAÇÃO DAS ECTONUCLEOTIDADES COMO BIOMARCADORES NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

O câncer de próstata (CP) é a segunda neoplasia mais diagnosticada no sexo masculino, excetuando-se os tumores de pele não melanocíticos, por ano sua incidência mundial é de 1,1 milhões de casos e sua taxa de mortalidade de cerca de 307.000 óbitos. Ao redor do mundo há 3.850.000 sobreviventes de CP, visto que sua sobrevivência em cinco 5 anos chega a valores superiores a 80%. Portanto, a estratificação adequada no diagnóstico e no seguimento destes pacientes é muito relevante. Neste estudo objetivou-se avaliar a hidrólise dos nucleotídeos ATP/ADP/AMP como biomarcadores prognósticos no CP. Sabidamente as enzimas CD39 e CD73 são as principais responsáveis, respectivamente, pela transformação de ATP ou ADP em AMP, e este em adenosina. Foram coletadas amostras sanguíneas de 29 pacientes tratados no Centro de Oncologia e Hematologia de Cruz Alta – COHCA e 17 controles sadios (CS), com o objetivo de avaliar a atividade de hidrólise do ATP, ADP e AMP e correlacionar os dados entre os casos e controles. Além disso, os dados de hidrólise foram correlacionados com fatores prognósticos reconhecidos como escala de Gleason (EG), estágio clínico (EC) e níveis de PSA. A média de idade dos pacientes selecionados foi de 63,3 anos, 71,4% apresentavam PSA < 10 no diagnóstico, 82,7% estavam agrupados como baixo grau na EG e 48,3% dos pacientes pertenciam ao EC IIB. Os resultados demonstraram diferenças estatisticamente significativas nos perfis de hidrólise de nucleotídeos entre casos e controles. Nos portadores de CP a hidrólise do AMP foi mais elevada quando comparada com as hidrólises de ATP e ADP. Em relação ao estadiamento clínico, observou-se que a hidrólise de ATP foi maior nos estágios clínicos iniciais, enquanto que a AMPase se manteve elevada independentemente do estágio clínico. Portanto, pode-se concluir que o estudo da atividade das enzimas ectonucleotidases e o entendimento do CP pode colaborar na compreensão dos fatores que influenciam a progressão tumoral, visando melhorar o diagnóstico e a abordagem terapêutica para esta neoplasia.

Palavras-chaves: Câncer de próstata. Progressão tumoral. Sistema purinéxico. Ectonucleotidases. CD39. CD73.

ABSTRACT

AVALIAÇÃO DAS ECTONUCLEOTIDADES COMO BIOMARCADORES NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

Prostate cancer (PC) is the second most diagnosed neoplasm in men, with the exception of non-melanocytic skin tumors. Its global incidence is 1.1 million cases per year and its mortality rate is around 307,000 deaths. Around the world, there are 3,850,000 CP survivors, since their survival in five years reaches values exceeding 80%. Therefore, adequate stratification in the diagnosis and follow-up of these patients is so relevant. In this study, we aimed of evaluating ATP / ADP / AMP hydrolysis as a prognostic biomarker in the CP; CD39 and CD73 enzymes are known to be responsible for the transformation of ATP or ADP into AMP and into adenosine, respectively. Blood samples were collected from 29 patients treated at the Cruz Alta Oncology and Hematology Center (COHCA) and 17 healthy controls (CS), in order to evaluate the hydrolysis activity of ATP, ADP and AMP and to correlate the data between the cases and controls. In addition, the results of hydrolysis were correlated with recognized prognostic factors as Gleason Score (EG), clinical stage (EC) and PSA levels. The mean age of the selected patients was 63.3 years, 71.4% presented PSA <10 at diagnosis, 82.7% were grouped as low in EG and 48.3% of patients belonged to EC IIB. The results demonstrated statistically significant differences in the nucleotide hydrolysis profiles of the cases and controls. In the CP patients the AMP hydrolysis was higher when compared to the hydrolysis of ATP and ADP. Regarding the clinical staging, it was observed that the hydrolysis of ATP was higher in the initial clinical stages, whereas the AMPase remained high regardless of clinical stage. Therefore, we can conclude that the understanding of the ectonucleotidases activities and their influence on tumor progression can collaborate for the diagnostic and improve the therapeutic approach for this neoplasia.

Keywords: Prostate cancer. Tumor progression. Purinergic system. Ectonucleotidases. CD39. CD73.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Padrões típicos da Escala de Gleason e seus grupos prognósticos correspondentes	17
Figura 2: Topografia de membrana das principais enzimas representantes da família das ectonucleotidases	22
Figura 3: Estrutura fundamental dos receptores purinérgicos	24
Figure 4: Adenosina – geração e sinalização.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diretrizes para o rastreamento do CP	16
Tabela 2: Relação entre os grupos prognósticos e a graduação de Gleason.....	17
Tabela 3: Agrupamento pelo Sistema TNM.....	18
Tabela 4: Estadiamento do Câncer de Próstata.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS

ACRs - Regiões conservadas da apirase
ADA - Adenosina deaminase
ADO - Adenosina
ADP - Adenosina difosfato
AJCC - *American Joint Committee on Cancer*
AMP - Adenosina monofosfato
ATP - Adenosina trifosfato
CD 39 - Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase/ NTPDase/CD39
CD 73 - Ecto-5'NT/CD73 - Ecto-5'-ectonucleotidase
COHCA – Centro de Oncologia e Hematologia de Cruz Alta
CP - Câncer de próstata
CPCR - Câncer de próstata castração resistente
EC - Estágio clínico
EG – Escala de Gleason
ERSPC - *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer*
EUA - Estados Unidos da América
GP - Grupo Prognóstico
GPI - Glicosil-fosfatidilinositol
HMT - Hormonioterapia
HSL - Hospital São Lucas
HSVP – Hospital São Vicente de Paulo
Iarc - *International Agency for Research on Cancer*
INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LNFs - Linfonodos
mL - Mililitros
MO - Mapeamento ósseo
MP – Membrana plasmática
MT - Microambiente tumoral
ng - Nanograma
OMS - Organização Mundial da Saúde
P2X7R - Receptor P2X7

P2XR - Receptor P2X

P2YR - Receptor P2Y

PLC - Fosfolipase C

PLCO - *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial*

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

QTX - Quimioterapia

RNM - Ressonância magnética

RTX - Radioterapia

SA - Supressão androgênica

TC - Tomografia computadorizada

TME - *Tumour microenvironment*

TNM – T – descrição do tamanho do tumor primário; N – se há ou não comprometimento de linfonodal e localização destes e M – se há ou não metástases à distância.

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TR – Toque retal

Tregs - Células T regulatórias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Câncer de próstata	14
1.2. Rastreamento e detecção precoce do câncer de próstata	15
1.3. Investigação inicial e estadiamento clínico	16
1.4. Tratamento do câncer de próstata	20
1.5. Sistema Purinérgico	22
1.6. Sistema Purinérgico, ectonucleotidasas e câncer	25
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. ARTIGO ORIGINAL	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
5. REFERÊNCIAS	57
6. ANEXOS.....	68
6.1. Anexo B - Aprovação do Projeto de Pesquisa CEP/PUCRS	69
6.2. Anexo C - Aprovação do CEP/HSPV	71
6.3. Anexo D –Modelo do TCLE	72
6.4. Anexo E –Modelo do questionário de coleta de dados	73

CAPÍTULO I

- INTRODUÇÃO
- OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de próstata

O câncer é um problema de saúde pública visto que nas próximas duas décadas a sua incidência mundial duplicará. Segundo o documento *World Cancer Biennial Report 2016 – 2017* da *International Agency for Research on Cancer* (Iarc), da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2012 foram diagnosticados cerca de 14,1 milhões de casos, enquanto que para o ano de 2035 são estimados 29,4 milhões de casos novos desta patologia (*OMS/Biennial Report 2016-2017*). A estimativa mundial da *Globocan/Iarc*, mostra que em 2012 mais de 60% destes diagnósticos ocorreram em países em desenvolvimento. Para a mortalidade, a situação agrava-se quando se constata que, dos 8,2 milhões de óbitos, aproximadamente 70% ocorreram nesses mesmos países (*Globocan/Iarc*, 2012). Observa-se que, nos países desenvolvidos, há um predomínio dos tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento, como pulmão, mama, próstata e cólon; enquanto que nos países em desenvolvimento, ainda há elevada ocorrência das neoplasias associadas a infecções, como colo de útero, estômago, esôfago e fígado (*Globocan/Iarc*, 2012). De uma forma geral, conforme o estudo de Ferlay e colaboradores em 2013, os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhões), mama (1,7 milhões), intestino (1,4 milhões) e próstata (1,1 milhões). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,8%), próstata (15%), intestino (10,1%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,1%), intestino (9,2%), pulmão (8,8%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (Ferlay et al., 2013).

Existe um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (53%) quanto na mortalidade por câncer (57%). O câncer de próstata (CP) é o segundo tipo de neoplasia mais frequente no sexo masculino, excetuando-se os cânceres de pele não melanocíticos, com cerca de 1,1 milhões de casos novos em 2012 (de Moor et al., 2013; Siegel et al., 2018). No Brasil, estima-se que no biênio 2018- 2019, serão diagnosticados 600 mil casos novos de câncer a cada ano. Deste total, aproximadamente 68 mil casos novos de CP/ano, correspondendo a um risco estimado de 66,12 casos novos a cada 100 mil homens; sendo mais frequente na Região Sul com 96,85/100 mil, enquanto na Região Norte há 29,41 casos novos a cada 100 mil homens (INCA, Estimativa 2018).

O CP apresenta números extremamente elevados, com uma mortalidade anual de cerca de 307.000 homens ao redor do mundo. No entanto, apesar da alta incidência suas taxas de mortalidade têm apresentado declínio em quase todas as regiões do mundo (Ferlay et al., 2013). No período 2010-2014, nos EUA, foi identificada a queda de 3,4% das mortes em consequência do CP (Forman et al., 2014). Logo, por se tratar de uma neoplasia com bom prognóstico, a probabilidade de sobrevida em cinco anos é superior a 80%, com aproximadamente 3.858.000 sobreviventes ao redor do mundo (Howlader et al., 2014; Ferlay et al., 2013).

1.2. Rastreamento e detecção precoce do câncer de próstata

Atualmente, não existe uma única recomendação para a detecção precoce do CP (Tabela 1), visto que há estudos com resultados conflitantes e com diferenças metodológicas importantes. Os métodos de rastreamento atualmente usados são o toque retal (TR) e a avaliação sérica do antígeno prostático específico (PSA), que é um biomarcador usado tanto para detecção precoce do CP quanto no seu seguimento (Catalona et al., 1991; Stamey et al., 1987). Conforme revisão da literatura, a recomendação da dosagem anual do PSA tem nível de evidência IB¹ e grau de recomendação C², ou seja, os estudos concluem que os benefícios e os riscos do procedimento não justificam a generalização de sua recomendação (Schröder et al., 2009; Andriole et al., 2009; Carroll et al., 2011; Bibbins-Domingo et al., 2017).

O estudo europeu ERSPC (*European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer*) demonstrou que o uso do PSA no rastreamento reduz em cerca de 20% a mortalidade decorrente desta doença, no entanto, a incidência elevada de diagnósticos precoces não reflete em aumento absoluto da sobrevida após mediana de 9 anos (Schröder et al., 2009). Já no estudo americano PLCO (*Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial*) não houve

¹Nível de evidência: I – Revisão sistemática com meta-análise. Estudo randomizado com amostra adequada. II – Estudo randomizado com amostra não calculada ou inadequada. III – Estudo prospectivo, não randomizado. IV – Estudo retrospectivo e V – Relatos de caso, opiniões de especialistas ou estudos pré-clínico.

²Grau de recomendação: A – Muito forte - a evidência é confiável, as incertezas são pequenas e pode ser usada para guiar a prática clínica; B – Forte - A evidência existente é confiável e pode ser usada para guiar a prática clínica na maioria dos casos, pois há algumas incertezas a considerar. C – Moderada - A evidência existente proporciona algum suporte para as recomendações, mas sua aplicação pode ser discutível. D – Fraca - A evidência existente é fraca, ou as incertezas são muito grandes. As recomendações devem ser aplicadas com cuidado.

benefício com o rastreamento anual com PSA e TR após seguimento de 7 a 10 anos (Andriole et al, 2009).

Tabela 1: Diretrizes para o rastreamento do CP.

Órgão	Diretriz
Sociedade Brasileira de Urologia	Homens acima de 40 anos com história familiar de CP: TR e PSA anual. Homens sem história familiar de CP: rastreamento a partir dos 50 anos.
Sociedade Americana de Cancerologia	Homens com expectativa de vida além de 10 anos devem ter a oportunidade de discutir com seu médico os prós e contras do rastreamento. Homens com risco familiar devem iniciar esta discussão a partir dos 45 anos, enquanto os homens sem risco familiar após os 50 anos.
<i>US Preventive Services Task Force</i>	Em 2017, voltou a recomendar a nível americano a decisão individualizada de rastreamento entre 55 e 69 anos, baseado em prós e contras e riscos do próprio paciente.
Associação europeia de Urologia	Recomenda oferecer um teste de PSA (<i>baseline</i>) entre os 40-45 anos e uma estratégia adaptada ao risco, baseado no resultado do PSA.
Associação Americana de Urologia	Recomenda decisão compartilhada a realização do rastreamento para os pacientes entre 55-69 anos e posiciona-se contra o rastreamento nos demais grupos etários.

