

Mariana de Oliveira Freitas

AÇÃO DO STRESSE OXIDATIVO E DO TABACO NO
DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO DO CANCRO DA
PRÓSTATA
IMPLICAÇÕES PROGNÓSTICAS E TERAPÊUTICAS

Universidade de Coimbra

2012

Mariana de Oliveira Freitas

AÇÃO DO STRESSE OXIDATIVO E DO TABACO NO
DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO DO CANCRO DA
PRÓSTATA
IMPLICAÇÕES PROGNÓSTICAS E TERAPÊUTICAS

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas submetida à Faculdade
de Medicina da Universidade de Coimbra

Orientadora: Professora Doutora Anabela Mota-Pinto

Coorientadora: Professora Doutora Ana Bela Sarmiento-Ribeiro

Agradecimentos

Manifesto a minha gratidão e o meu maior reconhecimento:

À Professora Doutora Anabela Mota-Pinto, pela confiança com que acolheu e proporcionou este projeto, pelos ensinamentos, orientação científica, apoio permanente, sem os quais não teria sido possível a concretização deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento-Ribeiro, pelo apoio na definição deste projeto, bem como pela orientação científica, revisão crítica, e confiança com que abraçou esta partilha, determinantes, para a realização deste projeto.

À Dra. Sofia do Vale Pereira, pela discussão científica, apoio, pela amizade e confiança que muito motivaram a realização desta dissertação.

À D. Leonor Salguinho, pelo apoio administrativo e amizade incondicionais.

A todos aqueles que durante o período de realização deste trabalho foram passando pelo Laboratório de Patologia Geral e que de forma direta ou indireta contribuíram para a sua realização.

Ao Professor Doutor Santos Rosa, Diretor do Laboratório de Imunologia, pela possibilidade de realização de parte deste trabalho.

À Dra. Vera Alves, pela disponibilidade, ensinamentos e amizade que muito valor acrescentaram a este projeto.

Ao Dr. Carlos Rabaça do Serviço de Urologia do Instituto Português de Oncologia do Centro, pela sua longa colaboração e dedicação que envolve a componente clínica, bem como todo o seu apoio para que este trabalho contasse com a parceria do IPO.

Ao Dr. Valido, Diretor do Serviço de Análises Clínicas do Instituto Português de Oncologia do Centro, pela sua colaboração e disponibilidade prestadas e a todos os elementos do IPO, que facilitaram direta ou indiretamente a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Arnaldo Figueiredo, do Serviço de Urologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra pela disponibilidade e apoio na colaboração, bem como aos restantes elementos deste Serviço que colaboraram.

À Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira, Presidente do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, pelo acolhimento imprescindível para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Paula Moreira, Dra. Cristina Carvalho e Dra. Sandra Cardoso pela colaboração, ensinamentos e disponibilidade nos estudos mitocondriais.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, Coordenador do Grupo de Oncologia Molecular - CI, IPOFG-EPE pelo interesse e apoio na colaboração deste projeto.

Ao Doutor Ricardo Ribeiro do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar pela discussão crítica e ensinamentos, apoio, colaboração e amizade.

Ao Dr. Avelino Fraga, Diretor do Serviço de Urologia do Hospital Militar do Porto, atualmente Diretor do Serviço de Urologia do Centro Hospitalar do Porto, ao Dr. Francisco Pina, Chefe de Serviço do Serviço de Urologia do Hospital S. João, Porto ao Dr. Jorge Oliveira, Diretor do Serviço de Urologia do IPOFG-EPE, À Dra. Cátia Monteiro, Investigadora do Grupo de Oncologia Molecular do IPOFG- EPE, pelas suas inestimáveis colaborações neste projeto.

Ao Professor Doutor Carlos Freire de Oliveira, Diretor do Centro de Investigação em Meio Ambiente Genética e Oncologia, CIMAGO, aquando da primeira fase de realização deste projeto, pelo apoio financeiro, acolhimento e estímulo, para a realização desta Dissertação.

À Professora Doutora Isabel Carreira, atualmente Diretora do CIMAGO e restantes elementos, pelo enriquecimento científico que me proporcionaram e partilha crítica fundamentais, para a valorização deste trabalho.

À Doutora Inês Baldeiras, à Dra. Teresa Proença, ao Dr. Rui Pascoal à Dra. Helena e restantes elementos do Laboratório de Neuroquímica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, pela colaboração, ensinamentos e rigor científico, amizade e boa disposição que tanto contribuíram para a realização deste projeto.

À Professora Doutora Henriqueta Silva e ao Dr. Luís Mesquita, pelo apoio e esclarecimentos científicos fundamentais à concretização dos estudos genéticos.

À Professora Doutora Lina Carvalho, Diretora do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e em especial à Dra. Teresa Silva e Dra. Maria Reis Silva, pelo apoio prestado e amizade.

Dedicatórias

Ao meu pai com infinita saudade...

Dia houve em que na madrugada se disfarçou de Corvo... voou ao sol... mergulhou no mar e prometeu-me o amanhecer...

Aos meus pais que forraram o chão que piso com pétalas de veludo suavizando assim a longa caminhada...

Ao António, que confiando, caminhou comigo de mãos dadas...

À Sara, que ao tecer o tempo da vida, compreenda que o significado de ir mais além... é afinal ir ao encontro de nós próprios...

O presente trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal (SFRH/BD/40215/2007) e o CIMAGO – (CIMAGO 14/05; CIMAGO 3/06)

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia do cancro da próstata	3
1.2 Fatores de risco para o desenvolvimento do cancro da próstata	6
1.3 Patogénese do cancro da próstata.....	12
1.3.1 Caraterísticas anátomo-patológicas	12
1.3.2 Ação do recetor do androgénio	14
1.4 Stresse oxidativo	17
1.4.1 Espécies reativas de oxigénio e lesão oxidativa de biomoléculas	17
1.4.2 Ação dos sistemas antioxidantes.....	23
1.5 O fumo do tabaco e o stresse oxidativo.....	31
1.6 Potencial ação cancerígena do fumo do tabaco.....	36
1.7 Carcinogénese da próstata.....	40
1.8 Associação entre hábitos tabágicos e a carcinogénese da próstata	45
1.9 Influência de polimorfismos genéticos em enzimas detoxificadoras	47
1.10 Resistência ao tratamento.....	50
1.11 Objetivos	51
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
2.1 Seleção de doentes e controlos.....	57
2.1.1 Isolamento de células sanguíneas	58
2.1.2 Análise quantitativa da concentração de hemoglobina.....	59
2.1.3 Extração e quantificação de vitamina A e E	60
2.1.4 Extração e quantificação da atividade de enzimas antioxidantes	63
2.1.5 Quantificação de glutatião reduzido	65
2.1.6 Quantificação de Glutathione-S-Transferase	66
2.1.7 Avaliação do estado de antioxição total.....	67
2.1.8 Avaliação do grau de lipoperoxidação.....	68

2.1.9	Avaliação da oxidação proteica	69
2.1.10	Quantificação dos níveis plasmáticos de colesterol.....	70
2.1.11	Avaliação de óxido nítrico	71
2.1.12	Quantificação dos níveis de ácido úrico plasmático	72
2.1.13	Análise genotípica das variantes polimórficas -634G > C do <i>VEGF</i>	73
2.2	Caraterização do modelo experimental de linhas celulares de cancro da próstata.....	76
2.2.1	Manutenção das culturas de linhas celulares	76
2.2.2	Incubação das linhas celulares com os compostos selecionados	78
2.2.3	Análise da morfologia celular.....	79
2.2.4	Estudos de proliferação e morte celular.....	79
2.2.5	Estudos de stresse oxidativo em linhas celulares.....	86
2.2.6	Análise da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial por espectrofotometria.....	91
2.2.7	Avaliação da expressão de HIF-1 α e VEGF.....	93
2.2.8	Tratamento estatístico	94
3.	RESULTADOS	95
3.1	Estudos em sangue periférico de doentes e controlos	97
3.1.1	Avaliação do stresse oxidativo em doentes com cancro da próstata –Influência na progressão da doença.....	97
3.1.2	Avaliação do efeito do tabaco no stresse oxidativo e na progressão do cancro da próstata	113
3.1.3	Avaliação do efeito dos hábitos alcoólicos no stresse oxidativo e na progressão do cancro da próstata	119
3.1.4	Relação de variantes polimórficas do fator de crescimento do endotélio dos vasos – VEGF e o stresse oxidativo	122
3.2	Estudos em linhas celulares	129
3.2.1	Avaliação da resistência ao stresse oxidativo em linhas celulares	129
3.2.2	Modulação do stresse oxidativo como estratégia terapêutica	142
3.2.3	Contribuição da função mitocondrial na progressão do cancro da próstata	157

3.2.4	Ação dos compostos presentes no fumo do tabaco nas células de cancro da próstata	160
4.	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	170
4.1	Estudos em sangue periférico de doentes e controlos	171
4.1.1	Avaliação do stresse oxidativo ao longo da progressão do cancro da próstata	171
4.1.2	Avaliação do efeito do tabaco no stresse oxidativo e progressão do cancro da próstata	178
4.1.3	Avaliação do efeito dos hábitos alcoólicos no stresse oxidativo e progressão do cancro da próstata	182
4.1.4	Relação de variantes polimórficas do fator de crescimento do endotélio vascular – VEGF e o stresse oxidativo no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata.....	184
4.2	Estudos em linhas celulares	188
4.2.1	Avaliação da resistência ao stresse oxidativo em linhas celulares	188
4.2.2	Ação do selenito de sódio em combinação com a terapêutica convencional	197
4.2.3	Contribuição da função mitocondrial na progressão do cancro da próstata	202
4.2.4	Ação de compostos presentes no fumo do tabaco nas linhas celulares	204
5.	CONCLUSÕES GERAIS.....	209
5.1	Estudo realizado em sangue periférico.....	211
5.2	Estudo realizado em linhas celulares	214
5.3	Conclusão geral e perspetivas futuras	217
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	221

Resumo

O stresse oxidativo, resultante do balanço entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e o sistema antioxidante, desempenha um papel determinante no desenvolvimento do cancro da próstata. Contudo, o seu papel na progressão da doença permanece por esclarecer.

As ROS são maioritariamente produzidas a nível mitocondrial e desempenham um papel fundamental na normal regulação da sinalização celular. No entanto, quando em excesso lesam biomoléculas, como o ADN, contribuindo para a instabilidade genómica, envolvida no processo de carcinogénese. Além disso, as ROS podem também resultar da exposição a fatores ambientais, como produtos de combustão orgânica, dos quais se destaca o fumo do tabaco constituído por uma mistura complexa de compostos. Destes, são de salientar o óxido nítrico (NO·) e os hidrocarbonetos poliaromáticos cíclicos (PAHs), considerados como fatores de risco para o desenvolvimento do cancro da próstata. No entanto, a relação entre o tabagismo e a carcinogénese da próstata permanece por elucidar. Por outro lado, as células de cancro da próstata possuem capacidade de adaptação a níveis elevados de ROS, através da ativação de sistemas antioxidantes, como o glutatião reduzido (GSH), condicionando a resposta à terapêutica. Desta forma, é de admitir que a modulação do stresse oxidativo envolvendo a diminuição de defesas antioxidantes possa constituir uma estratégia terapêutica.