(Sasse et al, 2017; Basch et al., 2012; Bibbins-Domingo et al., 2017; Parker et al., 2015; Carter et al., 2013).

1.3. Investigação inicial e estadiamento clínico

Em 1966, *Donald Gleason* propôs a classificação morfológica para o CP. A definição da Escala de Gleason (EG) também é essencial para determinar o estadiamento, conforme observado a Figura 1.

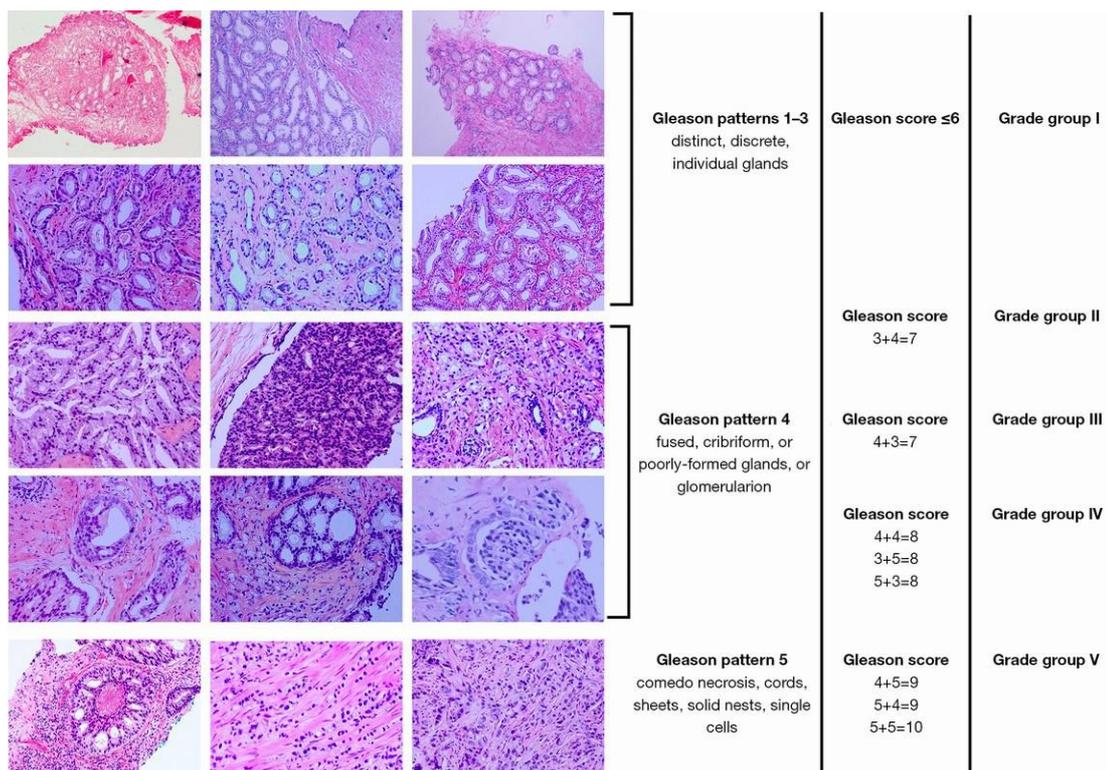


Figura 1: Padrões típicos da Escala de Gleason e seus grupos prognósticos correspondentes. (H&E: 100×–200×). (adaptado de Chen, 2016).

Em 1974, foi demonstrada a significância clínica baseada na determinação prognóstica do tumor, tornando a Escala de Gleason reconhecida mundialmente. Seus valores finais podem variar de 2 a 10 e estão diretamente relacionados ao prognóstico do paciente (Gleason, 1966; Gleason et al., 1974) (Tabela 2).

Tabela 2: Relação entre os grupos prognósticos e a graduação de Gleason.

Grupos prognósticos	Gleason	Características do Gleason
1	< ou = 6	< ou = 3 + 3
2	7	3 + 4
3	7	4+3
4	8	4 + 4
5	9 ou 10	4 + 5, 5 + 4, 5 + 5

(Pierorazio, 2013).

Conforme a oitava edição do *American Joint Committee on Cancer (AJCC – 8º)* o CP deve ser estadiado conforme o Sistema TNM; onde o T se refere ao tamanho do tumor primário, o N se há ou não comprometimento linfonodal e determina qual a localização destes linfonodos e por fim o M que representa a presença ou não de comprometimento metastático à distância (Tabela 3; Tabela 4) com objetivo de determinar a real extensão da doença, determinando sua severidade e guiando estratégias de tratamento.

Tabela 3: Agrupamento pelo Sistema TNM

Estádio	T	N	M	PSA	GP
I	cT1a-c, cT2a	N0	M0	< 10	1
	pT2	N0	M0	< 10	1
IIA	cT1a-c, cT2a, pT2	N0	M0	10 - 20	1
	cT2b-c	N0	M0	< 20	1
IIB	T 1- 2	N0	M0	< 20	2
IIC	T 1- 2	N0	M0	< 20	3
	T 1- 2	N0	M0	< 20	4
IIIA	T 1- 2	N0	M0	>20	1 – 4
IIIB	T 3 - 4	N0	M0	Qualquer	1 – 4
IIIC	Qualquer T	N0	M0	Qualquer	5
IVA	Qualquer T	N1	M0	Qualquer	Qualquer
IVB	Qualquer T	Qualquer	M1	Qualquer	Qualquer

(AJCC – 8º edição).

Conseqüentemente os pacientes serão agrupados conforme sua estratificação de risco demonstrada abaixo:

- Risco muito baixo: Estádio T1c, escore de Gleason ≤ 6 , Grau 1, PSA < 10 ng/mL, menos de 3 fragmentos de biópsia positivos com $\leq 50\%$ de comprometimento em cada fragmento e densidade do PSA < 0,15 ng/mL/g³.
- Risco baixo: Estádio \leq T2a, escore de Gleason ≤ 6 , Grau 1 e PSA < 10 ng/mL, excluídos os pacientes com características de risco muito baixo (acima).
- Risco intermediário: Estádio T2b ou T2c ou escore de Gleason 3 + 4 = 7 (Grau 2) ou escore de Gleason 4 + 3 = 7 (Grau 3) ou PSA 10-20 ng/mL.

³Densidade PSA = PSA sérico pré-operatório/ (peso da glândula prostática – 7 g da vesícula seminal). Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of no palpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA*. 1994 Feb 2; 271(5):368-74.

- Risco alto: Estádio \geq T3a ou escore de Gleason 8, Grau 4, ou escore de Gleason 9 ou 10, Grau 5, ou PSA $>$ 20 ng/mL.
- Risco muito alto: Estádio T3b ou T4 ou padrão do escore de Gleason primário 5/Grau 5 ou $>$ 4 fragmentos com Gleason escore 8-10/Grau 4 ou 5.

Tabela 4: Estadiamento do Câncer de Próstata.

Tumor primário (T)	Estadiamento clínico (cT)
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
T1	Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável.
T1a	Achado histológico incidental em 5% ou menos de tecido ressecado.
T1b	Achado histológico incidental em mais de 5% de tecido ressecado.
T1c	Tumor identificado por biópsia de agulha fina em um ou ambos os lobos, mas não palpável.
T2	Tumor palpável e confinado à próstata.
T2a	Tumor envolve metade ou menos de um dos lobos da próstata.
T2b	Tumor envolve mais do que a metade de um dos lobos da próstata, mas não os dois lobos.
T2c	Tumor envolve ambos os lobos.
T3	Tumor extraprostático que não é fixo ou não invade estruturas adjacentes.
T3a	Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral).
T3b	Tumor invade vesícula seminal (VS).
T4	Tumor está fixo ou invade estruturas adjacentes, que não a VS, como o esfíncter externo, reto, bexiga, musculatura elevadora pélvica/ou parede pélvica.

Tumor primário (T)	Estadiamento patológico (pT)
pT2	Confinado à próstata
pT3	Extensão extraprostática.
pT3a	Extensão extraprostática (uni ou bilateral) ou invasão microscópica do colovesical.
pT3b	Tumor invade VS.
pT4	Tumor está fixo ou invade estruturas adjacentes, que não as VS, como o esfíncter externo, reto, bexiga, musculatura elevadora pélvica/ou parede pélvica.

Linfonodos Regionais (N)	
Nx	Linfonodos regionais não avaliados.
N0	Ausência de metástases em linfonodos.
N1	Presença
Metástases à distância (M)	
M0	Não há presença de linfonodos.
M1	Presença de metástases à distância.
M1a	Metástases em linfonodos não regionais.
M1b	Metástases ósseas.
M1c	Metástases em outros sítios com ou sem metástases ósseas.

(AJCC – 8º edição).

Portanto, as recomendações atuais são para que os pacientes agrupados no baixo risco, não sejam submetidos a exames para rastreamento de linfonodos (LNFs) e de metástases ósseas; visto que o risco de metástases em LNFs nestes casos é inferior a 10% e de metástases ósseas em torno de 5% (Abuzallouf et al., 2004). Já os pacientes dos grupos de risco intermediário e alto, deverão realizar mapeamento ósseo (MO) e pesquisa de LNFs através de tomografia computadorizada (TC) e/ou ressonância nuclear magnética (RNM), sobretudo nos casos de estágio clínico (EC) T3 ou T4, Gleason > 8, PSA > 20 ou caso apresente sintomas (De Rooji et al., 2016).

Uma análise retrospectiva de 1.884 pacientes demonstrou que apenas 1,2% dos casos com escore de Gleason ≤ 7 e 12,5% daqueles com Gleason ≥ 8 apresentaram comprometimento radiológico linfonodal. No entanto, a positividade patológica para esses dois grupos foi de 6,7 e 22,9%, respectivamente (Abuzallouf et al., 2004). Logo, a investigação de comprometimento linfonodal por TC (ou RNM) está indicada em indivíduos com escore de Gleason ≥ 8 e doença localmente avançada. Estudos recentes sobre a acurácia da RNM no estadiamento do CP evidenciou alta especificidade e baixa sensibilidade global (De Rooji et al., 2016). A sensibilidade e a especificidade foram de 0,57 (IC de 95%: 0,49-0,64) e 0,91 (IC de 95%: 0,88-0,93) para detecção de extensão extracapsular/T3a (45 estudos, 5.681 doentes); de 0,58 (IC de 95%: 0,47-0,68) e 0,96 (IC de 95%: 0,95-0,97) para invasão de vesícula seminal/T3b (34 estudos, 5.677 doentes); e de 0,61 (IC de 95%: 0,54-0,67) e 0,88 (IC de 95%: 0,85-0,91) para o estadiamento global T3 (38 estudos, 4.001 doentes) (De Rooji et al., 2016).

Recentemente, foram publicados resultados promissores com o uso de PET/CT com o radiofármaco ^{68}Ga -PSMA para detecção de metástases no CP, principalmente na avaliação inicial de pacientes de alto risco e em pacientes com recorrência bioquímica e baixos valores de PSA (0,2 mg/ml a 10 ng/ml) (Brigantiet al., 2010; Morigi et al., 2015).

1.4. Tratamento do câncer de próstata

As opções de tratamento dependerão da severidade da doença, assim como da idade do paciente, a presença de morbidades e preferências individuais (Siegel et al., 2018). A taxa de sobrevida é favorável para os pacientes portadores de doença em fase mais inicial, estes geralmente são tratados com cirurgia e/ou radioterapia associada ou não à hormonioterapia adjuvante; no entanto ambas as modalidades de tratamento apresentam efeitos colaterais e

sequelas devido à terapêutica, como por exemplo, comprometimento sexual, urinário ou intestinal (Alicikus et al., 2011). A combinação da radioterapia (RTX) com a supressão androgênica (SA) está bem estabelecida para pacientes portadores de CP localmente avançado (Bolla et al., 1997; Pipepich et al., 2005). No entanto, estes benefícios não estão bem claros nos casos de CP localizado de riscos intermediário e alto (Heidenreich et al., 2014; D`Amico et al., 1998).

Vários estudos já comprovaram que mais de 30% dos pacientes com diagnóstico de CP localizado, de risco intermediário a alto e que são submetidos à RTX adjuvante exclusiva apresentam recidiva bioquímica nos 5 primeiros anos (Bolla et al., 2016). A percentagem de recidiva bioquímica é inferior naqueles pacientes que foram submetidos à RTX combinada com SA de curta duração, com conseqüente aumento da sobrevida livre de doença (D`Amico et al., 2008; Valicenti et al., 2011). A falha à RTX isolada ou associada à SA é definida com 2 valores do PSA > 0,2 ng/ml em pacientes que foram submetidos à prostatectomia radical ou pelo menos 3 elevações do PSA após o nadir da radioterapia, no grupo da radioterapia exclusiva ou associada à SA (Agarwal et al., 2008).

O tratamento inicial do CP avançado é baseado na redução dos níveis séricos de testosterona, com análogos de hormônio liberador de gonadotrofinas (GNRH) como a goserrelina ou a orquiectomia bilateral e/ou na inibição dos receptores androgênicos tumorais, através de antiandrogênicos periféricos como a bicalutamida. Invariavelmente, apesar da SA eficaz, a doença progride e se torna resistente à castração. Porém, mesmo nesse cenário o câncer de próstata castração resistente (CPCR) pode manter a dependência da via de sinalização androgênica através de mecanismos como a hiperexpressão ou mutação dos receptores androgênicos (RA), permitindo assim a estimulação por análogos androgênicos fracos ou por produção androgênica autócrina pelas células tumorais (Chen et al., 2004).

Portanto, a hormonioterapia (HMT), a quimioterapia (QTX), os bifosfonatos (como o ácido zoledrônico) ou o denosumabe e a RTX podem ser usados isolados ou em associação para o tratamento de pacientes com doença mais avançada. Nos últimos anos, novas terapêuticas foram aprovadas para o uso em pacientes com CPCR avançado sem resposta às terapêuticas tradicionais, incluindo vacinas que estimulam as células T (Provenge®, por exemplo), e novos fármacos anti-androgênicos, como a abiraterona (Zytiga®) ou a enzalutamida (Xtandi®), além do Radium – 223 (Kantoff et al., 2010; Kluetz et al., 2014).

1.5. Sistema Purinérgico

O ATP representa uma molécula chave nos processos celulares de troca de energia, através da hidrólise ou transferência do grupo fosfato terminal (Bonora et al., 2012). A sinalização purinérgica utiliza nucleotídeos de adenina como principais moléculas sinalizadoras no meio extracelular (Burnstock, 1972). Tanto a adenosina (ADO) quanto o monofosfato de adenosina (AMP) podem resultar da atividade da enzima CD39 (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) que converte ATP ou ADP em AMP, ou ainda da enzima CD73 (ecto-5'-nucleotidase) que converte AMP em adenosina (Zimmermann et al., 2012). Ambas enzimas, pertencem à família das ectonucleotidasas, que são descritas estruturalmente na Figura 2.

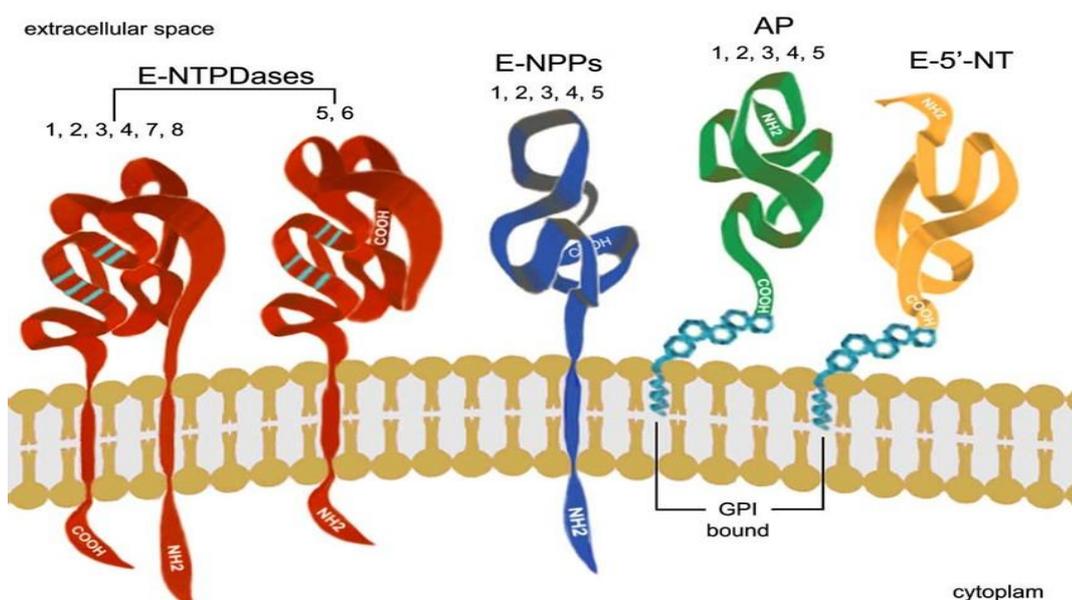


Figura 2: Topografia de membrana das principais enzimas representantes da família das ectonucleotidasas, as quais participam ativamente no metabolismo extracelular dos nucleotídeos. GPI – glicosil-fosfatidilinositol (adaptado de Cognato e Bonan, 2010).

Tais ectonucleotidasas são agrupadas em ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase – EC 3.6.1.5); ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (NPPs – EC 3.6.1.9/EC 3.1.4.1); fosfatase alcalina (AP – EC 3.1.3.1); ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto- 5'NT/CD73 – EC 3.1.3.5) e a enzima adenosina deaminase (ADA – EC 3.5.4.4). Todas elas agem de uma maneira bastante coordenada, controlando a sinalização dos nucleotídeos extracelulares ao hidrolisá-los (Zimmermann, 2000; Robson et al., 2006; Zimmermann et al., 2012).

A maioria das ectonucleotidasas recebem a designação de CD por parte dos imunologistas e EC acrescida de números por parte dos enzimologistas; por exemplo, a

NTPDase1 também pode ser chamada como CD39 (E.C. 3.6.1.5) enquanto a ecto-5'-nucleotidase pode ser chamada de CD73 (E.C. 3.1.3.5) (Salmi, 2005). A ectonucleotidase CD39 pertence ao grupo das NTPDases e está localizada na superfície da membrana plasmática (MP), sendo responsável pela transformação extracelular de ATP ou ADP em AMP, a que, por sua vez, se liga aos receptores do sistema purinérgico, ativando-os; além de estar associada à inibição da resposta das células T *Natural Killer* (NK), promovendo a supressão da resposta imune (Bastid et al., 2015).

Até o momento, foram clonados oito diferentes genes que codificam os membros pertencentes ao grupo das NTPDases. Os subtipos individuais diferem entre si na localização celular e também nas propriedades funcionais (Zimmermann, 2000; Zimmermann et al., 2012).

Os nucleotídeos de adenina promovem suas ações, ao atingirem concentrações na ordem de nanomolar (Di Virgilio, 2005) e interagem com receptores específicos. Ao ativá-los, eles desencadeiam importantes e diferentes efeitos sobre inúmeros processos biológicos incluindo contração muscular, secreção endócrina e exócrina, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, dor, modulação das funções cardíacas e neurotransmissão (Sträter, 2006). Portanto, dependendo do subtipo de receptor purinérgico existente na célula e as vias de sinalização possivelmente envolvidas, a estimulação via nucleotídeos extracelulares pode mediar uma resposta de curto prazo (resposta aguda) ou mesmo desencadear processos que afetam o metabolismo celular como um todo incluindo adesão celular, ativação da célula e migração (Robson et al., 2006).

A Adenosina (ADO) se liga a receptores metabotrópicos caracterizados como P1. Já o ATP e o ADP, ligam-se a receptores denominados como P2. Estes últimos são divididos em receptores associados a canais iônicos, conhecidos como P2X e ainda receptores P2Y que são acoplados à proteína G (Burnstock, 2007). A Figura 3 é uma representação dos receptores purinérgicos.

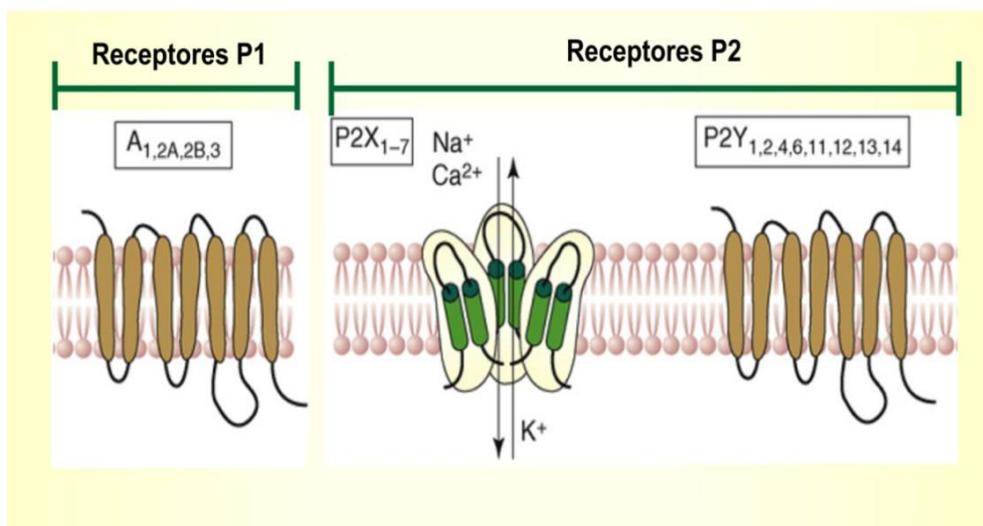


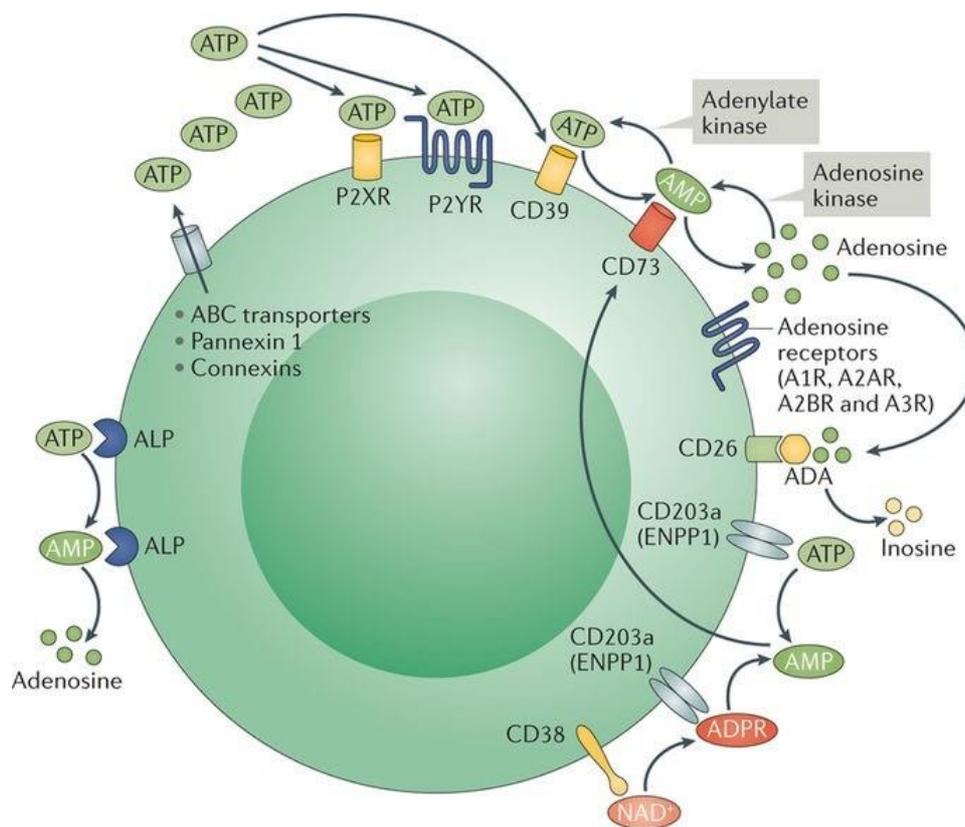
Figura 3: Estrutura fundamental dos receptores purinérgicos (adaptado de Abbraccio et al., 2009).

Os receptores P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) estão amplamente expressos, no entanto, sua afinidade para a molécula de adenosina varia conforme o subtipo, sendo que os A_1 e A_{2A} tem maior afinidade pelo nucleosídeo ($K_d < 30$ nM) ao passo que os receptores A_3 e A_{2B} apresentam baixa afinidade (1-20 μ M) (Ham et al., 2012).

Já foram descritos oito subtipos de receptores da família P2Y ($P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}$). Por serem acoplados a proteína G da mesma maneira que os receptores P1, os receptores P2Y apresentam sete domínios transmembrana, com a cauda N-terminal voltada para o meio extracelular e a C-terminal voltada para o meio intracelular (Burnstock, 2006). Os P2YR podem ativar a fosfolipase C (PLC), o que leva à liberação de cálcio no meio intracelular ou ainda afetar a adenililciclase ocasionando em alteração nos níveis de AMP cíclico (Burnstock, 2004). Quanto à ligação destes receptores à proteína-G, estes são subdivididos em dois grupos: $P2Y_{1,2,4,6,11}$ e $P2Y_{12,13,14}$. O primeiro grupo de receptores apresenta-se acoplado à proteína-Gq/G11, e regulam a atividade da PLC, controlando assim a liberação de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático. O segundo grupo modula a ação de canais iônicos e inibe a ação da enzima adenililciclase via proteína-Gi/o (Burnstock, 2006; Verkhratsky et al., 2009).

Os receptores P2X possuem uma forma trimérica composto por diferentes subunidades (Figura 3). Estas subunidades, codificadas por genes distintos, são classificadas em P2X1 até P2X7 de acordo com a ordem histórica de clonagem (Verkhratsky et al., 2009) e cada subunidade tem distintas propriedades farmacológicas e/ou fisiológicas (Kim et al., 2001).

A Figura 4 mostra uma representação das diferentes etapas da sinalização purinérgica.



Nature Reviews | Cancer

Figure 4: Adenosina – geração e sinalização. A hipóxia acarreta um acúmulo de ATP, e conseqüentemente este ATP estimula os receptores P2 (P2XRs e P2YRs) e é degradado em adenosina (ADO) pela ação seqüencial das ectonucleotidases CD39 e CD73. Esta via de degradação pode ser revertida na presença da adenosinaquinase. Além das ectonucleotidases, a fosfatase alcalina (FA) pode contribuir com a produção da ADO extracelular. Em algumas neoplasias, NDA+ (dinucleótido de nicotinamida e adenina) lançado podem hidrolisar a adenosina através da CD38, CD203a ou CD73 (adaptado de Vijayan et al., 2017).