O presente trabalho, teve como objetivo contribuir para uma melhor compreensão do stresse oxidativo e do efeito do tabaco no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata, avaliando a participação de diversas variáveis indutoras de stresse oxidativo incluindo o tabagismo, bem como, hábitos alcoólicos e índice de massa corporal (IMC) nos estudos *in vivo*, e ainda o efeito de peróxidos, compostos inibidores do sistema antioxidante e PAHS em linhas

celulares. Com este estudo espera-se também contribuir para a identificação de novos biomarcadores preditivos do prognóstico e de monitorização da doença. Pretendemos ainda avaliar de que forma a modulação do stresse oxidativo poderá constituir uma nova abordagem terapêutica ou coadjuvante da terapêutica para o tratamento de doentes com esta neoplasia. Além disso, queremos analisar a relação do stresse oxidativo com variantes polimórficas de alguns genes envolvidos na metastização, nomeadamente, do fator de crescimento do endotélio dos vasos (*VEGF*) e a progressão da doença.

O estudo foi realizado em sangue periférico de doentes com cancro da próstata e em indivíduos sem neoplasia, bem como em linhas celulares características dos vários estádios da doença. Os estudos de stresse oxidativo em sangue periférico incluíram a avaliação de defesas antioxidantes envolvidas no ciclo de oxidação/redução do glutatião, nomeadamente, a quantificação dos níveis de glutatião reduzido (GSH) e da atividade das enzimas peroxidase do glutatião (Gl-Px) e redutase do glutatião (Gl-Red), bem como a avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas glutathione-S-transferase (GST), e das não enzimáticas vitamina A (VIT A), vitamina E (VIT E) e ácido úrico (AU). Estes estudos também abrangeram a determinação do estado de antioxidação total (TAS), a análise da lesão oxidativa de proteínas através da quantificação de grupos carbonilo (GC) e da peroxidação lipídica (MDA) e, por fim, a determinação da produção de NO \cdot e de colesterol total (CHL).

A avaliação de GST, VIT A, VIT E, AU, CHL, GC e NO \cdot foi realizada em 85 indivíduos, dos quais 18 voluntários saudáveis e 67 portadores de cancro da próstata. Dos doentes participantes, 48 apresentavam adenocarcinoma da próstata localizado e 19 apresentavam doença avançada. Para os estudos de stresse oxidativo que incluíram a avaliação das defesas antioxidantes envolvidas no ciclo de oxidação/redução do glutatião bem como para a quantificação de TAS e

de MDA, aumentou-se o tamanho da amostra com a adição de 5 indivíduos sem neoplasia ou outra patologia prostática, 6 indivíduos portadores de hiperplasia benigna da próstata (BPH), 9 portadores de prostatite, 60 doentes com cancro dos quais, 56 com cancro da próstata localizado e 4 com doença em fase avançada.

Os estudos efetuados nos doentes com cancro da próstata avançado revelaram diminuição de VIT A e de GSH, TAS, atividade da Gl-Px e aumento de $\text{NO}\cdot$ sugerindo quer o envolvimento do stresse oxidativo na patogenia do cancro da próstata, em particular na progressão da doença, quer, a possível utilização destes parâmetros como biomarcadores moleculares preditivos do prognóstico e de monitorização do cancro da próstata.

Neste estudo observámos que a prostatite crónica e a BPH são patologias prostáticas associadas também a aumento de stresse oxidativo. Na prostatite crónica encontrámos diminuição significativa de GSH plasmática, enquanto na BPH, se observou aumento de MDA eritrocitário e diminuição significativa da atividade da Gl-Px.

Nos doentes com níveis mais elevados de PSA observou-se um aumento de $\text{NO}\cdot$. Este resultado corrobora as observações anteriores de que o $\text{NO}\cdot$ se encontra significativamente aumentado na doença avançada e reforça o seu potencial interesse como marcador molecular preditivo da agressividade e progressão do cancro da próstata. A elevação do conteúdo em $\text{NO}\cdot$ também parece estar associado ao valor de IMC nos doentes.

Nos doentes fumadores observou-se aumento de $\text{NO}\cdot$ e GC, diminuição da atividade da Gl-Px, de GST, de VIT E eritrocitária e de TAS sugerindo que os hábitos tabágicos se associam ao aumento de stresse oxidativo na população de doentes. O aumento de $\text{NO}\cdot$ nos doentes fumadores poderá contribuir para o agravamento do cancro da próstata.

Foi também avaliado o efeito dos hábitos alcoólicos no stresse oxidativo dos indivíduos em estudo. Observámos que uma ingestão diária de álcool superior a 60g nos indivíduos doentes se relacionou com um aumento da lesão oxidativa de proteínas e de lípidos. Assim, os nossos resultados sugerem que os hábitos tabágicos, alcoólicos e o aumento do IMC induzem aumento de stresse oxidativo, o qual poderá acentuar a progressão desta neoplasia.

A análise genotípica das variantes polimórficas 634G>C do *VEGF* não permitiu concluir sobre o risco de se desenvolver cancro da próstata nem sobre a suscetibilidade para desenvolver doença avançada. No entanto, os resultados sugerem que o haplótipo C e o genótipo CC poderão estar associados a menor stresse oxidativo traduzido por maior conteúdo em GSH, bem como tendência para maior conteúdo em TAS e menor conteúdo em MDA.

Os estudos *in vitro* foram realizados em três linhas celulares, uma isolada de epitélio prostático humano não neoplásico, as células RWPE1, e duas linhas celulares obtidas de células de cancro da próstata, nomeadamente, a linha celular HPV10, isolada de cancro localizado e a linha celular PC3, isolada de metástase óssea.

Os nossos resultados mostram que as linhas celulares de cancro da próstata, particularmente, as células de metástase (PC3) evidenciam uma maior produção intracelular de ROS (peróxidos e anião superóxido), bem como maior resistência a peróxidos (H_2O_2), acompanhados de aumento de defesas antioxidantes em particular de GSH e da atividade da Gl-Red. Estas células evidenciam ainda maior potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{mit}$), TAS e menor conteúdo em MDA. Além disso, apresentam maior quantidade de mitocôndrias, concordante com o elevado $\Delta\psi_{mit}$ e produção de ROS. Estes resultados sugerem a participação da mitocôndria e a resistência ao stresse oxidativo, na progressão e na agressividade da doença. As células de metástase apresentam ainda aumento da expressão do fator induzido de hipóxia (HIF) e do VEGF,

envolvidos na metastização. Na presença de PAHs observa-se aumento da expressão de HIF e VEGF, dos níveis de ROS, de proliferação celular, particularmente, nas células HPV10 (isoladas de cancro localizado) sugerindo a contribuição destes compostos, e por conseguinte do tabaco no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata.

A indução da redução da GSH e da atividade da Gl-Red revelou ressensibilização das células PC3 à citotoxicidade induzida por H₂O₂, com diminuição da proliferação celular e indução de morte, sugerindo a modulação do stresse oxidativo como estratégia terapêutica. Tendo em conta a utilização do docetaxel na quimioterapia do cancro da próstata e o mecanismo de atuação do selenito de sódio, no qual ocorre diminuição de GSH foi avaliada a associação destes dois fármacos. Os resultados evidenciaram um efeito anti-proliferativo sinérgico, com bloqueio do ciclo celular nas fases G2M e S e uma indução significativa de morte celular, em concordância com uma diminuição do $\Delta\psi_m$, nas células de metástase. A morte celular observada poderá em parte ser devida à indução de stresse oxidativo por diminuição de GSH. Pelo exposto, os resultados sugerem que a ação combinada de selenito de sódio e docetaxel, poderá constituir uma estratégia terapêutica no tratamento do cancro da próstata, mais eficaz do que o docetaxel isoladamente, podendo atuar como moduladores de stresse oxidativo. É ainda de esperar que em resultado do efeito sinérgico seja possível a utilização de concentrações mais reduzidas dos fármacos.

O presente estudo corrobora as teorias defensoras do envolvimento do stresse oxidativo no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata, através do aumento de ROS. Verificámos que este aumento parece favorecer a progressão da doença e pode ter origem endógena como a mitocondrial, ou exógena como a resultante de hábitos tabágicos ou alcoólicos, sugerindo a sua evicção.

Neste trabalho foi possível observar que as células tumorais são resistentes a níveis elevados de ROS e que esta adaptação pode ser contrariada pela inibição do sistema antioxidante. Assim, este estudo parece contribuir para uma melhor compreensão do envolvimento do stresse oxidativo na progressão desta doença, sugerindo a sua modulação como uma estratégia terapêutica coadjuvante da quimioterapia convencional do cancro da próstata.

Abstract

Oxidative stress which reflects the imbalance between reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant system, has been associated to prostate cancer development, however, its role on prostate cancer progression remains unclear. ROS are mainly produced by mitochondria and play a fundamental role in cell signaling regulation. However, an excess of ROS is harmful and associated to the oxidative lesion of biomolecules such as DNA, contributing to genomic instability, involved in carcinogenesis. Moreover, ROS also result from environment factors like pollutants derived from organic combustions, including the complex mixture of cigarette smoke. Its composition also includes nitric oxide (NO \cdot), or polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), considered as risk factors for prostate cancer development. Nevertheless, a correlation between cigarette smoking and prostate cancer remains elusive.

Prostate cancer cells may develop adaptation to an increase of ROS, in part, due to the antioxidant activation, including the reduced glutathione (GSH), contributing to therapy resistance. Likewise, we admit that oxidative stress modulation, involving antioxidant defenses depletion may represent a new prostate cancer therapeutic approach.

Therefore we are interested in a better understanding of the role of oxidative stress and cigarette smoking on prostate cancer development and progression by evaluating oxidative stress inducers as cigarette smoking, alcohol intake and body mass index (BMI) in *in vivo* studies and analyzing the effect of peroxides, antioxidant inhibitors compounds and PAHs, in cells studies. Furthermore, we expect to achieve new molecular markers, which may predict the prognosis. We also intend to evaluate if oxidative stress modulation may represent a new therapeutic approach in prostate cancer. Moreover we expect to evaluate the relation between oxidative stress and

genetic polymorphisms associated to cancer metastization, as the vascular endothelial growth factor (*VEGF*), in prostate cancer progression.