1.6. Sistema Purinérgico, ectonucleotidases e câncer

A tumorigênese, a progressão e a metastatização é um complexo processo *in vivo* que envolve uma série de eventos, incluindo rápida proliferação de células mutantes, inibição do apoptose, angiogênese abundante, resposta imune ineficaz além da invasão pelas células tumorais em órgãos à distância. Nos últimos anos, várias vias de sinalização têm sido identificadas, e a sinalização purinérgica tem papel fundamental na progressão tumoral (Burnstock, 2013).

Caracteristicamente, os receptores purinérgicos estão expressos em várias neoplasias, sendo o receptor P2X7 (P2X7R) o mais consistentemente superexpresso (Zhang et al., 2004;

Deli et al., 2007; Slater et al., 2004; Raffaghello et al., 2006; Adinolfi et al., 2002). Além de ser uma promessa como terapia alvo no câncer de próstata (Ying et al., 2014), o P2X7R também está envolvido na resposta de determinados tumores à radioterapia. Gehring e colaboradores demonstraram em 2015, que o nível de expressão de P2X7R está diretamente relacionado à resposta de gliomas à radioterapia (Gehring et al., 2015). Além disso, sabe-se que diferentes receptores purinérgicos podem regular funções celulares diferentes (White et al., 2005).

Conforme mencionado anteriormente, o ATP extracelular interage com os receptores do sistema purinérgico e intermedia várias funções biológicas tumorais, incluindo proliferação celular, migração, diferenciação e morte celular (Abbracchio et al., 1998). Logo, esta molécula tanto pode agir na promoção do crescimento tumoral como pode apresentar uma função antineoplásica (Rapaport et al., 1989; Sychala et al., 2000).

Estudos em gliomas têm proposto que a baixa atividade E-NTPDásica poderia favorecer o acúmulo de ATP no interstício do tumor e a sua progressão tumor (Wink et al., 2003; Morrone et al., 2005). O catabolismo do ATP é extremamente baixo nestas células tumorais em comparação com astrócitos normais, devido a uma redução acentuada na expressão e atividade das ectonucleotidases, e a depleção de ATP tem sido relatada em reduzir o tamanho e as características dos tumores invasivos em um modelo animal de glioma (Morrone et al., 2006). De maneira interessante, a co-injeção de apirase/NTPDase1 (baixa razão de hidrólise ATP/ADP) com células de glioma diminuiu o crescimento de tumores implantados em ratos (Morrone et al., 2006). Outro dado interessante, mostrou que as células de glioma humano resistem à morte pelo ATP em altas concentrações (5mM) e ao BzATP (agonista do receptor P2X7) (Morrone et al., 2005), tornando-se relevante a investigação dos mecanismos envolvidos.

Além disso, a compreensão do microambiente tumoral (MT) tem levado à identificação de vias metabólicas indispensáveis à sobrevivência das células tumorais (Vijayan et al., 2017). A hipóxia tumoral induz a uma ampla rede de alterações metabólicas e imunológicas que favorecem o crescimento e a progressão tumoral (Hatfield et al., 2015; Semenza et al., 2013), acarretando o acúmulo de ATP extracelular, e conseqüentemente de ADO nos tumores (Busse et al., 1996; Blay et al., 1997), com efeito imunossupressivo e proangiogênico (Antonioli et al., 2013). Esse processo promove uma forte seleção entre as células tumorais acarretando em um aumento de sua agressividade (Biswas et al., 2015). Portanto, o MT é um sítio de produção e liberação de ATP extracelular e de conversão desta molécula em ADO (Wilhelm et al., 2010).

Sabe-se que os mecanismos de imunossupressão estão alterados nos tecidos tumorais, principalmente devido à hipóxia tecidual, consequentemente as células tumorais não são destruídas pelo sistema imune (Sitkovsky et al., 2014), apesar de que grande parte desses tumores seja infiltrado por células imunes, incluindo células T citotóxicas e células *NK*, mas sem que ocorra resposta antitumoral efetiva (Hanahan et al., 2011).

A produção de ADO pela via CD39/CD73 é reconhecida como o principal mecanismo de controle das células T regulatórias (Tregs). Tais células representam uma subpopulação das células T/CD4+, que são responsáveis pelo o controle da resposta imune aos antígenos (Bastid et al., 2013). A concentração de Tregs/CD39/CD73 está aumentada em diversos tipos de cânceres, portanto diretamente relacionada com o processo de crescimento tumoral e metastatização (Bastid et al., 2014 e Jin et al., 2010).

A compreensão das ações da CD39 no processo de imunossupressão tumoral é de suma importância, pois a imunorregulação desta via pode promover benefícios na sobrevida de alguns pacientes com câncer, alcançando bons resultados clínicos e respostas duradouras; consequentemente imunoterapias anticâncer poderiam ser mais bem estudadas (Bastid et al., 2015). Sabe-se que a expressão da CD39 é mais alta nos tumores endometriais, no melanoma e nos tumores de próstata do que nos tecidos normais, mas esta diferença não é estatisticamente significativa, no entanto sua expressão em linfomas está significativamente mais elevada (Kansas et al., 1991; Pulte et al., 2007).

Assim como a CD39, a CD73 tem sua expressão aumentada em diversos tipos de neoplasias, como por exemplo no câncer de mama. Loi e colaboradores demonstraram que quanto maior sua expressão, pior o prognóstico nas pacientes portadoras de câncer de mama triplo negativo (Loi et al., 2012). Em relação ao CP, Yang e colaboradores observaram que a expressão de CD73 elevada está mais frequentemente associada a metástases linfonodais (Yang et al., 2013).

Este estudo baseia-se na carência de estudos que analisem as interações entre o sistema purinérgico e o comportamento de malignidade dos tumores prostáticos, assim como a avaliação das ectonucleotidases como biomarcadores de progressão tumoral em pacientes com CP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o papel das ectonucleotidasas como biomarcadores de progressão tumoral em amostras de plasma de pacientes com diagnóstico câncer de próstata.

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar a atividade de hidrólise do ATP, ADP e AMP em amostras sanguíneas de pacientes portadores de câncer de próstata com voluntários sadios.
- Correlacionar dados clínicos e epidemiológicos provindos dos prontuários médicos com a as atividades de hidrólise do ATP, ADP e AMP.

CAPÍTULO II

ARTIGO ORIGINAL

Submetido à Revista *Molecular and Cellular Biochemistry*,

Fator de impacto, 2.669

3. ARTIGO ORIGINAL

Hydrolysis of ATP, ADP and AMP is increased in plasma of prostate cancer patients

Carla Gardani¹, Angelica Regina Cappelari², Julia Brandt³, Bruna Tertiliano⁴, Paula Engroff⁵,

#Fernanda B Morrone^{1,2,6}

¹ Escola de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil;

² Escola de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil;

³ Escola de Biociências, Graduação em Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil;

⁴ Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil;

⁵ Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil;

⁶ Escola de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil;

#Correspondingauthor

Dr. Fernanda Bueno Morrone,

AppliedPharmacologyLaboratory/Health Sciences School, Pontificia Universidade Catolica
do Rio Grande do Sul,

Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone number: +55 51 3353 3512; Fax number: +55 51 3353 3612.

E-mail address: fernanda.morrone@pucls.br; fbmorrone@gmail.com

Abstract

Prostate cancer is among the major malignancies that affect men around the world. Adenine nucleotides are important signaling molecules that mediate innumerable biological functions in pathophysiological conditions, including cancer. These molecules are degraded by several ectoenzymes named ectonucleotidases that, in a coordinated manner, produce adenosine in the extracellular medium. These enzymes can be found in cell membrane surface and soluble in the blood stream. Thus, the present study aimed to evaluate the hydrolysis of adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) in the plasma blood of patients with prostate cancer. Peripheral blood samples were collected and questionnaires were filed based on the clinical data of the medical records. The nucleotide hydrolysis was performed by malachite green method using ATP, ADP and AMP as substrates. Prostate cancer patients presented an elevated hydrolysis of all nucleotides evaluated when compared to healthy individuals. The correlation of ATP, ADP and AMP hydrolysis with clinico pathological data showed that patients with lower clinical stage (CS-IIA) presented an elevated ATP hydrolysis when compared to more advanced clinical stages (CS-IIB and CS-III). All clinical stages presented elevated AMPase activity. Therefore, we can suggest that the hydrolysis of ATP, ADP and AMP, producing adenosine in the blood stream, could be associated to prostate cancer progression, favoring the suppression of immune tumor response and favoring the cancer cell proliferation.

Key-words: prostate cancer; ATP; ADP; AMP; hydrolysis; plasma blood.

Introduction

Prostate cancer (PC) is one of the most common malignancies that affect men. In 2012, there were registered 1.1 million of cases [1, 2] and PC is considered one of the main causes of death among men in the world [3]. In 2014, there were about 3 million men living in the United States and around 233,000 of them were diagnosed with PC [4]. In Brazil, it is estimated that in the biennium 2018-2019, 600 thousand new cancer cases per year will be diagnosed. From these, approximately 68 thousand will be new cases of PC [5]. It is known that between 65-75% of PC patients evolved to bone metastasis and, early diagnosis and treatment can prevent such events, tending to prolong survival rate [6]. Prostatic cancer main risk factor is related to longevity, being rare in men younger than 50 years and common among men over 65, concentrating approximately 65% of the diagnosis in this age group [3].

Nowadays, the tracking methods used to determine tumor degree in PC include rectal touch (RT) and evaluation of prostatic serum antigen (PSA) levels, which is considered as a biomarker used to early detection and follow-up of illness [7, 8]. Following, digital rectal examination and core needle biopsy determine the tumor grade that is named as Gleason Score [9, 10]. After diagnosis, the tumor needs to be staged in accordance to the 8th edition of American Joint Committee on Cancer (AJCC – 8th) and grouped as its Clinical Stage (CS) [2,11]. The main treatment used to early stages of PC recommends radical prostatectomy or transurethral resection followed by radiotherapy plus androgenic suppression. The prognosis is good, with 80% until 5 years of survival [12, 13].

The Tumor Microenvironment (TME) presents great relevance to control cancer development and suppression of the tumor immune response [14]. Among the uncountable molecules that are in TME, we can highlight the nucleotide ATP and the nucleoside adenosine (ADO), which are present in the hypoxic environment of solid tumors [15]. Both are

extracellular molecules that promote important functions related to tumor progression. ATP is involved into initial tumor establishment to recruit immune cells to tumor host. It is released to extracellular medium by cell death and induces secretion of IL-1 β and IL-18 by dendritic cells. These cytokines promote the activation of NK cells, T-cells and macrophages, generating an inflammatory environment. On the other hand, ADO, which is a product of ATP hydrolysis, suppresses the antitumor immune system and subsequently protects the tumor mass favoring its progression [16].

Two main enzymes are responsible to control of extracellular ATP and ADO levels: NTPDase1/CD39 (CD39) and ecto-5'-NT/CD73 (CD73), respectively. Both are extracellular enzymes linked to cell membrane where CD39 promotes ATP and ADP hydrolysis, while CD73 hydrolyzes AMP and, in a coordinated way, producing ADO [15-17]. It was described that these ectoenzymes might be released in a soluble form associated to exosomes. These microvesicles were found in *in vitro* supernatant of cancer cells culture and in human blood samples [18-20]. It is very well established that CD39 and CD73 promote the tumor mass progression in different kinds of cancer [17] and still, they act modulating immune system to ensure the tumor progression [16]. Previous works demonstrated a high CD73 activity in serum of patients with head and neck cancer [21] and with intracranial neoplasias [22]. Clayton and collaborators 2011, shown that the supernatant of different kinds of tumor cells secreted exosomes with CD39 and CD73 activity, which modulated isolated T-cells [19]. In addition, samples of platelet-rich plasma of patients with breast cancer, presents ATP, ADP and AMP hydrolysis, which was attributed to CD39 and CD73 enzymes [23]. There are works that shown the involvement of ATP and ADO such as CD39 and CD73 in PC cell lines [17], however, few studies demonstrate the action of this system in patients' blood samples.

Actually, there is not a single recommendation to early PC detection. As mentioned above, the incidence of PC is elevated and the late diagnosis increase the proportion of relapse,

prolongs the time of illness and reduces patient's quality of life. Therefore, it is very important the search for new biomarkers and tools that facilitate the diagnosis and make it faster, reducing thus the time of treatment. In addition, knowing that CD39 and CD73 can modulate in a positive manner the tumor progression, mainly through the modulation of immune system, this work aims to evaluate ATP, ADP and AMP hydrolysis, which are substrates of these enzymes, in plasma blood samples of PC patients. Additionally, we intended to correlate these values with clinicopathological data, in order to find new biomarkers for PC detection.

Methods

Chemicals

Adenosine-5'triphosphate (ATP), Adenosine-5'diphosphate (ADP), Adenosine-5'monophosphate (AMP), Malaquite Green, Coomassie Blue and Tris-HCl were purchase by Sigma Aldrich.

Subjects

Twenty nine (29) patients with prostate cancer, monitored at Centro de Oncologia e Hematologia de Cruz Alta (COHCA) participated in this study which had a transversal character. Seventeen (17) healthy volunteers, without altered liver function or presence of chronic or acute disease, were included as controls in the study. All of them formalized their participation in the study through Adherence to Informed Consent Standards (AICS) before blood collection. The PC diagnosis was determined by a pathologist through pathological analysis, and they were grouped the by clinical stage (CS), graduation in the Gleason Score (GS), PSA and specific treatments that were submitted.