In order to achieve these goals, the work was performed in the peripheral blood of prostate cancer patients and controls, and in cell lines representing the different stages of prostate cancer progression. Oxidative stress studies performed in the peripheral blood included the determination of the antioxidant defenses involved in the glutathione redox cycle, namely, reduced glutathione (GSH), glutathione reductase (G1-Red) and peroxidase (G1-Px) activities, as the evaluation of the enzymatic antioxidant defenses glutathione-S-transferase (GST), non enzymatic defenses as vitamin A (VIT A), vitamin E (VIT E) and uric acid (AU). This study also included the determination of the total antioxidant status (TAS), oxidative lesion of proteins by carbonil group (GC), lipid peroxidation (MDA), NO \cdot production and total cholesterol (CHL).

The evaluation of GST, VIT A, VIT E, AU, CHL, GC e NO \cdot was performed in 85 individuals, namely 18 healthy controls and 67 patients with prostate cancer. Prostate cancer group was represented by 48 patients with localized cancer and 19 individuals with advanced disease.

Oxidative stress studies involving the evaluation of glutathione redox cycle antioxidants, TAS and MDA evaluation included 5 more individuals, those without prostate cancer or other prostatic disease, 6 more individuals with benign prostatic hyperplasia (BPH), 9 more individuals with prostatitis and 60 more prostate cancer patients, namely 56 with localized prostate cancer and 4 with advanced prostate cancer.

Patient studies indicated a decrease in VIT A, GSH and TAS levels, G1-Px activity and increase of NO \cdot , in the advanced prostate cancer patients, suggesting the role of oxidative stress in prostate cancer pathogenesis, namely, in prostate cancer progression. Therefore these results also

suggest a possible contribution of the oxidative stress parameters as molecular markers of prostate cancer prediction.

Here we show that prostatitis and BPH are prostatic pathologies associated with the increase of oxidative stress. In fact, we observed a reduction of plasmatic GSH levels in prostatitis and an increase of MDA and reduction of Gl-Px activity in BPH patients.

Prostate cancer patients with higher PSA levels showed increase in NO \cdot production, in agreement with an increase of NO \cdot during the advanced disease and reinforces its potential role as a molecular marker for prostate cancer prognosis prediction. The increase of NO \cdot is also associated to an increase of IMC in prostate cancer patients.

This study indicated an increase of oxidative stress in prostate cancer patient smokers, showing an increase of NO \cdot and GC, as a decrease of Gl-Px activity, GST, VIT E and TAS levels suggesting that cigarette smoking may contribute for prostate cancer progression, in part, due to an increase of oxidative stress. The increase of NO \cdot in smoker patients with prostate cancer suggests its relation with prostate cancer progression.

Alcohol intake also contributes for an increase of oxidative stress. In this study we observed higher protein and lipids oxidation in the prostate cancer patients, consuming above 60g of alcohol daily. Therefore the results suggest that cigarette smoking, alcohol intake and the increase of IMC induces an increase of oxidative stress which may contribute for prostate cancer progression.

Genetic studies involving *VEGF*-634G>C polymorphisms found no association with prostate cancer risk or advanced disease. However we found an eventual association between haplotype C and genotype CC with lower oxidative stress, characterized by an increase in GSH content, TAS and lower MDA.

In vitro studies comprised prostate cells derived from normal prostate epithelium (RWPE1), localized prostate cancer (HPV10) and from prostate cancer bone metastasis (PC3). Our results reveal an increase in ROS production (peroxides and superoxide anion) as higher resistance to peroxides (H_2O_2), in prostate cancer cells, particularly in the metastasis cells (PC3), accompanied by an increase in the GSH content and Gl-Red activity. These cells also show higher mitochondria membrane potential ($\Delta\psi_{mit}$), total antioxidant status (TAS) and lower MDA. Furthermore these cells show higher mitochondria number in agreement with the higher $\Delta\psi_{mit}$ and ROS production. PC3 cells also show higher hypoxia inducible factor (HIF) and VEGF expression, involved in cancer metastization. Therefore these results suggest mitochondria participation and oxidative stress resistance in prostate cancer progression and aggressiveness.

Moreover, in the presence of PAHs we observed an increase in HIF and VEGF expression, ROS levels, such as in the proliferation of three cell lines, particularly in the localized prostate cancer, HPV10 cells. Therefore these observations suggest an important role of PAHs, and secondly of cigarette smoking in prostate cancer progression.

The induction of GSH and Gl-Red activity reduction in PC3 cells was associated to H_2O_2 , cytotoxicity, concomitantly, with a decrease in cell proliferation and increase in cell death, suggesting the oxidative stress modulation as a new therapeutic approach. Considering the use of docetaxel on prostate cancer chemotherapy and the role of sodium selenite of inducing GSH reduction, we evaluated the combined effect of both compounds on the metastatic prostate cancer cells, PC3. Results indicated a synergistic anti-proliferative effect, accompanied by a cell cycle arrest on G2M and S phases and a significant induction of cell death, according with a decrease of $\Delta\psi_{mit}$. The observed cell death may be related with an increase of the oxidative stress resulting from GSH reduction, suggesting that the combined effect of both compounds may be important

as a new therapeutic approach in prostate cancer, being more efficient than docetaxel alone and acting, in part, as oxidative stress modulators. Furthermore is reasonable to admit that synergistic effect allows the utilization of lower compounds concentrations, minimizing side effects.

This study corroborates the principle of oxidative stress involvement in prostate cancer development and progression through an increase of ROS. Here we observed that the increase of ROS may result from endogenous sources as from mitochondrial activity, or from exogenous sources as cigarette smoking and alcohol intake, therefore suggesting its eviction. We also observed that cancer cells are resistant to higher ROS levels and this adaptation may be counteracted by antioxidant system inactivation. Therefore this study contributes to a better understanding of oxidative stress involvement, in prostate cancer progression, indicating its possible modulation as a new therapeutic approach in prostate cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN, ácido desoxirribonucleico

ADNmt, ácido desoxirribonucleico mitocondrial

AKT, proteína cinase B

AR, recetor do androgénio (*androgen receptor*)

AREs, *androgen-responsive elements*

AU, ácido úrico

BAD, *BCL2-associated death promoter*

BAK, proteína *BCL2 homologous antagonist/killer*

BAX, proteína *BCL2-associated X protein*

BCL2, proteína *B-cell lymphoma 2*

BPE, extrato de pituitária bovino

BPH, hiperplasia benigna da próstata (*benign prostate hyperplasia*)

C, citosina

CAG, glutamina

CaP, cancro da próstata

CHL, colesterol total

CoA, coenzima A

Cu,Zn-SOD, SOD de cobre e zinco (citosólica)

DCF, diclorofluoresceína

DCFH, 2',7'- diclorodihidrofluoresceína

DCFH-DA, 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato

DEM, dietilmaleato

DHE, dihidroetídeo

DHT, a 5 α -di-hidrotestosterona

DMSO, dimetilsulfoxido

DTNB, 5,5'-ditio-2-ácido nitrobenzóico

EC-SOD, SOD extracelular

EDTA, *ethylenediamine tetraacetic acid*

EGF, fator de crescimento epidermal

EGFr, fator de crescimento epidermal recombinante

FBS, soro fetal bovino

FGF, fator de crescimento dos fibroblastos

FOXO, fatores de transcrição *forkhead*

G, Guanina

GC, grupos carbonilo

Gl-Px, peroxidase do glutatião

Gl-Red, redutase do glutatião

GSH, glutatião (forma reduzida)

GSK-3h, proteína *glycogen synthase kinase 3h*

GSSG, glutatião (forma oxidada)

GST, glutathiona-S-transferase

H₂O₂, peróxido de hidrogénio

Hb, hemoglobina

HIF, fator induzido de hipóxia

HPLC, cromatografia líquida de alta pressão

HSP, proteínas de choque térmico.

IC25, concentração para a qual se observa 25% de inibição da proliferação celular

IC50, concentração para a qual se observa 50% de inibição da proliferação celular

IGF, fator de crescimento do tipo insulina

IL-1, interleucina 1

IL-6, interleucina 6

IMC, índice de massa corporal

JC1, 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol carbocianina iodada

MAPK, *mitogen-activated protein kinase*

MDA, malonilaldeído

MIF, média de intensidade de fluorescência

MMP, metaloproteinase

Mn-SOD, SOD de manganésio (mitocondrial)

mTORC-2, complexo 2 de proteínas *mTOR*

MTT, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico)

NADPH, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NAT1, N-acetil transferase

NO, óxido nítrico

Nox, NADPH oxidase transmembranar

O₂⁻, anião superóxido

ONOO⁻, peroxinitrito

PAHs, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Pb, pares de base

PBS, tampão fosfato salino

PIA, atrofia inflamatória proliferativa

PIN, neoplasia intraepitelial prostática

PIP3, fosfo-inositol-trifosfato 3

Prx, peroxiredoxina

PSA, antígeno específico da próstata

PTEN, *phosphatase and tensin homolog*

PYK2, *proline-rich tyrosine*

RFLP-PCR, *restriction fragment length polymorphism – polymerase chain reaction*

ROO·, radical peróxido

ROS, espécies reativas de oxigênio

SNP, *single nucleotide polymorphisms*

SOD, superóxido dismutase

T, testosterona

TAS, estado de antioxidação total

TGF- β , fator de crescimento transformador beta

TNF- α , fator de necrose tumoral alfa

TRAIL, *TNF related apoptosis inducing ligand*

Trx, tioredoxina

Trxr, redutase da tioredoxina

UMA, unidades maço/ano

VEGF, fator de crescimento endotelial vascular

VEGF, gene do fator de crescimento endotelial vascular

VIT A, vitamina A

VIT E, vitamina E

$\cdot\text{OH}$, radical hidroxilo

$\Delta\psi_{\text{mit}}$, potencial de membrana mitocondrial

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do cancro da próstata

O cancro da próstata constitui uma doença de elevada prevalência e mortalidade nos países ocidentais, também descritos como desenvolvidos ou industrializados. Trata-se da neoplasia maligna sólida de maior incidência, no sexo masculino, estimando-se que um em cada seis indivíduos desenvolva cancro da próstata invasivo ao longo da sua vida (Jemal *et al.*, 2010; Jemal *et al.*, 2011; Siegel *et al.*, 2012). Por outro lado, apresenta-se como a segunda causa de morte por cancro nos Estados Unidos da América (EUA) (Jemal *et al.*, 2010; Jemal *et al.*, 2011; Siegel *et al.*, 2012) e a terceira na Europa (Malvezzi *et al.*, 2012). De acordo com Siegel e colaboradores (2012), no presente ano serão atingidos cerca de 241 740 novos casos de cancro da próstata, nos EUA, o que corresponde a 29% de todos os novos casos de cancro. Estes autores previram a ocorrência de 28 170 óbitos em 2012, devido a esta doença, correspondendo a 9% da mortalidade por cancro. A mesma percentagem foi encontrada para o cancro do cólon e reto, no entanto, a sua contribuição em números absolutos é inferior, correspondendo a 26 470 óbitos. Segundo o estudo, apenas o cancro do pulmão e brônquios ultrapassa este valor, contribuindo com 29% da mortalidade por cancro, o que corresponde a 87 750 casos para o ano de 2012 (Figura 1.1).