All clinical and pathological data of the patients studied are summarized at Table 1.

Data collection

Healthy and PC patients were submitted to peripheral blood collection (4mL) which was stored at plastic tubes with heparin. For blood plasma isolation, samples were centrifuged at 4000 rpm for 12 min. At the sequence, the supernatant was stored at -80°C until enzymatic analysis.

The study was approved by the Ethical Committee of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (CAAE: 62424416.0.0000.5336) and by the Ethical Council of the Hospital São Vicente de Paulo-CACON, Cruz Alta, RS (2017- 001).

Protein Analysis

The quantification of protein levels in healthy and patients plasma samples was performed by Coomassie Blue method, as described by Bradford *et al.*, 1976, using bovine serum albumin as standard [24].

Nucleotide hydrolysis evaluation

Briefly, for determination of nucleotide hydrolysis in blood plasma, the samples were incubated with Tris-HCl buffer 112.75 mM at final concentration and pH 8.0. The incubation protocol was performed as described by Moritz *et al.*, 2017 [25]. Samples plus Tris-HCl buffer were pre-incubated for 10 min at 37°C and to start the reaction, nucleotides (ATP, ADP and AMP) were added at 3 mM as final concentration. After 50 min, the reaction was stopped with trichloroacetic acid (TCA) 5% at final concentration and subsequently chilled on ice. Following, samples were centrifuged at 14.000 rpm by 12 minutes. In accordance to Chan *et al.*, 1986 [26], the amount of inorganic phosphate (Pi) was determined by Malachite Green method with minor modifications. A hydrolysis spontaneous control was performed to exclude

the non-enzymatic nucleotide hydrolysis. To this, plasma blood was added after the reactions had been stopped with TCA. All experiments were performed in triplicate. The levels of nucleotide hydrolysis were determined as nmol Pi/min/mg Protein.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard error mean (SEM). Statistical analyzes were performed through the Wilcoxon-Mann-Whitney with $\alpha = 5\%$, using the program R-3.3.0. The graphics were produced using Graphpad Prism 5.01, San Diego, CA, USA. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

In this study, we analyzed 29 patients with diagnostic of prostate adenocarcinoma. The median age of these patients was 63.3 years, and 20 (71.4%) presented PSA levels <10 . According to Gleason Scale, 24 patients (82.7%) were diagnosed as low grade and 5 (17.3%) were high grade GS. These evaluations generated the following classification of Clinical Stage: 1 (3.4%) patient with CS-I; 8 (27.6%) with CS-IIA; 14 (48.3%) with CS-IIB and 6 (20.7%) with CS-III. Twenty-eight (96.6%) patients were conducted to surgery, while 24 (82.2%) received hormone therapy and 16 (55.2%) received radiotherapy (Table 1).

We evaluated the nucleotides (ATP, ADP and AMP) hydrolysis profile in plasma blood of PC patients in comparison to healthy individuals (Figure 1A, 1B and 1C). The results demonstrated that PC patients presented elevated hydrolysis levels of all nucleotides tested (ATP 1.69 ± 0.31 ; ADP 1.42 ± 0.33 ; AMP 2.86 ± 0.43) when compared to healthy individuals (ATP 0.1094 ± 0.037 ; ADP 0.046 ± 0.021 ; AMP 0.185 ± 0.023). When we compared the nucleotides hydrolysis activity profile in PC cancer patients, we observed that there was a significant higher AMPase activity in comparison to the other groups evaluated (Figure 1D).

Subsequently, the results of nucleotides hydrolysis obtained into plasma blood were correlated with clinical and pathological data of PC patients. No significant differences were found in the correlation analysis of ATP, ADP and AMP hydrolysis with PSA levels and Gleason Score Grade (Figure 2 and 3). Interestingly, in the comparison with the patients Clinical Stage (CS), it was observed that patients with lower CS (IIA) presented a significant higher ATPase activity in relation to CS-IIB and CSIII (Figure 4A).

When we evaluated the nucleotides hydrolysis profile with each group of CS, it was possible to observe that in the CS-IIA, there were no significant differences between ATP, ADP and AMP hydrolysis (Figure 4B). However, for CS-IIB and CS-III the levels hydrolysis of ATP and ADP were reduced, and the AMP hydrolysis remained high. These results were more evident in the CS-III group (Figure 4B). Data presented herein lead us to suggest that patients with lower CS presented a higher ATP hydrolysis. On the other hand, AMPase activity was continuously elevated in PC patients, independent of their clinical stage.

Discussion

Data of the World Cancer Biennial Report 2016-2017 from the International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO)[3], showed that cancer is an unquestionable public health problem and that there is need of more innovation in strategies for tracking, treating and following the patients [12,13]. Among the countless alternatives that have been studied in the last years, the components of the purinergic system are highlighted [27]. It is known that ATP and ADO act in an orchestrated manner on antitumor immune response, resulting in pro-tumor benefits [17]. Here we demonstrated that samples of plasma blood of PC patients presented a high ATP, ADP and AMPase activity when compared to healthy individuals (Figure 1), showing that this malignancy promotes an alteration in the blood nucleotides metabolism.

In the tumor host, dead and tumor cells secrete ATP that acts as a chemoattractant to immune cells [16]. Its extracellular levels can reach micromolar concentrations promoting tumor cell death [28]. In this way, NTPDases, such as CD39, are required to maintain the tumor homeostasis by hydrolyzing ATP and producing ADP, and subsequently AMP which is substrate for CD73, that is considered the main responsible for extracellular ADO production [29]. In the inflamed tumor microenvironment, ADO promotes immunosuppression, protecting the tumor cells [16]. Beyond that, this nucleoside can promote cancer cell proliferation, differentiation, apoptosis of healthy stroma cells and favors angiogenesis [30]. Therefore, CD39 and CD73 coordinate the promotion of a pro-tumoral niche [28]. In fact, CD39 expression is altered in different kinds of tumors when compared to the respective normal tissue, including prostate cancer [31]. The same is demonstrated to CD73 that present a high expression in solid tumors [30] and is related to high malignancy grade and tumor progression [16; 32]. In addition to its function in the tumor microenvironment, CD39 and CD73 are described to be secreted in blood stream, associated to microvesicles named as exosomes [20; 33].

In the present study, we performed biochemical approaches to investigate the correlation among the nucleotide hydrolysis and patient's clinicopathological data including, PSA levels, Gleason Score and Clinical Stage. Regarding the results obtained, only the correlation of the nucleotides hydrolysis and CS showed significant results. Corroborating to our data, a study of Clayton and collaborators in 2011 [19], identified exosomes in the supernatant of different tumor cells, including DU-145 and PC3 lineages, both representative of prostate cancer, that expressed CD39 and CD73 and were capable of hydrolyzing ATP and AMP. In addition, this enzymatic activity attributed to exosomes derived from prostate cancer cells, promoted the activation of T-cells and dendritic cells, isolated from different individuals [19, 33]. Thus, we could suggest that ATP and AMP hydrolysis evidenced in the plasma samples of PC patients

presented here could be attributed to CD39 and CD73 activity, which are linked to circulating exosomes in the blood stream.

In an interesting way, patients with CS-IIA presented higher ATPase activity than CS-IIB and III patients (Figure 4A). On the other hand, ADPase and AMPase activities did not show significant differences among the CS. When we evaluated the nucleotides hydrolysis profile for each group of CS, it was possible to see that in patients with CS-IIA, the hydrolysis of ATP, ADP and AMP presented similar levels. However, in the CS-IIB and CS-III we observed that there was a significant reduction of ATP and ADP hydrolysis in comparison to AMP, which remained elevated in the all CS studied (Figure 4B). These hydrolysis profiles lead us to suggest that high ATPase activity observed in initial CS was involved in the initial tumor development, where hypoxic environment induces an elevated ATP secretion, which promotes the recruitment of immune system to tumor host [16] and protecting the tumor mass of the cytotoxic effect promoted by elevated ATP concentrations [26]. One could infer that the immunosuppression is promoted by ADO, which is a product of AMP hydrolysis evidenced in all CS (Figure 4B).

In conclusion, we can suggest that the coordinate action of NTPDases CD39 and CD73 observed in PC patients studied could modulate the immune system [30], and thus assure a favorable environment to PC progression. Additional experiments are necessary to corroborate this hypothesis, demonstrating the expression of these enzymes in the plasma and biopsies of PC patients.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES scholarships, PUCRS, LACOG and FINEP research grant “Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS” (PUCRSINFRA) # 01.11.0014-00. We would like to thank Me. Cesar Eduardo Jacinto

Moritz from UFRGS for your intellectual and technical advice.

Conflicts of Interest Notification

Potential conflicts of interest do not exist.

References

1. De Moor JS, Mariotto AB, Parry C, Alfano CM, Padgett L, Kent EE, Forsythe L, Scoppa S, Hachey M, Rowland JH. Cancer survivors in the United States: prevalence across the survivorship trajectory and implications for care. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013 Apr; 22(4):561-70. doi: 10.1158/1055-9965.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018 Jan; 68(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21442.
3. World Cancer Biennial Report 2016-2017 – IARC.
4. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014 Jul-Aug; 64(4):252-71. doi: 10.3322/caac.21235.
5. INCA - Instituto Nacional de Câncer (Brasil) – Estimativa 2018 – Incidência do Câncer no Brasil.
6. Chao HH, Mayer T, Concato J, Rose MG, Uchio E, Kelly WK. Prostate cancer, comorbidity, and participation in randomized controlled trials of therapy. *J Investig Med.* 2010 Mar; 58(3):566-8. doi: 10.231/JIM.0b013e3181cf9002.
7. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuann JJ, Petros JA, Andriole GL. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med.* 1991; Apr 25; 324 (17): 1156- 61 [Erratum in *N Engl J Med* 1991; Oct 31; 325 (18): 1324.]. doi: 10.1056/NEJM199104253241702.

8. STAMEY TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*. 1987; Oct 8; 317 (15): 909-16. doi: 10.1056/NEJM198710083171501.
9. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*. 1974 Jan; 111(1):58-64. PMID: 4813554.
10. Daniyal M, Siddiqui ZA, Akram M, Asif HM, Sultana S, Khan A. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(22):9575-8. Review.
11. AJCC Cancer Staging Manual Eighth Edition – AJCC 8th.
12. Howlader N, Mariotto AB, Woloshin S, Schwartz LM. Providing clinicians and patients with actual prognosis: cancer in the context of competing causes of death. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2014; (49): 255– 264. doi: 10.1093/jncimonographs/lgu022.
13. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1; 136(5): E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210.
14. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4; 144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
15. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2016 Mar; 16(3):177-92. doi: 10.1038/nri.2016.4.
16. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*. 2012 May; 33(5):231-7. doi: 10.1016/j.it.2012.02.009.

17. Burnstock G, DiVirgilio F. Purinergic signaling and cancer. *Purinergic Signalling*. 2013, 9 (4), 491 – 324. doi: 10.1007/s11302-013-9372-5.
18. Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors*. 2007; 31(2):77-98. PMID: 18806312.
19. Clayton A1, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol*. 2011 Jul 15; 187(2):676-83. doi: 10.4049/jimmunol.1003884.
20. Jiang ZG, Wu Y, Csizmadia E et al (2014) Characterization of circulating microparticle-associated CD39 family ecto-nucleotidases in human plasma. *Purinergic Signal* 10:611–618. doi: 10.1007/s11302-014-9423-6.
21. Lal H, Kumar L, Kohli GS, Sharma A, Goel H. Serum enzymes in head and neck cancer. IV: 5-nucleotidase. *J Laryngol Otol*. 1989 Feb; 103(2):200-2. PMID: 2538528.
22. Engroff P, Sgnaolin V, Azambuja AA, Viola F, Battastini AMO, Morrone F. Increased 5´nucleotidase activity in the blood sérum of brais tumor patients. *Vittalle – Revista de Ciências da Saúde* 28 (2016) 103 – 110.
23. Araújo MC, Rocha JBT, Morsch A, Zanin R. Bauchspiess R, Morsch VM, Schetinger MRC. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *BiochimicaetBiophysicaActa* 1740 (2005) 421– 426. doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.001.
24. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

25. Moritz CEJ, Teixeira BC, Rockenbach L, Oliveira AR, Casali EA, Battastini AMO. Altered extracellular ATP, ADP, and AMP hydrolysis in blood serum of sedentary individuals after an acute, aerobic, moderate exercise session. *Mol Cell Biochem.* 2017 Feb; 426(1-2):55-63. doi: 10.1007/s11010-016-2880-1.
26. Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380. doi: 10.1016/0003-2697(86)90640-8.
27. Battisti V, Maders LDK, Bagatini MD, Battisti IE, Belle LP, Santos KF, Maldonado PA, Thome GR, Schetinger MRC, Morsch VM. Ectonucleotidapyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosinedeaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: Influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 67 (2013) 203–208.
28. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological Reviews* 2017; 276: 121–144. doi: 10.1111/imr.12528.
29. Yegutkin GG. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit Rev BiochemMol Biol.* 2014 Nov-Dec; 49(6):473-97. doi: 10.3109/10409238.2014.953627.
30. Antonioli L1, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer.* 2013 Dec; 13(12):842-57. doi: 10.1038/nrc3613.
31. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy, Eliaou J-F, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* (2013) 32, 1743–1751. doi: 10.1038/onc.2012.269.

32. Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Cañedo A, Battastini AM. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem.* 2008 Dec; 319(1-2):61-8. doi: 10.1007/s11010-008-9877-3.
33. Salimu J, Webber J, Gurney M, Al-Tae S, Clayton A, Tabi Z. Dominant immunosuppression of dendritic cell function by prostate-cancer-derived exosomes. *J Extracell Vesicles.* 2017 Sep 3; 6(1):1368823. doi: 10.1080/20013078.2017.1368823.

Figure Legends

Figure 1 – Comparison of nucleotide hydrolysis between healthy individuals and PC patients. **A)** ATP, **B)** ADP and **C)** AMP hydrolysis was evaluated into plasma blood and final values were demonstrated as nmol Pi/min/mg Protein, as described in Material and Methods. The figure **D)** demonstrates the evaluation of nucleotide hydrolysis profile between PC patients. The experiments were performed in triplicate and data were expressed as mean \pm SEM. The * represent the significant difference in relation to ATP hydrolysis (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.001$) and # represent the significant difference in relation to ADP hydrolysis (## $p < 0.01$).

Figure 2 – Nucleotide hydrolysis in accordance to PSA levels. The nucleotide hydrolysis was considered in accordance to PSA levels: **A)** PSA < 10 , **B)** PSA 10 to 20 and **C)** PSA > 20 . Data were expressed as mean \pm SEM.

Figure 3 – Nucleotide hydrolysis in accordance to Gleason Score. The nucleotide hydrolysis: **A)** ATP, **B)** ADP and **C)** AMP were considered in accordance to Gleason Score. Patients were divided as Low Grade (Gleason 1 to 3) and High Grade (Gleason 4 and 5). Data were expressed as mean \pm SEM.

Figure 4 – Evaluation of nucleotide hydrolysis considering the Clinical Stage (CS) of PC patients. **A)** Analysis of each nucleotide hydrolysis profile between the different CS (IIA, IIB and III). The * represent the significant difference in relation to CS-IIA group (* $p < 0.05$). **B)** Profile of nucleotide hydrolysis in side of each CS group. The * represent the significant difference in relation to ATP hydrolysis (* $p < 0.05$) and # represent the significant difference in relation to ADP hydrolysis (# $p < 0.05$). The experiments were performed in triplicate and

data were expressed as mean \pm SEM. The statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis analysis follow by Dunn *Posthoc* test.

Table

Table 1: Clinical and pathological data of prostate cancer patients.

Characteristics	N	%
Age (years)		
Mean	63,3	
Range	51 to 82	
PSA		
< 10	20	71.4
10 to 20	5	17.9
> 20	3	10.7
Gleason – Grade		
Low grade	24	82.7
High grade	5	17.3
Histology		
Adenocarcinoma	29	100
Clinical Stage		
CS-I	1	3.4
CS-IIA	8	27.6
CS-IIB	14	48.3
CS-III	6	20.7
Surgery		
Yes	28	96.6
No	1	3.4
Transurethral Resection of the Prostate –TURP		
Yes	17	58.6
No	12	41.4
Radical Prostatectomy		
Yes	18	62.1
No	11	37.9
Radiotherapy		
Yes	13	55.2
No	16	4.8
Hormonotherapy		
Yes	24	82.8
No	5	17.2

Figures

Figure 1

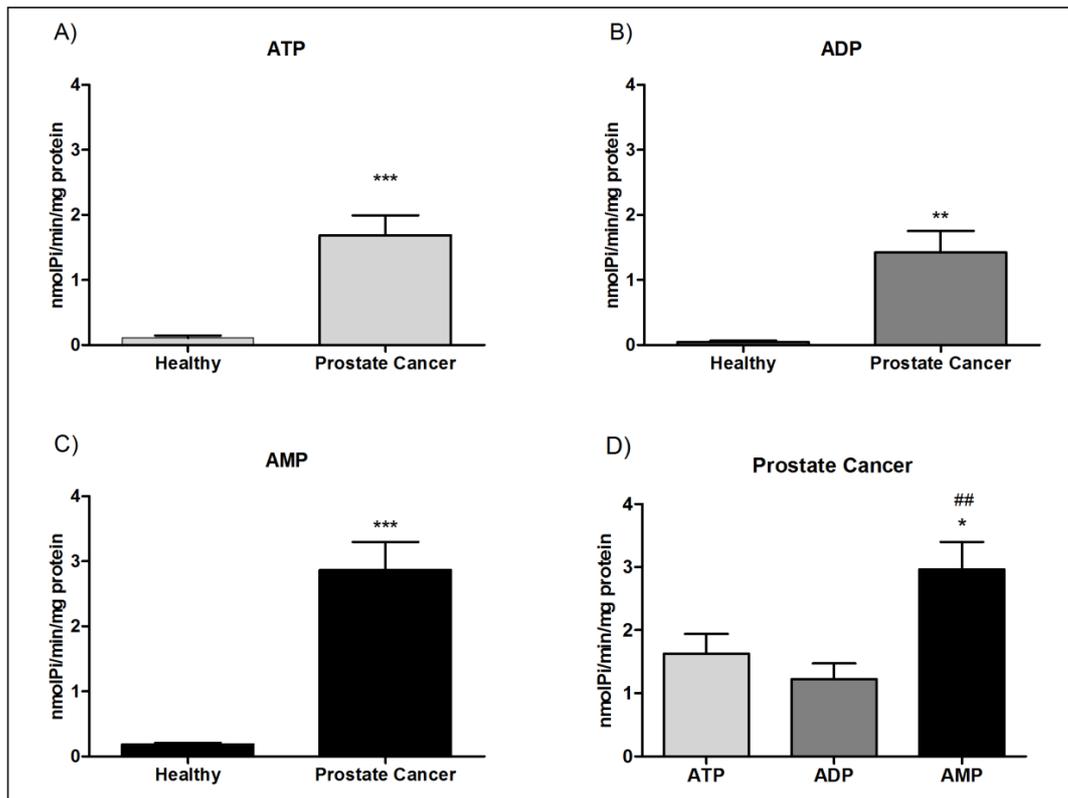


Figure 2

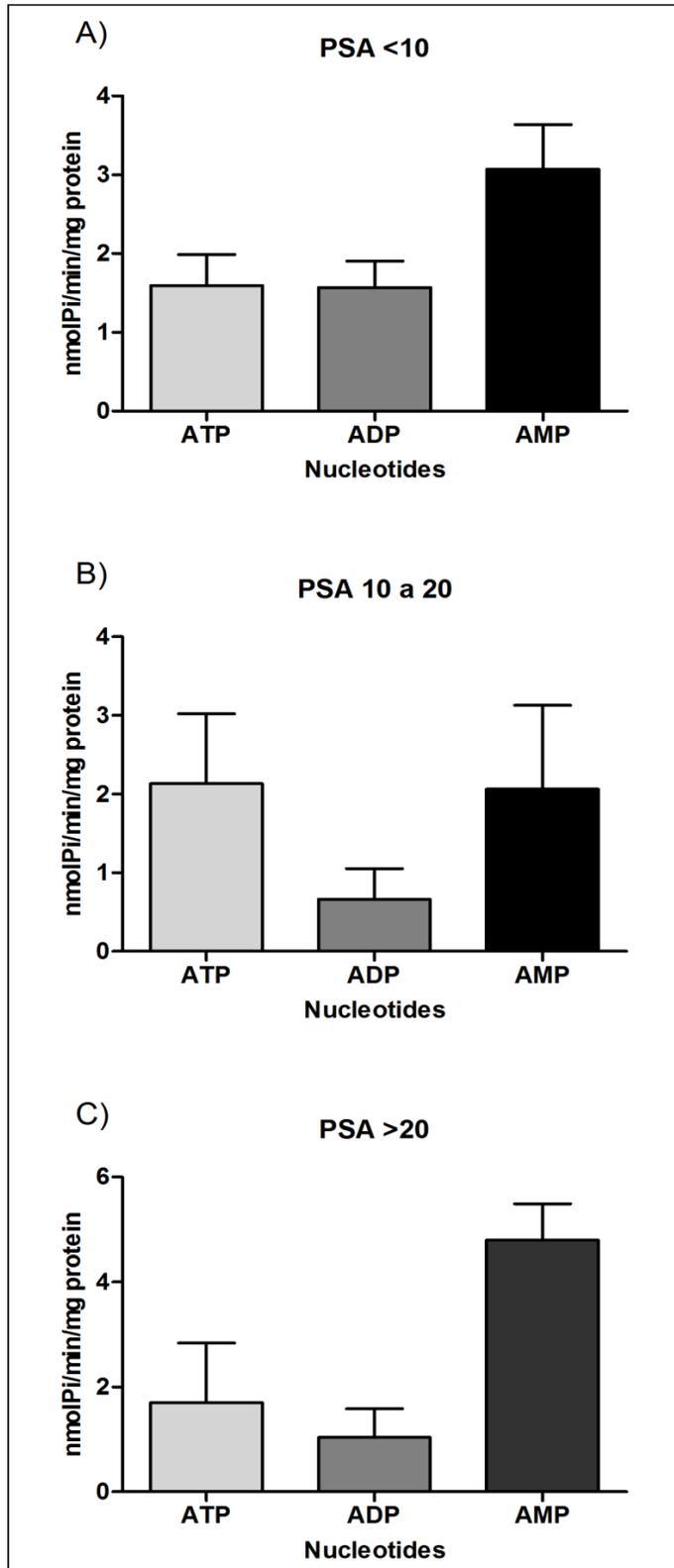


Figure 3

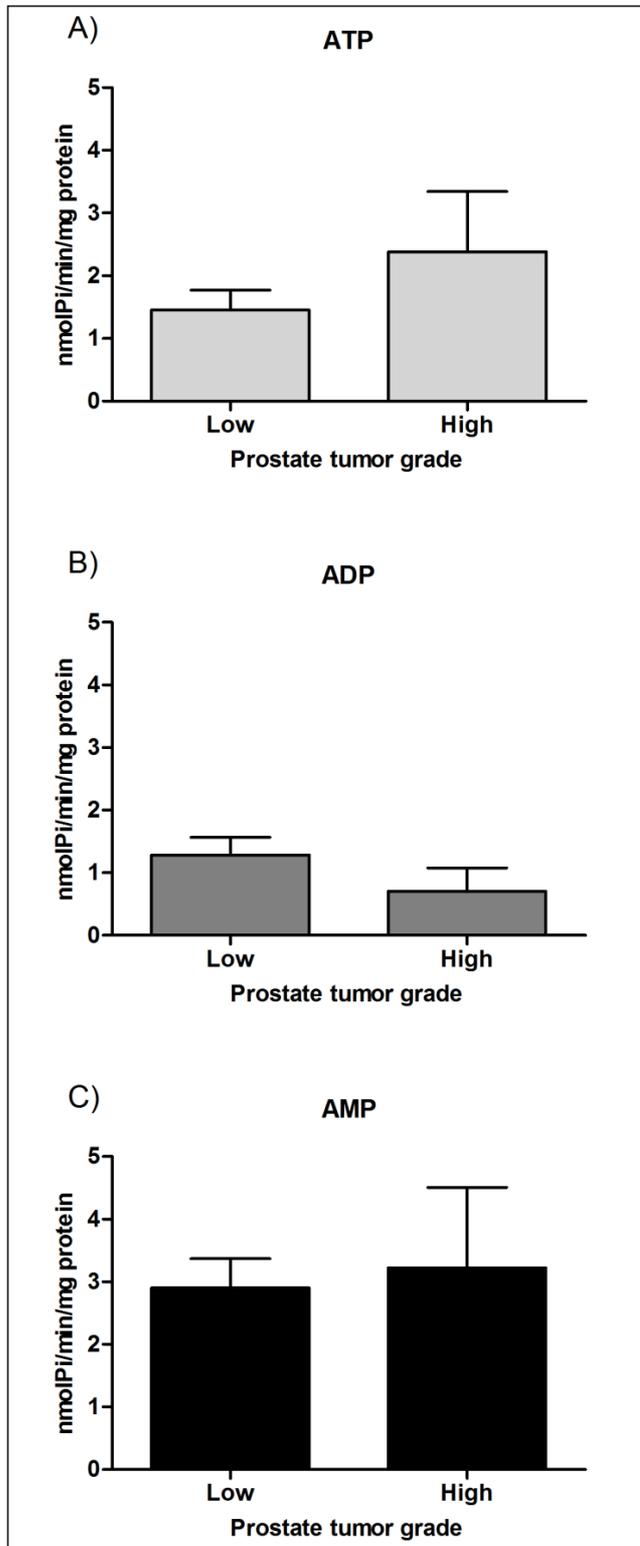
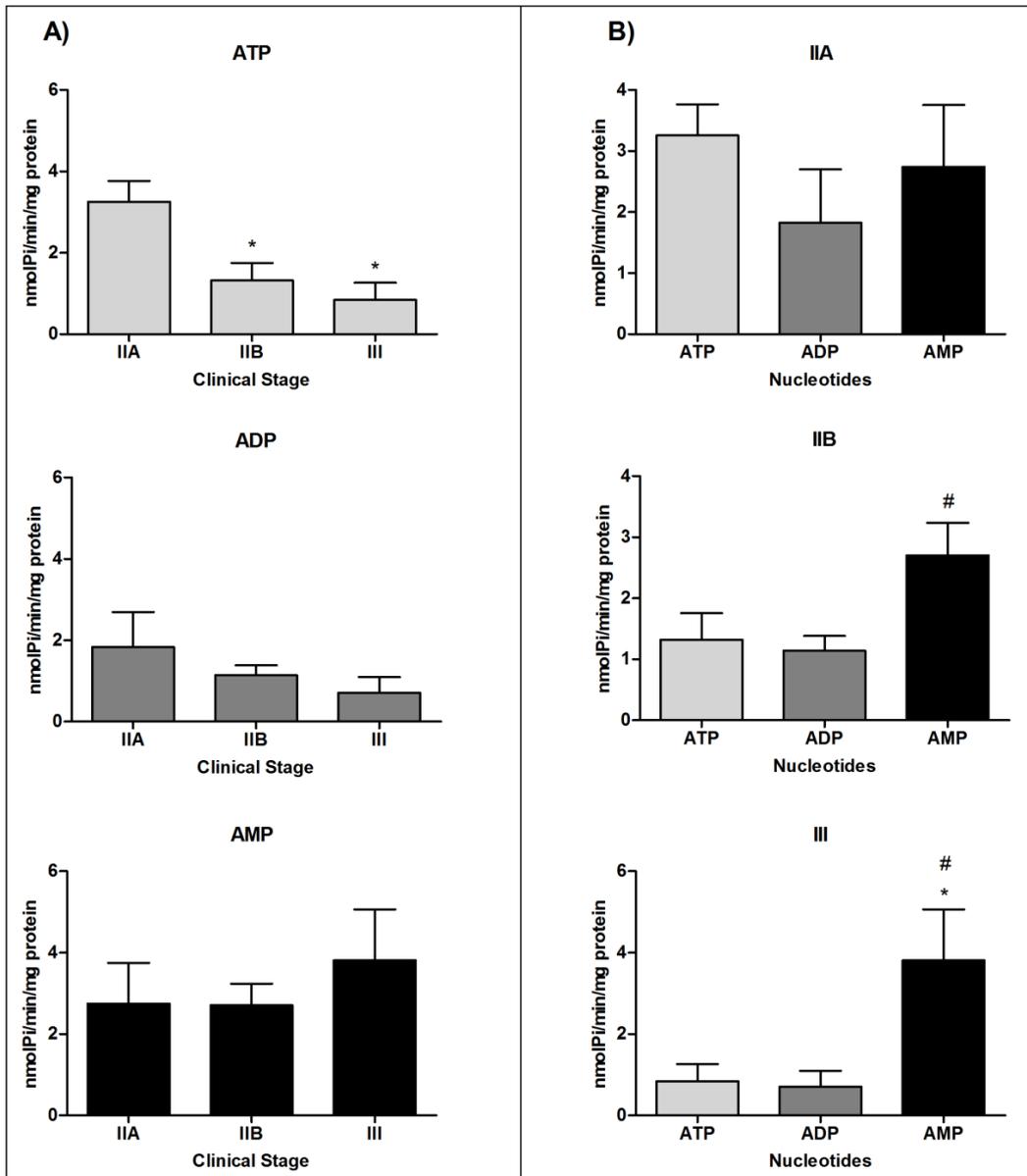