Apesar da preocupação que merecem os valores supracitados, a mortalidade associada ao cancro da próstata tem vindo a diminuir desde 1992 (Figura 1.2) (Bosetti *et al.*, 2011; Jemal *et al.*, 2009; Jemal *et al.*, 2010; Siegel *et al.*, 2012; Eheman *et al.*, 2012). Segundo Bosetti e colaboradores (2011), esta evolução, poderá ser uma consequência do diagnóstico precoce, particularmente, do doseamento sérico do antígeno específico da próstata (PSA) e do toque retal, contribuindo assim para o tratamento atempado do cancro.

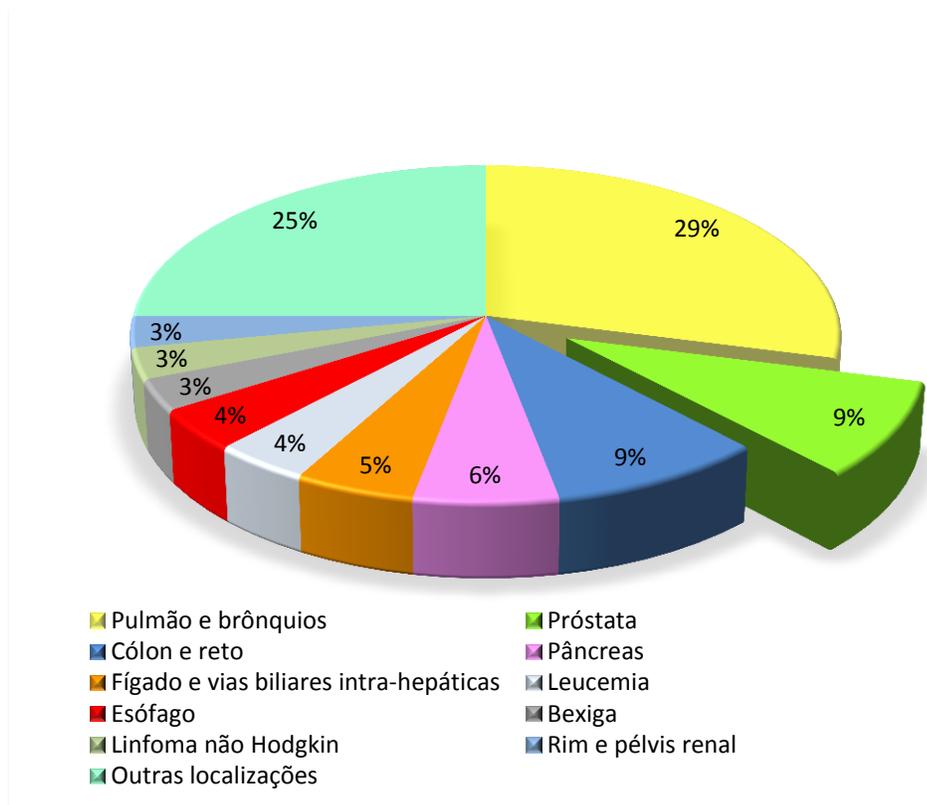


Figura 1.1 - Mortalidade por cancro estimada para 2012 para o sexo masculino nos EUA. Adaptado de Siegel e colaboradores (2012).

No entanto, para o intervalo de tempo decorrido entre 1982 e 1992, estes autores demonstraram um acentuado aumento na taxa de incidência. Este facto, poderá estar relacionado com uma maior deteção de casos diagnosticados, em resultado de uma melhoria dos métodos de diagnóstico.

A incidência do cancro da próstata também varia, de forma distinta, entre as diversas etnias. Em particular, a população afro-americana, surge como a mais atingida, contrastando com as populações asiáticas. Porém, quando os indivíduos desta última população emigram para os países ocidentais, adotando o respetivo estilo de vida, a incidência de cancro da próstata aumenta consideravelmente, sugerindo a influência de fatores genéticos articulados com a ação do meio

ambiente (Haenszel *et al.*, 1968; Shimizu *et al.*, 1991; Whittemore *et al.*, 1995; Hsing *et al.*, 2000; Jemal *et al.*, 2009; Jemal *et al.*, 2010; Siegel *et al.*, 2012).

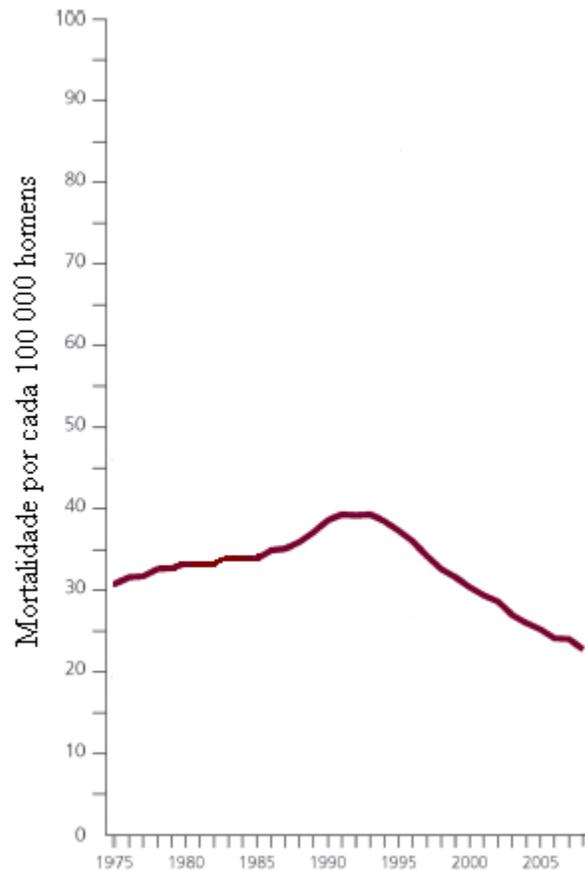


Figura 1.2 - Evolução da taxa de mortalidade por cancro da próstata. Está representada a taxa de mortalidade por cada 100 000 habitantes do sexo masculino, nos EUA, ao longo do tempo (1975 a 2008). Adaptado de Siegel e colaboradores (2012).

Por outro lado, o desenvolvimento do cancro da próstata encontra-se fortemente associado ao envelhecimento. Cerca de 81% destes doentes encontra-se numa faixa etária acima dos 65 anos (Bracarda *et al.*, 2005). Em contrapartida, a incidência de cancro da próstata é rara abaixo dos 40 anos de idade, ocorrendo com uma frequência de 1 por cada 100 000 indivíduos (Bostwick *et al.*, 2004).

1.2 Fatores de risco para o desenvolvimento do cancro da próstata

O cancro da próstata é uma doença multifatorial resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais. De acordo com Platz e Giovannucci (2006), apenas o envelhecimento, os antecedentes familiares e a etnia afro-americana constituem fatores de risco devidamente estabelecidos para o desenvolvimento desta neoplasia. Nomeadamente, o risco é maior em indivíduos que possuem um familiar em primeiro grau afetado pela doença, comparativamente aos que apresentam um familiar distante (Steinberg *et al.*, 1990).

Porém, inúmeros estudos sugerem ainda outros fatores de risco, como a exposição a androgénios, a inflamação recorrente, o estilo de vida, a dieta alimentar, a exposição a carcinogénios como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e as aminas aromáticas heterocíclicas. É de referir, que em parte, os fatores de risco citados se encontram associados a um aumento de stress oxidativo (Cerhan *et al.*, 1999; Hickey *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2003) (Figura 1.3), por sua vez resultante do excesso de espécies reativas de oxigénio (ROS) e ou, da diminuição das defesas antioxidantes (Sies, 1985). Por seu lado, as ROS possuem capacidade de lesar biomoléculas como o ADN, contribuindo para o aparecimento de mutações e instabilidade genómica, envolvidas na carcinogénese (Willis e Wians, 2003).

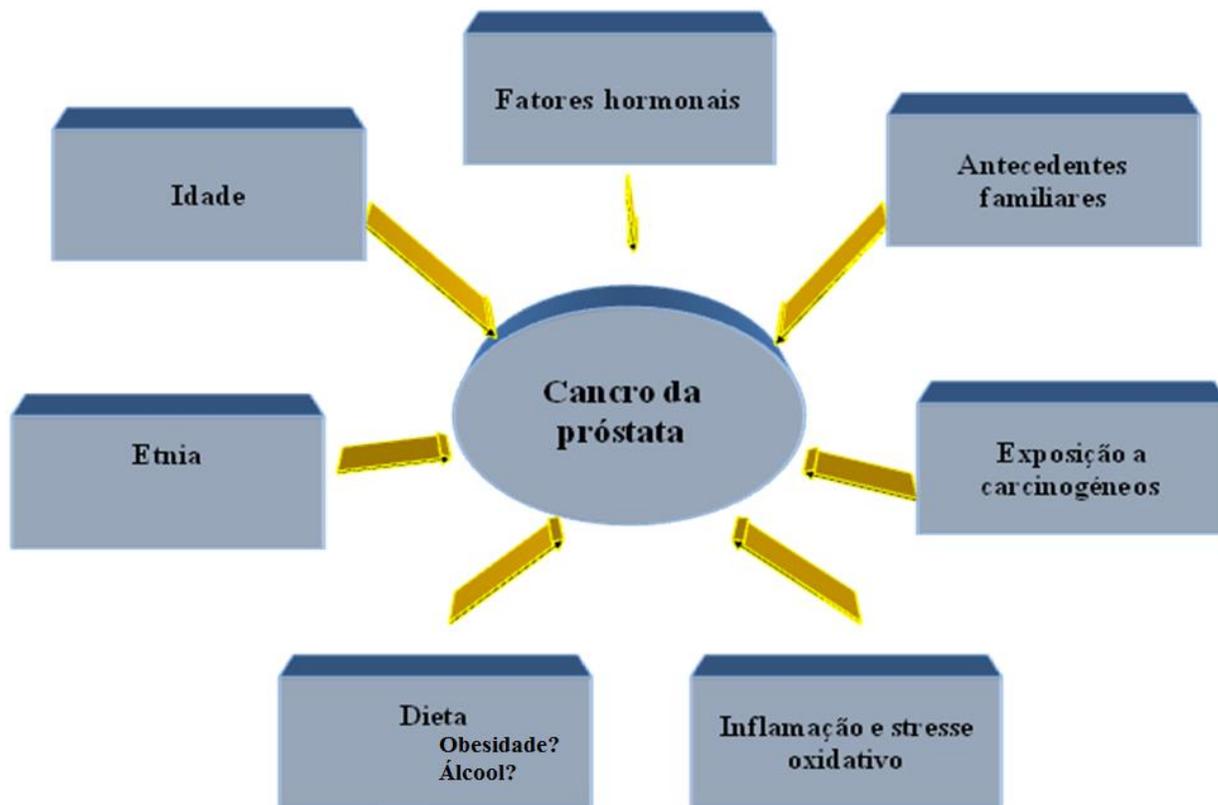


Figura 1.3 - Fatores de risco para o desenvolvimento do cancro da próstata.