Figure 4



CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de próstata é uma das neoplasias mais frequentes, assim como uma das principais causas de morte no sexo masculino ao redor do mundo (Siegel et al., 2018). Visto que a maioria dos pacientes morre devido às complicações ocasionadas por metástases (Valastyan et al., 2011) é imperativo o reconhecimento através de biomarcadores de quais serão os pacientes que apresentarão pior desfecho. Por outro lado, a neoplasia de próstata apresenta taxa de sobrevida favorável, que permite que estes pacientes sejam acompanhados por longos períodos, também reforçando tal necessidade de seguimento adequado com biomarcadores sensíveis, além dos fatores prognósticos usados na atualidade.

No presente estudo, utilizamos abordagens bioquímicas a fim de investigar a relação das ectonucleotidases no plasma de pacientes com CP e voluntários sadios, através da análise direta da hidrólise dos nucleotídeos ATP/ADP/AMP. Os resultados demonstraram que os pacientes portadores de CP apresentavam elevado perfil de hidrólise dos três nucleotídeos em relação aos controles sadios. Além disso, destacamos também o conhecimento do perfil de hidrólise do ATP/ADP/AMP em pacientes portadores de CP conforme seu EC, demonstrando diferenças estatisticamente significativas entre eles. Por exemplo, os pacientes pertencentes ao EC IIA apresentaram atividade ATPase superior aos pacientes dos EC IIB e III. Já na observação individual dos ECs, percebeu-se que no estágio clínico IIA não houve diferença estatisticamente significativa entre as hidrólises do ATP/ADP/AMP, no entanto nos EC IIB e III é observada redução importante nas hidrólises do ATP e ADP. A hidrólise do AMP mantém-se elevada independentemente do EC avaliado.

Tais perfis diferentes nos estágios clínicos iniciais (EC IIA) nos faz pensar que essa elevação se deve as alterações no MT, onde a hipóxia tecidual gera a liberação de acentuadas concentrações de ATP no meio extracelular, conseqüentemente este ATP elevado sofre as ações das ectonucleotidases, CD39/CD73, principalmente, originando ADO. Esta ADO liga-se a receptores purinérgicos P1 e inibindo a atividade das células T e *natural killer*, suprimindo a resposta imune. Já nos estágios mais avançados, EC IIB e EC III há menos ATP e ADP circulante, acarretando um menor recrutamento das células imunes, com conseqüente maior atividade e agressividade por parte das células tumorais.

Correlacionando as atividades ATPase, ADPase e AMPase com os EC e sugerindo que estas atividades sejam relacionadas a CD39 e CD73 é possível supor que há o envolvimento das ectonucleotidases durante o processo de progressão do CP, onde EC menores apresentam

uma elevada atividade ATPásica e AMPásica, enquanto que em EC mais avançados temos uma menos atividade ATPásica e uma elevada atividade AMPásica. No entanto serão necessários mais estudos para esta confirmação, idealmente estudos de caráter prospectivo, onde poderão ser analisadas as expressões desta enzima no plasma de pacientes e também através da imunohistoquímica, no momento do diagnóstico anatomopatológico, como já anteriormente relatado por Bastid em 2017; além de correlacioná-las com análises do plasma no momento do diagnóstico, após o tratamento e no caso de recidivas bioquímicas por exemplo.

Diante do exposto, é de suma importância a compreensão dos fatores que influenciam a progressão tumoral e o entendimento das ações das ectonucleotidases neste processo, visando melhorar a expectativa e a qualidade de vida dos pacientes com este tipo de câncer.

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO MP and Burnstock, G. Purinergic Signalling: Pathophysiological Roles. *Jpn J Pharmacology*. 1998; 78, 113 – 145.

ABBRACCHIO MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 2009 Jan; 32 (1): 19 - 29.

ABUZALLOUF S, Dayes I, Lukka H. Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature. *J Urol*. 2004; 171, 2122–2127.

ADINOLFI E, Melchiorri L, Falzoni S, Chiozzi P, Morelli A, Tieghi A, Cuneo A et al. P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Jan 15; 99 (2): 706- 8.

AGARWAL PK, Sadetsky N, Konety BR, Resnick MI, Carroll PR. Treatment failure after primary and salvage therapy for prostate cancer: likelihood, patterns of care, and outcomes. *Cancer*. 2008 Jan 15; 112 (2): 307 - 14.

AJCC – American Joint Committee on Cancer 8th edition.

ALICIKUS ZA, Yamada Y, Zhang Z, Pei X, Hunt M, Kollmeier M, Cox B, Zelefsky MJ. Ten-year outcomes of high-dose, intensity-modulated radiotherapy for localized prostate cancer. *Cancer*. 2011 Apr 1;117(7):1429-37.

ANDRIOLE GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR et al: Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med*. 2009 Mar 26: 360 (13):1310-9.

ANTONIOLI L, Blandizzi C, Pacher P, Hasko G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*. 2013 Dec;13(12):842-57.

ANTONIOLI L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013; 19: 355–67.

BASCH E, Oliver TK, Vickers A, Thompson I, Kantoff Philip, Parnes H. Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen testing: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 3020- 3025.

BASTID J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*. 2013 Apr 4;32 (14): 1743- 51.

BASTID J, Regairaz A, Bonnefoy N, Déjou C, Giustiniani J, Laheurte C et al. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res*. 2015 Mar; 3 (3): 254- 65.

BASTID J, Regairaz A, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. Lymphocyte-derived interleukin-17A adds another brick in the wall of inflammation-induced breast carcinogenesis. *Oncoimmunology*. 2014 Mar 27; 3: e28273.

BIBBINS-DOMINGO K, Grossman DC, Curry SJ. The US Preventive Services Task Force 2017 Draft Recommendation Statement on Screening for Prostate Cancer: An Invitation to Review and Comment. *JAMA*. 2017 May 16; 317 (19): 1949- 1950; 2017 May 16.

BIENNIAL REPORT 2016-2017 - International Agency for Research on Cancer (IARC).

BLAY J, White, TD, Hoskin, DW. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res*. 1997 Jul 1; 57 (13): 2602-5.

BOLLA M, Gonzalez D, Warde P, DUBOIS JB, Mirimanoff RO, Storme G et al. Improved survival in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy and goserelin. *N Engl J Med*. 1997 Jul 31; 337 (5) : 295-300.

BOLLA M, Maingon P, Carrie C, Villa S, Kitsios P, Poortmans PM, Sundar S, van der Steen-Banasik EM et al: Short Androgen Suppression and Radiation Dose Escalation for

Intermediate- and High-Risk Localized Prostate Cancer: Results of EORTC Trial 22991. *J Clin Oncol*. 2016 May 20; 34 (15): 1748- 56.

BONORA M, Patergnani S, et al. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal*. Sep;8(3):343-57 (2012).

BONORA M, Patergnani S, Rimessi A, De Marchi E, Suski JM, Bononi A et al. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal*. 2012 Sep; 8 (3): 343- 57.

BRIGANTI A, Passoni N, Capitanio U, Suardi N, Gallina A, Da Pozzo LF et al. When to Perform Bone Scan in Patients with Newly Diagnosed Prostate Cancer: External Validation of the Currently Available Guidelines and Proposal of a Novel Risk Stratification Tool. *Eur Urol*. 2010 Apr; 57 (4):551- 8.

BURNSTOCK G, DiVirgilio F. “Purinergic signaling and cancer”. *Purinergic Signalling*. 2013, 9 (4), 491 – 324.

BURNSTOCK G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem*. 2004; 4 (8): 793-803.

BURNSTOCK G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, 2007 Jun; 64 (12):1471- 83.

BURNSTOCK G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*. 1972 Sep, 24 (3): 509-81.

BURNSTOCK G. Purinergic signalling--an overview. *Novartis Found Symp*. 2006; 276: 26- 48; discussion 48- 57, 275- 81.

BUSSE M, Vaupel P. Accumulation of purine catabolites in solid tumors exposed to therapeutic hyperthermia. *Experientia*. 1996 May 15; 52 (5): 469- 73.

CARROLL PR, Whitson JM, Cooperberg MR. Serum prostate-specific antigen for the early detection of prostate cancer: always, never, or only sometimes? *J Clin Oncol*. 2011 Feb 1;29 (4): 345-7.

CARTER HB, Albertsen PC, Barry MJ, Etzioni R, Freedland SJ, Greene KL et al., 2013. Early Detection of Prostate Cancer: AUA Guideline. *J Urol*. 2013 August; 190 (2): 419 – 426.

CATALONA WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuann JJ, Petros JA, Andriole GL. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med*. 1991; Apr 25; 324 (17): 1156- 61 [Erratum in *N Engl J Med* 1991; Oct 31; 325 (18): 1324.].

CHEN CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vesella R et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med*. 2004 Jan; 10 (1): 33-39.

CHEN N, Zhou Q. The evolving Gleason grading system. *Chin J Cancer Res*. 2016 Feb; 28 (1): 58 – 64.

COGNATO GP, Bonan CD. Ectonucleotidases and Epilepsy. *The Open Neurosc J*, 2010, 4, 44-52.

D'AMICO AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998 Sep 16; 280 (9): 969-974.

DE MOOR JS, Mariotto AB, Parry C, Alfano CM, Padgett L, Kent EE et al. Cancer survivors in the United States: Prevalence across the survivorship trajectory and implications for care. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013; 22: 561- 57.

DE ROOJI M, Hamoen EH, Witjes JA, Rovers MM. Accuracy of Magnetic Resonance Imaging for Local Staging of Prostate Cancer: A Diagnostic Meta-analysis. *Eur Urol*. 2016; Aug; 70 (2): 233-45.

DELI T, Varga N, Adám A, Kenessey I, Rásó E, Puskás LG et al. Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int J Cancer*. 2007 Jul 1; 121 (1): 55- 65.

DESANTIS CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014; 64: 252-271.

DI VIRGILIO F. Purinergic Mechanism in the Immune System: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling*, 1:205-209 (2005).

FERLAY J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1;136(5): E359-86.

FORMAN D, Brewster DH, Kohler B, Piñeros M. Introduction. *IARC Sci Publ.* 2014;(164 Pt 1):23-36.

GEHRING MP, Kipper F, Nicoletti NF, Sperotto ND, Zanin R, Tamajusuku AS, Flores DG, Meurer L, Roesler R, Filho AB, Lenz G, Campo MM, Morrone FB. P2X7 receptor as predictor gene for glioma radiosensitivity and median survival. *Int J Biochem Cell Biol*, 68: 92-100 (2015).

GLEASON DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol.* 1974 Jan; 111(1): 58- 64.

GLEASON DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep.* 1966 Mar; 50 (3):125– 128.

HANAHAN D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4; 144 (5): 646- 74.