Como referido, a incidência e a mortalidade por cancro da próstata são mais elevadas nos países ocidentais, sobretudo nos americanos de origem africana (afro-americanos) (Hsing *et al.*, 2000). Entre os diversos fatores que poderão tornar esta população mais suscetível, destacam-se os polimorfismos genéticos relacionados com repetições de glutamina (CAG) no gene do recetor do androgénio (AR) (Edwards *et al.*, 1999). Estudos funcionais, sugerem que um pequeno número destas repetições, como ocorre frequentemente nos afro-americanos, estão associadas a um aumento da atividade transcricional do recetor, podendo favorecer a proliferação celular. Por oposição, os asiáticos que apresentam menor risco de desenvolver a doença tendem a apresentar maior número de repetições CAG (Irvine *et al.*, 2000; Beilin *et al.*, 2000).

Apesar de a incidência ser menor nos países asiáticos, o risco de desenvolver cancro da próstata aumenta cerca de 5 vezes nos japoneses que emigram para os EUA (Whittemore *et al.*, 1995; Jemal *et al.*, 2009; Jemal *et al.*, 2010; Siegel *et al.*, 2012). Este facto parece estar relacionado em grande parte com a mudança de hábitos de vida, particularmente, na adoção da dieta ocidental, caracterizada pela ingestão abusiva de álcool, gorduras animais e carnes vermelhas, e diminuição do consumo de fruta e vegetais. Na realidade, a ingestão aumentada de gordura total, de origem animal, e de carnes vermelhas, encontra-se associada a um risco acrescido de cancro da próstata, enquanto o consumo de vegetais parece ter um efeito preventivo (Giovannucci *et al.*, 1993; Gann *et al.*, 1994). Em contrapartida, a baixa incidência deste tipo de cancro, nos asiáticos, poderá estar relacionada com uma dieta rica em vegetais e com a prática generalizada da toma de chá verde. A presença do polifenol epigalo- β -catequina-3-galato, neste chá, confere-lhe uma ação antioxidante com efeito demonstrado na quimioprevenção do cancro da próstata (Bettuzzi *et al.*, 2006). A sua ação protetora poderá estar também relacionada com a regulação epigenética, nomeadamente com a capacidade de inibir ADN-metil-transferases, contribuindo para a hipometilação de ADN (Lyko e Brown, 2005; Gerhäuser, 2012). Uma vez que nas neoplasias ocorre frequentemente hipermetilação de regiões reguladoras ou promotoras de genes supressores tumorais, com conseqüente silenciamento destes, o efeito hipometilante do composto epigalo- β -catequina-3-galato poderá contribuir para a expressão de genes supressores tumorais. A ingestão regular deste composto bem como de outros presentes nos alimentos ou a sua administração como suplemento, nomeadamente, das vitaminas A, E, C, D, do licopeno e do selénio, associados a uma dieta pobre em gorduras, apresentam segundo alguns autores um efeito antioxidante eficaz na prevenção do cancro da próstata (Ansari *et al.*, 2002; Bettuzzi *et al.*, 2006). Por exemplo, o consumo de tomate encontra-se associado ao aumento dos níveis séricos

de licopeno, o principal antioxidante deste alimento. Além disso, o consumo de vegetais poderá estar relacionado com um aumento de sulfurano, implicado na ativação de enzimas detoxificantes (Gann *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 2000).

Contrariamente, o consumo de álcool, a ingestão de carnes vermelhas e uma dieta calórica encontram-se associados ao aumento de ROS (Dupont *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2003). A confeção da carne a temperaturas muito elevadas, como ocorre nos assados e nos grelhados, pode induzir a carbonização dos compostos aí presentes originando a formação de aminas aromáticas heterocíclicas e PAHs, por sua vez, associados ao desenvolvimento de cancro da próstata (Nelson *et al.*, 2003). Estas substâncias são carcinogéneas e encontram-se amplamente distribuídas pelo meio ambiente, em resultado da combustão de compostos orgânicos. Segundo Krstev e colaboradores (1998), as profissões associadas a um maior risco de cancro da próstata caracterizam-se por uma exposição ocupacional a estes compostos. Os PAHs estão presentes também no fumo, como o do tabaco. Porém, o efeito dos hábitos tabágicos no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata permanece por esclarecer (Lijinsky *et al.*, 1964; Nelson *et al.*, 2003; Counts *et al.*, 2005).

Para além dos hábitos tabágicos, outros comportamentos, como os hábitos alcoólicos têm sido amplamente estudados na sua relação com o desenvolvimento do cancro da próstata. Os hábitos alcoólicos são reconhecidos como fatores indutores de stresse oxidativo. Um estudo realizado em alcoólicos crónicos revelou aumento de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, e diminuição de vitamina E no sangue destes indivíduos (Dupont *et al.*, 2000). Apesar do seu efeito oxidante, Platz e colaboradores (2004) referiram que um consumo moderado ou elevado de álcool não se traduz num fator de risco de cancro da próstata, a não ser em homens que ingeram grandes quantidades e de forma irregular.

Uma dieta calórica associada a um estilo de vida marcado pelo sedentarismo pode refletir-se num quadro de obesidade. Este associa-se a níveis aumentados de leptina, hormona produzida principalmente pelos adipócitos, com efeito sobre o controlo do apetite (Longo e Fontana, 2010). A elevada circulação e resistência à leptina em obesos desencadeia a libertação de interleucinas como a IL-1 e a IL-6 (Hursting e Berger, 2010; Padidar *et al.*, 2011), as quais promovem a formação de ROS (Tanno e Matsui, 2011). O tecido adiposo também liberta angiotensina-2 que estimula a atividade da enzima *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxidase, e citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e as já referidas interleucinas IL-1 e IL-6, reforçando a formação de ROS. A obesidade está também associada a diminuição de enzimas antioxidantes enzimáticas como a superóxido dismutase (SOD), a peroxidase do glutationa (Gl-Px) e a catalase (Fernández-Sánchez *et al.*, 2011).

Em contrapartida, o exercício físico reduz a gordura corporal favorecendo a diminuição de adipocitocinas envolvidas no processo inflamatório, como o fator de crescimento tipo insulina (IGF) (Friedenreich e Orenstein, 2002) e estimula a síntese de enzimas antioxidantes como a Gl-Px ou a SOD (Durackova, 2010).

Existem cada vez mais evidências de que a obesidade se relaciona com o desenvolvimento e progressão do cancro da próstata, bem como a formas mais agressivas desta doença (Freedland *et al.*, 2009; Capitanio *et al.*, 2012; van Kruijsdijk *et al.*, 2009).

Sabe-se atualmente que o comportamento das células cancerígenas depende do microambiente que as envolve, condicionando, desta forma, a progressão para a metastização ou para a indolência do tumor (Cheng *et al.*, 1999). Neste sentido, tem sido reconhecida a participação do tecido adiposo periprostatico na modulação da agressividade do cancro da próstata, nomeadamente, em resultado do aumento da produção de citocinas pelos adipócitos como a IL-6

(Valastyan e Weinberg, 2009). Um estudo recente desenvolvido por van Roermund e colaboradores (2011) associa o aumento da espessura do tecido adiposo periprostático a maior agressividade do cancro da próstata.

Muito embora a inflamação seja uma resposta biológica e fisiológica dos tecidos vivos à agressão (Mota-Pinto, 2007), a inflamação prostática crónica ou recorrente, ou seja a “má inflamação”, constitui outro fator de risco para o desenvolvimento desta neoplasia (Nelson *et al.*, 2003).

Durante o processo inflamatório os leucócitos, em particular os neutrófilos e os monócitos/macrófagos, na primeira linha de defesa contra a agressão, libertam citocinas como o TNF- α , IL-6, IL-1 β e o fator de crescimento transformador β (TGF- β), quimiocinas e outros mediadores inflamatórios. Os macrófagos e as citocinas ativam a NADPH oxidase, a qual catalisa a produção de ROS como o anião superóxido e peróxido de hidrogénio, necessários na defesa contra os agentes agressores (Ahmad *et al.*, 2009; Grek e Tew, 2010; Tanno e Matsui, 2011). Por outro lado, a inflamação crónica condiciona a ativação constante de citocinas e consequente aumento de radicais livres (Ahmad *et al.*, 2009).

O envelhecimento é um processo fisiológico próprio dos seres vivos, que durante muito tempo foi tido como um processo evolutivo inalterável. Atualmente considera-se que o envelhecimento resulta da interação de múltiplos fatores endógenos e exógenos que caracterizam a resposta biológica adaptativa e determinam individualmente o processo do envelhecimento (Resende-Oliveira *et al.*, 2010).

O processo de envelhecimento, também associado a um aumento de stresse oxidativo, constitui um fator de risco para o desenvolvimento desta doença, em particular acima dos 54 anos de idade (Khandrika *et al.*, 2009). A perda funcional, gradual e progressiva de estruturas e

moléculas é, em parte, devida à acumulação de mutações no ADN mitocondrial (ADNmt) (Seo *et al.*, 2010) e nuclear assim como a lesões nos lípidos e proteínas. Existem várias teorias que tentam explicar o papel do stresse oxidativo no envelhecimento a nível molecular e bioquímico. Nesta fase da vida há uma maior formação de ROS, em grande parte resultante de um conceito emergente, designado por *inflammaging* (uma combinação de inflamação e envelhecimento). Este conceito postula que o envelhecimento fisiológico e patológico pode ser influenciado por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF presentes em maior quantidade nos indivíduos idosos (Dröge e Schipper 2007; Franceschi *et al.*, 2007; Goto, 2008). Além disso, em consequência das mutações no ADN mitocondrial, ocorre disfunção mitocondrial e aumento de produção de ROS (Seo *et al.*, 2010). A acentuar o aumento de stresse oxidativo existe diminuição de defesas antioxidantes nomeadamente, do glutatião reduzido (GSH) e das enzimas SOD, catalase e Gl-Px. Na prática, a acumulação de mutações somáticas a nível do ADN mitocondrial e o aumento do stresse oxidativo ao longo do tempo poderão contribuir para o desenvolvimento de neoplasias (Khandrika *et al.*, 2009).

1.3 Patogénese do cancro da próstata

1.3.1 Caraterísticas anátomo-patológicas

A próstata é a maior das glândulas acessórias do aparelho reprodutor masculino (Gonçalves e Bairos, 2007). O parênquima da próstata é constituído por 30 a 50 glândulas túbulo alveolares

ramificadas que drenam separadamente no lúmen da uretra prostática e que se dispõem concentricamente em torno desta (Gonçalves e Bairos, 2007). Sob o ponto de vista histológico, a glândula prostática pode dividir-se em três regiões principais – periférica, central e de transição (Figura 1.4). No que diz respeito à sua localização, cerca de 70% dos casos de cancro da próstata têm início na zona periférica, aproximadamente 24% têm origem na zona de transição e o restante na zona central (McNeal, 2003; Nelson *et al.*, 2003).

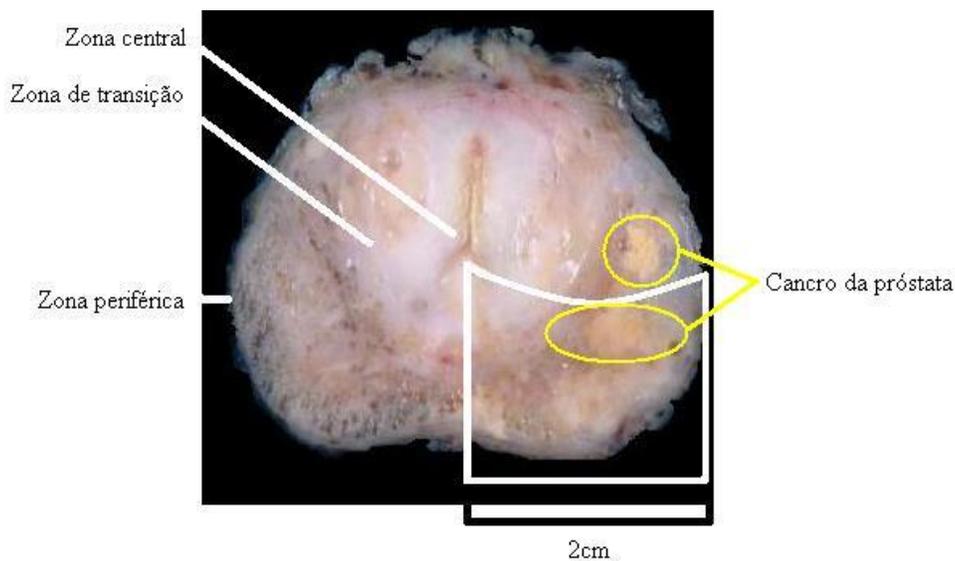


Figura 1.4 - Imagem de próstata. Próstata obtida por prostatectomia radical. Estão representadas as diferentes regiões histológicas da próstata – zonas periférica, central e de transição. A imagem ilustra alguns focos de cancro da próstata delimitados a amarelo. Adaptado de Nelson e colaboradores (2003).

Esta neoplasia apresenta-se predominantemente na forma de adenocarcinoma (95%), o qual por definição tem origem no tecido glandular (Bostwick *et al.*, 2004). Sob o ponto de vista histológico a maioria é multifocal e heterogénea (Gleason, 1992). O grau de diferenciação condiciona a agressividade do tumor e é obtido em função da classificação de Gleason. Nesta, encontra-se estabelecida uma escala que varia de 1 a 5, estando o 5 associado a uma maior indiferenciação e provavelmente pior prognóstico. A classificação final (*score* de Gleason), é

obtida, pela soma dos dois graus histológicos mais frequentes na neoplasia em causa (Gleason, 1966), atingindo um máximo de 10.

Assim, os tumores com *scores* de Gleason de 2 (1+1) até 6 (3+3) são considerados “bem diferenciados” e relacionam-se geralmente com um melhor prognóstico. A um *score* de Gleason mais elevado corresponde uma maior probabilidade do tumor se comportar de uma forma localmente agressiva e/ou de metastizar mais precocemente (Gleason e Mellinger, 1974; Nelson *et al.*, 2003; Pierorazio *et al.*, 2012).

1.3.2 Ação do recetor do androgénio

A normal diferenciação e maturação sexual masculina, bem como a espermatogénese e o desenvolvimento e manutenção da glândula prostática, incluindo a ação das células glandulares epiteliais, dependem dos androgénios. Estes incluem a testosterona (T) e a sua forma convertida no metabolito mais ativo, a 5 α -di-hidrotestosterona (DHT), sendo o processo mediado pela enzima 5 α -redutase. A ação androgénica requer a ligação destas hormonas ao recetor do androgénio (AR). O recetor desempenha um papel fundamental durante o desenvolvimento do cancro da próstata, bem como durante a sua progressão, quer a hormono-dependente quer a hormono-independente (Heinlein e Chang, 2004; Rahman *et al.*, 2004).

No citoplasma da célula, o AR, encontra-se associado a *chaperons* como as proteínas de choque térmico (HSP). A ligação do AR às hormonas T e DHT inicia a ativação transcricional deste recetor. Ocorre alteração conformacional do mesmo com libertação das HSPs seguindo-se a fosforilação do AR e translocação do novo complexo para o núcleo. Os AR ligam-se então às

regiões promotoras da transcrição dos genes alvo (AREs - *androgen-responsive elements*), a fim de regular a transcrição de genes envolvidos na proliferação e apoptose (Koochekpour, 2010).

A ativação transcricional do AR é regulada pela interação do recetor com os seus co-reguladores designadamente, ARAs e pela fosforilação de ambos. Fatores de crescimento como do tipo insulina (IGF1), transformante beta (TGF- β) e a interleucina IL-6 estimulam cascatas de sinalização envolvendo participação da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), proteínas das famílias Sma e Mad (SMAD), proteína cinase B (AKT) e *proline-rich tyrosine kinase* (PYK2) (Figura 1.5) (Heinlein e Chang, 2004; Rahman *et al.*, 2004; Koochekpour, 2010). No início do seu desenvolvimento, o cancro da próstata é dependente dos androgénios em cerca de 80 a 90% dos casos. Tendo em conta este conceito, a terapêutica é em grande parte baseada na ablação ou privação dos androgénios e na inibição do AR (Denis e Griffiths, 2000). No entanto, as células neoplásicas poderão adaptar-se a concentrações reduzidas de androgénios, resultando na expansão clonal e progressão do tumor e, desta forma evoluir para uma fase hormono-independente ou hormono-refratária (Isaacs e Isaacs, 2004).

Alguns estudos sugerem que alterações genéticas e funcionais do AR podem influenciar o crescimento celular descontrolado e a resistência à apoptose em doentes com cancro da próstata, contribuindo para a resistência à terapêutica (Koivisto *et al.*, 1997; Giovannucci *et al.*, 1997; Paule, 2005). Dos mecanismos sugeridos para explicar a capacidade de sobrevivência das células cancerígenas, a condições de privação androgénica, poderão citar-se a amplificação do AR, tornando-o sensível a reduzidas concentrações de androgénios (Koivisto *et al.*, 1997) e o aparecimento de mutações no gene do AR, interferindo na sua relação de especificidade ao ligando. Nesta situação o AR pode tornar-se sensível à ativação por outros esteroides, que não os androgénios, como é o caso dos estrogénios (Culig *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1997). Ainda, é

possível que as células mantenham a proliferação celular por vias intracelulares independentes daquelas que envolvem os androgénios (Craft *et al.*, 1999; Sadar *et al.*, 2000).

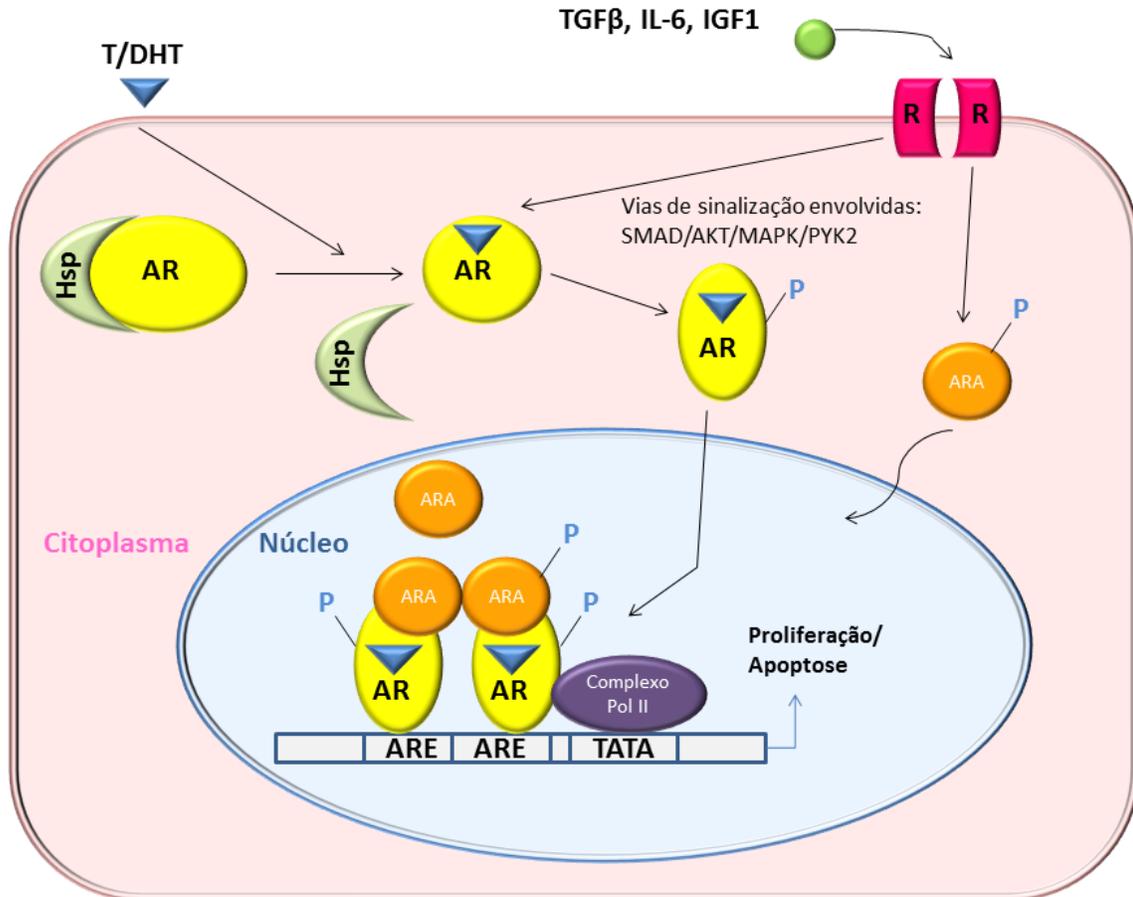


Figura 1.5 - Esquema representativo da ação do recetor do androgénio. O recetor do androgénio (AR) encontra-se associado a chaperons como as proteínas de choque térmico (HSP) no citoplasma celular. A testosterona (T) e di-hidrotestosterona (DHT) ligam-se ao AR libertando as HSPs e promovem a associação do AR aos seus co-reguladores (ARAs). O AR sofre translocação para o núcleo, ligando-se às regiões promotoras da transcrição dos genes alvo (AREs - androgen-responsive elements), a fim de regular os genes envolvidos na proliferação e apoptose. A ativação do AR e dos ARAs é mediada por fosforilação com a participação do fator de crescimento como do tipo insulina (IGF1), do fator de crescimento transformante beta (TGF-β) e da interleucina IL-6 os quais estimulam cascatas de sinalização envolvendo participação da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), proteínas da famílias Sma e Mad (SMAD), proteína cinase B (AKT) e *proline-rich tyrosine kinase* (PYK2). A ativação transcricional do AR é regulada pela interação do recetor com os seus co-reguladores designadamente, ARAs e pela fosforilação de ambos. Adaptado de Heinlein e Chang (2004).