HATFIELD SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Schreiber TH, Belikoff B, Abbott R *et al.* Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci. Transl Med.* 2015 Mar 4; 7 (277): 277- 30.

HEIDENREICH A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Kwastf T et al. European Association of Urology: EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *EurUrol*. 2014 Feb; 65 (2): 467-479.

HOWLADER N, Mariotto AB, Woloshin S, Schwartz LM. Providing clinicians and patients with actual prognosis: cancer in the context of competing causes of death. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2014; (49): 255– 264.

INCA - Instituto Nacional de Câncer (Brasil) – Estimativa 2018 –Incidência do Câncer no Brasil.

JIN D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ et al. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res*. 2010 Mar 15;70(6):2245-55.

KANSAS GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol*. 1991 Apr 1; 146 (7): 2235- 44.

KANTOFF PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 29;363 (5): 411-422.

KIM M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J*. 2001 Nov 15; 20 (22): 6347-58.

KLUETZ PG, Pierce W, Maher VE, Tang S, Song P, Liu Q et al. Radium Ra 223 dichloride injection: U.S. Food and Drug Administration drug approval summary. *Clin Cancer Res*. 2014 Jan 1; 20 (1): 9-14.

LOI S, Pommey S, Haibe-Kains B et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012, 20 (2), 103 – 107.

MORIGI, JJ, Stricker PD, Leeuwen PJ, Tang R, Ho B, Nguyen Quoc et al. Prospective comparison of the detection rate of 18 F-Fluoromethylcholine and 68 Ga-PSMA-HBED PET/CT in men with prostate cancer with rising PSA post curative treatment, being considered for targeted therapy. *J Nucle Med.* 2015 Aug; 56 (8): 1185 – 90.

MORRONE FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Sarkis JJ, Salbego CG, Lenz G, Battastini AM. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurooncol.* 2005 Jan;71(2):135-40.

MORRONE FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Battastini AM. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer.* 2006 Sep 23;6:226.

OMS/IARC Biennial Report 2016 –2017.

PARKER C, Gillessen S, Heidenreich A, Horwich A, on behalf of the ESMO Guidelines Committee. *Annals of Oncology.* 2015; 26 (Supplement 5): v 69– v 77.

PIERORAZIO PM, Walsh PC, Partin AW and Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int.* 2013 May: 111 (5): 753 – 760.

PILEPICH MV, Winter K, Lawton CA, Krisch RE, Wolkov HB, Movsas B et al. Androgen suppression adjuvant to definitive radiotherapy in prostate carcinoma: Long-term results of phase III RTOG 85-31. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005; v 61, 5, 1285–1290.

PULTE ED, Broekman MJ, Olson KE, Drosopoulos JH, Kizer JR, Islam N, et al. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thromb Res.* 2007; 121 (3): 309- 17.

RAFFAGHELLO L, Chiozzi P, Falzoni S, Di Virgilio F, Pistoia V. The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2006 Jan 15; 66 (2): 907- 14.

RAPAPORT E; Fontaine, J. Anticancer activities of adenine nucleotides in mice are mediated through expansion of erythrocyte ATP pools. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989 Mar; 86 (5): 1662 – 6.

ROBSON SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family os ectonucleotidases: Structure function relationships and pathological significance. *Purinergic Signalling.* 2006 Jun; 2 (2): 409- 30.

SALMI M, Jalkamen S. Cell surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol.* 2005 Oct; 5 (10): 760- 71.

SASSE AD, Wiermann EG, Herchenhorn D, Bastos DA, Schutz FA, Maluf FC et al. *Int Braz J Urol.* 2017 May- Jun; 43 (3): 407- 415.

SCHRÖDER FH. PSA screening--a review of recent studies. *Eur J Cancer.* 2009 Sep;45 Suppl 1:402-4.

SEMENZA GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J. Clin. Invest.* 2013 Sep;123(9):3664-71.

SIEGEL RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018 Jan; 68 (1): 7-30.

SITKOVSKY MV, Hatfield S, Abbott R, Belikoff B, Lukashev D, Ohta A. Hostile, hypoxia-A2- adenosinergic tumor biology as the next barrier to overcome for tumor immunologists. *Cancer Immunol Res*2:598–605 (2014).

SLATER M, Danieleto S, Gidley-Baird A, Teh LC, Barden JA. Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology*. 2004 Mar; 44 (3): 206- 15.

SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther*. 2000 Aug-Sep; 87 (2-3): 161- 73.

STAMEY TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*. 1987; Oct 8; 317 (15): 909-16.

STRÄTER N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signal*. 2006 Jun; 2 (2): 343- 50.

VALASTYAN S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011 Oct 14; 147 (2): 275- 92.

VALICENTI RK, Bae K, Michalski J, Sandler H, Shipley W, Lin A, Cox J. Does hormone therapy reduce disease recurrence in prostate cancer patients receiving dose-escalated radiation therapy? An analysis of Radiation Therapy Oncology Group 94-06. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011 Apr 1; 79 (5): 1323-9.

VERKHRATSKY A, Krishtal OA, Burnstock G. Purinoceptors on neuroglia. *MolNeurobiol*. 2009 Jun; 39 (3): 190- 208. *Mol Neurobiol*. 2009 Jun;39(3):209. Alexei [corrected to Verkhatsky, Alexei].

VIJAYAN D, Young A, Teng MWL, Smyth MJ. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017 Dec; 17 (12): 709- 724.

WHITE N; Butler PE, Burnstock G. Human melanomas express functional P2 X (7) receptors. *Cell Tissue Res*. 2005 Sep; 321 (3): 411- 8.

WILHELM K, Ganesan J, Müller T, Dürr C, Grimm M, Beilhack A et al. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med.* 2010 Dec; 16 (12): 1434- 8.

WINK MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku AS, Schwartzmann G, Sarkis JJ, Battastini AMO: Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett* 2003, 198:211-218.

YANG Q, Du J, Zu L. Overexpression of CD73 in prostate cancer is associated with lymph node metastasis. *Pathology Oncology Res.* 2013. 19 (4), 811 – 814.

ZHANG XJ, Zheng GG, Ma XT, Yang YH, Li G, Rao Q, Nie K et al. Expression of P2X7 in human hematopoietic cell lines and leukemia patients. *Leuk Res.* 2004 Dec; 28 (12): 1313- 22.

ZIMMERMANN H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling.* 2012 Sep; 8 (3): 437- 502.

ZIMMERMANN H. Extracellular Metabolism of ATP and Other Nucleotides. *Naunyn-Schmiedebergs Arch of Pharmacol.* 2000 Nov; 362 (4-5): 299- 309.

CAPÍTULO V

ANEXOS

6.1. Anexo B – Aprovação do Projeto de Pesquisa CEP/PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES P2X7 e CD39 COMO MARCADORES DE RESPOSTA À RADIOTERAPIA EM CÂNCER DE PRÓSTATA

Pesquisador: Fernanda Bueno Morrone

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 62424416.0.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.408.728

Apresentação do Projeto:

O pesquisador principal do estudo: "AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES P2X7 e CD39 COMO MARCADORES DE RESPOSTA À RADIOTERAPIA EM CÂNCER DE PRÓSTATA" encaminhou ao CEP-PUCRS, em 10/11/2017, a emenda contendo os seguintes documentos:

- emenda.pdf;
- TCLE1.docx;
- chefecacon.docx;
- Resumo.docx.

Objetivo da Pesquisa:

O pesquisador principal do estudo: "AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES P2X7 e CD39 COMO MARCADORES DE RESPOSTA À RADIOTERAPIA EM CÂNCER DE PRÓSTATA" encaminhou ao CEP-PUCRS, em 10/11/2017, a emenda contendo os seguintes documentos:

- emenda.pdf;
- TCLE1.docx;
- chefecacon.docx;
- Resumo.docx.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador principal do estudo: "AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES P2X7 e CD39 COMO

Endereço: Av Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@puors.br

Continuação do Parecer: 2.408.728

MARCADORES DE RESPOSTA À RADIOTERAPIA EM CÂNCER DE PRÓSTATA" encaminhou ao CEP-PUCRS, em 10/11/2017, a emenda contendo os seguintes documentos:

- emenda.pdf;
- TCLE1.docx;
- chefeacon.docx;
- Resumo.docx.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador principal do estudo: "AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES P2X7 e CD39 COMO MARCADORES DE RESPOSTA À RADIOTERAPIA EM CÂNCER DE PRÓSTATA" encaminhou ao CEP-PUCRS, em 10/11/2017, a emenda contendo os seguintes documentos:

- emenda.pdf;
- TCLE1.docx;
- chefeacon.docx;
- Resumo.docx.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador principal do estudo: "AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES P2X7 e CD39 COMO MARCADORES DE RESPOSTA À RADIOTERAPIA EM CÂNCER DE PRÓSTATA" encaminhou ao CEP-PUCRS, em 10/11/2017, a emenda contendo os seguintes documentos:

- emenda.pdf;
- TCLE1.docx;
- chefeacon.docx;
- Resumo.docx.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP-PUCRS, de acordo com suas atribuições definidas na Resolução CNS n° 466 de 2012 e da Norma Operacional n° 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_100592_2_É1.pdf	10/11/2017 10:34:59		Aceito

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703
Bairro: Partenon CEP: 90.619-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@puccrs.br

6.2. Anexo C - Aprovação do CEP/HSPV



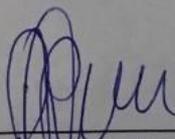
AUTORIZAÇÃO

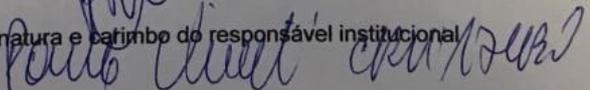
Eu, Dr. Paulo Viecili, Presidente substituto do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Vicente de Paulo de Cruz Alta, autorizo a mestranda Carla Gardani a realizar o estudo na Unidade de Oncologia da referida instituição com o título " A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS NTPDASES NO SORO DE PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE PRÓSTATA". Comprometendo-se a citar o serviço de oncologia deste nosocômio, tanto na dissertação como em futuras publicações.

Outrossim, obtive informações, por intermédio da aludida mestranda, acerca das características e objetivos da pesquisa, bem como das atividades que serão realizadas na instituição a qual represento.

Declaro ainda ter lido e concordado com o parecer ético emitido pelo CEP da instituição proponente, conhecendo e cumprindo as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12 e/ou CNS 510/16. Esta instituição está ciente de suas corresponsabilidades como instituição coparticipante do presente projeto de pesquisa e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Cruz Alta-RS, 19 de setembro de 2017.



Assinatura e carimbo do responsável institucional


6.3. Anexo D – Modelo do TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Estamos convidando o senhor a participar de um estudo chamado “A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS NTPDases NO SORO DE PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE PRÓSTATA”.

1. O objetivo desta pesquisa é avaliar a atividade das NTPDases presentes no sangue periférico de pacientes portadores de câncer de próstata como fator prognóstico e compará-lo com controles.
2. Caso participe da pesquisa, será necessário realizar UMA ÚNICA COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO (4ML) da veia do antebraço, para determinação desta enzima no sangue periférico. TAMBÉM SERÁ PREENCHIDO QUESTIONÁRIO COM OS DADOS CLÍNICOS DO PRONTUÁRIO MÉDICO.
3. Os riscos associados a coleta de sangue incluem: dor local, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio, infecção no local da punção podem ocorrer. Cuidados devem ser tomados para minimizar os riscos.
4. Os benefícios esperados com essa pesquisa serão a análise de fatores prognósticos/preditivos em relação ao câncer de próstata.
5. A sua participação neste estudo é voluntária e se o senhor não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e retirar o seu consentimento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma o seu atendimento, tratamento ou acompanhamento.
6. As informações relacionadas a este estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas. No entanto, se qualquer informação for divulgada garantimos que a identidade do senhor será preservada e mantida em segredo.
7. As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

8. Os materiais coletados do senhor serão utilizados exclusivamente para atender aos objetivos desta pesquisa e, caso haja sobra, serão devidamente eliminados ao final do estudo.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi tratou dos riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu fui informado que serei atendido sem custos para mim, caso eu apresente algum dos problemas relacionados no item 3.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós. Sendo assim, eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do participante da pesquisa)

Cruz Alta, _____ de _____ de 2017.

Também fui informado de que há interesse em se guardar o material biológico coletado para estudos futuros e entendi as razões para isso, de forma que:

() Autorizo a guarda do material.

() Não autorizo a guarda do material.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste indivíduo ou de seu representante legal para a participação neste estudo.

(Assinatura do Pesquisador)

Cruz Alta, _____ de _____ de 2017.

6.4. Anexo E –Modelo do questionário de coleta de dados

Questionário para coleta de dados:

• 1: SIM	
• 2: NÃO	
NOME: _____	
NÚMERO DO PRONTUÁRIO: _____	
IDADE NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO: _____	
DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____	
PROCEDÊNCIA: _____	CIRURGIA: (1) (2)
DATA DA CIRURGIA: ____/____/____	
RTU (1) (2)	PROSTATEC (1) (2)
BIOPSIA: _____	
AP: _____	
DATA ____/____/____	
IMUNO: _____	DATA: ____/____/____
ESTADIAMENTO CLINICO: T__N__M__G__	Gleason _____
EC _____	
PSA TOTAL _____	DATA ____/____/ PSA
LIVRE _____	DATA ____/____/
HORMONIOTERAPIA: (1) (2)	
RADIO: (1) (2) SESSÕES: _____	DATA: __/__/____
RECIDIVAS: (1) (2)	



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br