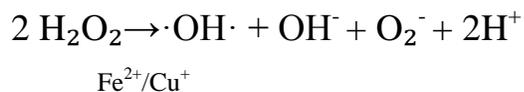
1.4 Stresse oxidativo

1.4.1 Espécies reativas de oxigénio e lesão oxidativa de biomoléculas

O stresse oxidativo resultante do balanço entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes (Sies, 1985), é atualmente encarado como uma perturbação da sinalização e do controlo do estado oxidação/redução (Jones, 2006). Neste contexto tem sido implicado na patogenia de diversas doenças humanas, nomeadamente, no carcinoma da próstata (Willis e Wians, 2003; Miyake *et al.*, 2004). Níveis elevados de ROS possuem a capacidade de induzir lesão oxidativa de biomoléculas como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, nomeadamente, o desoxirribonucleico (ADN). Desta forma, contribuem para a desregulação de várias vias de transdução de sinal, envolvidas na sobrevivência, proliferação, ciclo celular e morte celular. Mais ainda, a lesão oxidativa de ADN pode estar na base de mutações genéticas, associadas ao desenvolvimento e progressão do cancro (Willis e Wians, 2003).

As ROS compreendem espécies radicalares de oxigénio, instáveis e muito reativas, que contêm pelo menos um eletrão não emparelhado. Assim, são capazes de captar eletrões de moléculas vizinhas para completar a sua orbital (Sies, 1985). Sob o ponto de vista biológico, os radicais mais importantes são o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxilo ($\cdot OH$) e o peróxilo ($ROO\cdot$) (Sikka *et al.*, 2003). As ROS incluem outras moléculas para além dos radicais, que facilmente se convertem nestes, como é o caso do peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Desta forma, na presença de metais pesados como o ferro ou cobre, o H_2O_2 é convertido no radical $\cdot OH$ de acordo com a reação de Fenton e Haber Weiss (Figura 1.6) (Sies, 1985; Koedrith e Seo, 2011).

(A)



(B)

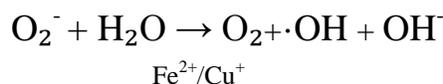
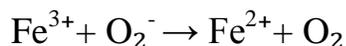


Figura 1.6 - Reação de Fenton (A) e de Haber-Weiss (B).

Outras espécies reativas com importância biológica são os hidroperóxidos lipídicos, o óxido nítrico, o dióxido de azoto, o peroxinitrito (ONOO^-) e o oxigénio singlete (Halliwell, 1987; Spector, 2000). A figura 1.7 resume a formação de ROS a partir do oxigénio molecular.

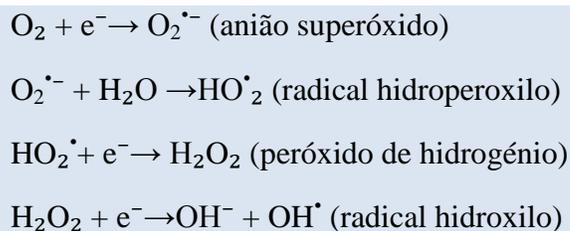


Figura 1.7 - Formação de ROS a partir do oxigénio molecular. Adaptado de Klaunig e colaboradores (2010).

As ROS são geradas *in vivo* em resultado de diferentes processos celulares, sendo a respiração mitocondrial, o fenómeno maioritariamente responsável pela produção destas espécies (Freeman *et al.*, 1986). Durante a respiração aeróbica formam-se ROS, sobretudo ao nível dos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial. Do oxigénio consumido cerca de 3 a 5% não é completamente reduzido, originando o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) facilmente convertido em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) por ação da enzima SOD (Grek e Tew, 2010), de acordo como o processo ilustrado na figura 1.8.

A produção endógena de ROS também pode ocorrer nos peroxissomas ou mesmo em resultado da ação dos androgénios (Mehraein-Ghomi *et al.*, 2008) e do processo inflamatório devido à ação de macrófagos (Ahmad *et al.*, 2009) e da libertação de citocinas que ativam a NADPH oxidase, a qual catalisa a produção de ROS como o anião superóxido e peróxido de hidrogénio (Tanno e Matsui, 2011).

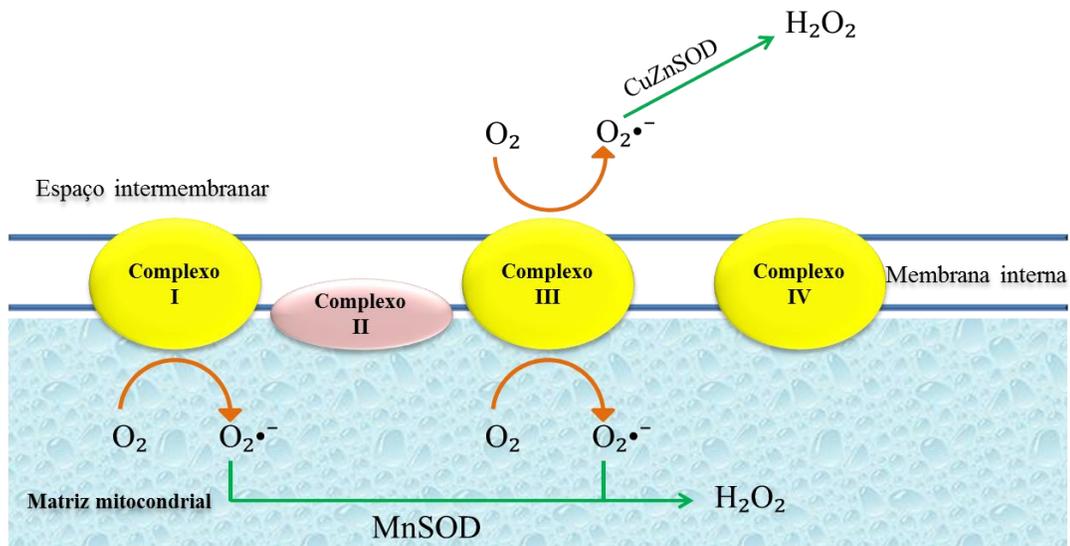


Figura 1.8 - Esquema representativo da produção de ROS ao nível da cadeia respiratória mitocondrial. Está representada a produção do radical $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 resultante da ação da enzima Manganésio superóxido dismutase (MnSOD). Complexo I: NADH ubiquinona redutase, II: succinato ubiquinona redutase, III: ubiquinol citocromo C redutase, IV: citocromo C oxidase. Adaptado de Szeto (2006).

A produção de ROS também pode ser influenciada por um ambiente hormonal propício. Um estudo de Sun e colaboradores (2001) revela que os androgénios, nomeadamente, a testosterona estimulam a produção de ROS através da participação do AR (Figura 1.9).

Por outro lado, a produção contínua de ROS celular pode ser desencadeada por carcinogéneos, poluentes ambientais, infeção e inflamação, radiações ionizantes, ingestão calórica, atividade física, entre outros (Beckman e Ames, 1998; Finkel e Holbrook, 2000; Coussens e Werb, 2002; Grek e Tew, 2010).

As ROS desempenham um papel fundamental, porém paradoxal, na regulação de vários processos celulares. Sikka (2003) considerava estas espécies como “a double-edged sword”, isto é, “um pau de dois gumes”. Neste contexto, níveis adequados de ROS são fundamentais para permitir a normal função e sinalização celular, participando no crescimento, diferenciação, morte ou regulação da expressão génica (Waris e Ahsan, 2006). Porém, nas células neoplásicas caracterizadas pelo aumento de ROS, a função e sinalização celular encontram-se desreguladas. As ROS podem induzir a fosforilação e ativação de proteínas envolvidas na sobrevivência das células. Nomeadamente, os peróxidos podem oxidar a enzima *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN), impedindo a sua ação de desfosforilação do fosfo-inositol-trifosfato 3 (PIP3). Por conseguinte a proteína serina treonina cinase AKT é fosforilada, acionando por sua vez a fosforilação de inúmeras proteínas que passam a estar envolvidas na sobrevivência da célula. Assim, ocorre fosforilação de BAD impedindo a ativação de moléculas pró-apoptóticas da família BCL-2 como o BAX ou BAK. A inibição de BAD associa-se à inibição da apoptose por via mitocondrial não havendo ativação de caspase 9. A AKT fosforila os fatores de transcrição *forkhead* (FOXO) condicionando a diminuição da expressão de genes pró-apoptóticos (Figura 1.9) (Clerkin *et al.*, 2008).

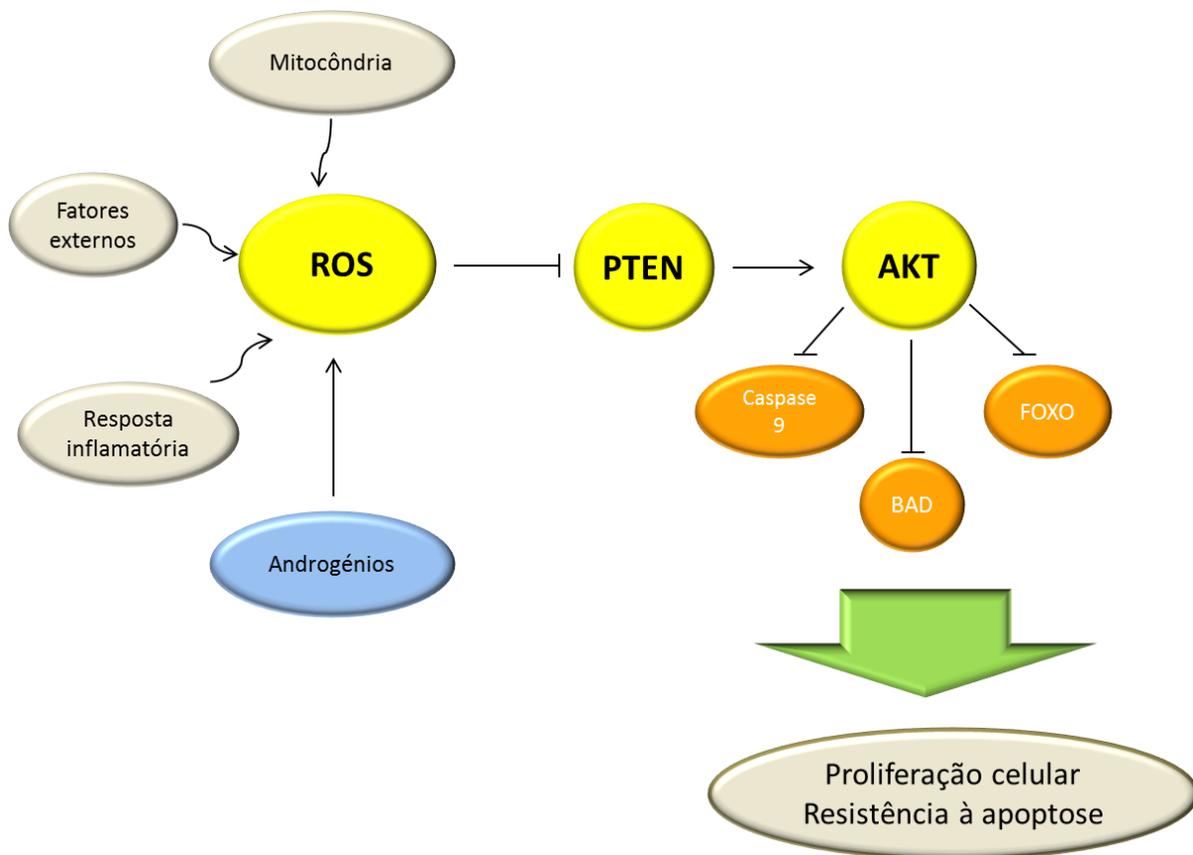


Figura 1.9 - Exemplificação da origem de ROS e sua ação na proliferação celular e resistência à apoptose. As ROS podem resultar da função mitocondrial, da ação de fatores externos ao organismo, da resposta inflamatória e da própria ação de androgénios. As ROS, nomeadamente, peróxidos podem oxidar a enzima *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN), impedindo a sua ação de desfosforilação. Consequentemente a serina treonina cinase (AKT) é fosforilada. Esta enzima fosforila outras proteínas como BAD e fatores de transcrição *forkhead* (FOXO) inibindo a sua atividade e impede a ativação de caspase 9 mitocondrial contribuindo para a sobrevivência da célula.

Considerando a facilidade com que os radicais oxidam biomoléculas, nomeadamente, ácidos nucleicos, proteínas e lípidos, poderão condicionar a etiologia e prognóstico de várias patologias entre as quais o cancro (Grek e Tew, 2010). As moléculas que cedem eletrões são oxidadas podendo neste processo sofrer lesões estruturais (Garcia-Bailo *et al.*, 2011).

A oxidação dos lípidos designada por peroxidação lipídica ocorre frequentemente ao nível dos ácidos gordos polinsaturados da bicamada lipídica, comprometendo as propriedades biofísicas da

membrana como a fluidez e permeabilidade, bem como a estrutura e função (Zadak, 2009). A peroxidação lipídica processa-se por reação em cadeia originando diversos radicais capazes de iniciar novas reações (Halliwell, 1987). Como resultado formam-se também produtos não radicalares incluindo aldeídos lipídicos como o hidroxinonenal ou o malonilaldeído (MDA), utilizados para avaliação da extensão da peroxidação lipídica. A lesão oxidativa dos lípidos condiciona, ao longo do tempo, a progressiva substituição de ácidos gordos polinsaturados por outros monoinsaturados, por sua vez mais suscetíveis à ação das ROS (Dexter *et al.*, 1994).

Além do referido, as alterações na composição da bicamada lipídica refletem-se na estrutura e atividade das proteínas que aí estão contidas, afetando as respectivas atividades enzimáticas, como a forma de transporte e reconhecimento (Moley e Muecker, 2000). A oxidação das proteínas, origina alterações conformacionais, modificações nos aminoácidos e mesmo ruptura nas ligações peptídicas. A lesão de alguns aminoácidos como a lisina, a arginina e a prolina conduz à formação de compostos derivados, os grupos carbonil, cuja quantificação permite avaliar a extensão da lesão oxidativa de proteínas (Dean *et al.*, 1997; Nichols e Katiyar, 2010).

A lesão oxidativa do ADN pode condicionar o aparecimento de mutações e instabilidade genética, cuja acumulação é inerente ao processo de carcinogénese (Olovnikov *et al.*, 2009). Além disso, a lesão oxidativa do ADN também se associa a alterações do estado de metilação, nomeadamente, nas células cancerígenas. Neste sentido é frequente observar a hipermetilação de regiões reguladoras ou promotoras de genes supressores tumorais, com consequente silenciamento destes. Por outro lado, ocorre frequentemente hipometilação global de genes resultando na ativação de protooncogenes (Donkena *et al.*, 2010). De uma forma geral, a lesão oxidativa de ADN associa-se a alterações moleculares que condicionam a sua ligação à enzima

ADN metil-transferase, a qual adiciona grupos metilo (CH₃) ao nucleótido citosina (Donkena *et al.*, 2010).

1.4.2 Ação dos sistemas antioxidantes

Os sistemas antioxidantes contrariam as reações de oxidação ou o seu efeito através da inibição da formação dos radicais, inativação dos mesmos e reparação da lesão oxidativa de biomoléculas, de modo a manter ou restabelecer o estado redox (Kannappan *et al.*, 2012). Diversos antioxidantes, por se encontrarem na forma reduzida, têm capacidade de doar elétrons aos radicais tornando-os mais estáveis e conseqüentemente menos reativos. Outros mecanismos envolvem a inibição da expressão de enzimas indutoras de radicais livres como a ciclooxigenase-2 através do licopeno (Palozza *et al.*, 2010).

Os antioxidantes podem ter origem endógena ou exógena (Garcia-Bailo *et al.*, 2011). Os de origem endógena, também designados por defesas antioxidantes, podem ser do tipo enzimático ou não enzimático. As enzimas antioxidantes incluem a catalase, a superóxido dismutase (SOD), a redutase do glutatião (Gl-Red), a peroxidase do glutatião (Gl-Px), a glutathione-S-transferase (GST), a redutase da tioredoxina (Trxr), a peroxiredoxina (Prx) entre outras. As defesas antioxidantes não enzimáticas incluem o glutatião (GSH), as tioredoxinas (Trx), a melatonina, as vitaminas C e E, entre outros (Poljsak, 2011).

1.4.2.1 Defesas antioxidantes enzimáticas

A SOD pertence ao grupo das defesas antioxidantes enzimáticas. Apresenta três isoformas, a citosólica dependente de cobre e zinco como cofatores (Cu,Zn-SOD), a mitocondrial (Mn-SOD), dependente de manganésio e a extracelular (EC-SOD). Esta enzima cataliza a reação de dismutação do anião superóxido com formação de peróxido de hidrogénio, de acordo com a equação representada abaixo (Halliwell, 1985; Poljsak, 2011):



Por seu lado, o peróxido de hidrogénio pode ser convertido em água por intermédio de enzimas como a catalase, através da seguinte equação (Poljsak 2011):



A conversão do peróxido de hidrogénio em água também pode ser mediada pela Gl-Px. Este processo, envolve ainda outras defesas antioxidantes como a Gl-Red e o GSH de acordo com o esquema abaixo representado (Fujii *et al.*, 2011):

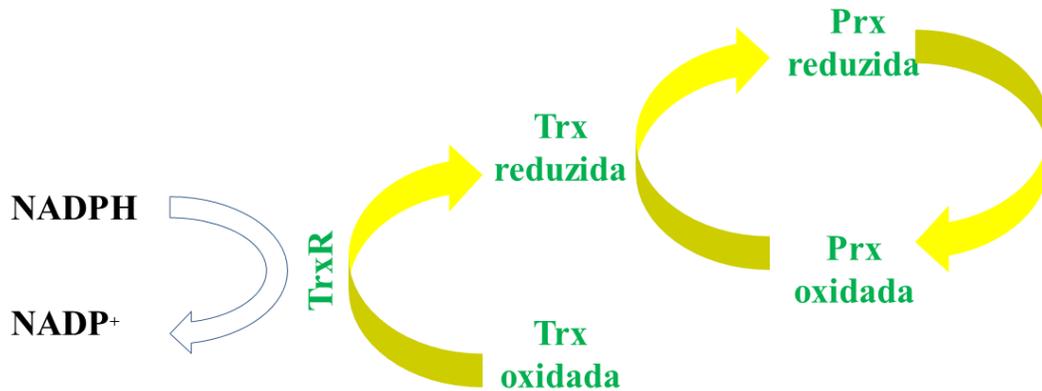


A GI-Px é uma selenoproteína presente no organismo humano sob a forma de cinco isoenzimas diferentes, a GI-Px-1 presente no citosol, a GI-Px-2 no trato gastrointestinal, a GI-Px-3 no plasma, a GI-Px-4 e a GI-Px-sn presente no núcleo de espermatozoides (Almondes *et al.*, 2010).

A GST é uma enzima que tem a capacidade de catalisar a biotransformação de metabolitos ativados, por exemplo PAHs, por conjugação com o GSH, permitindo a sua eliminação (Taioli, 2008).

A Trxr é uma enzima que incorpora resíduos de selenocisteína e apresenta três isoformas com diferentes localizações, a Trxr1 no citosol, a Trxr2 na mitocôndria e a Trxr3 presente nos testículos (Jackson-Rosario e Self, 2010). A sua principal função consiste em reduzir a Trx (ver esquema seguinte). No entanto, também reduz outros compostos como a vitamina C, repondo a sua atividade antioxidante (Almondes *et al.*, 2010).

As Prx representam uma família de peroxidases (Prx 1 a 6) que convertem H₂O₂ e hidroperóxidos orgânicos em água e álcool respetivamente. A redução das Prx (1 a 5) oxidadas é efetuada pela Trx e, no caso da Prx 6, pelo GSH (Zhu *et al.*, 2012).



Apresentam seis isoenzimas, as Prx 1 a 6. A Prx1, 2 e 6 estão localizadas principalmente no citosol, a Prx3 na mitocôndria, a Prx4 está presente no retículo endoplasmático e na matriz extracelular, enquanto a Prx5 se localiza no citosol, núcleo, mitocôndria e peroxissomas.

1.4.2.2 Defesas antioxidantes não enzimáticas

1.4.2.2.1 Antioxidantes endógenos

Entre as defesas antioxidantes endógenas não enzimáticas pode referir-se o GSH, o sistema tioredoxina, a melatonina e o ácido úrico (Poljsak, 2011).

O GSH (γ -glutamilcisteinilglicina) é o tiol não proteico mais abundante nas células dos mamíferos. Trata-se de um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina. É sintetizado a nível intracelular a partir dos aminoácidos que o constituem e pela ação das enzimas sintase da γ -glutamilcisteína e sintase do GSH (Magwere e Burchill, 2011).

O GSH tem capacidade para atuar diretamente sobre as ROS, ficando oxidado (GSSG). Este é novamente reduzido por ação da Gl-Red, utilizando NADPH, como previamente ilustrado (Fujii *et al.*, 2011). Da mesma forma que o GSH, a melatonina tem a capacidade de neutralizar diretamente as ROS (Flora *et al.*, 2008; Poljsak, 2011), sendo também indutora da expressão e de atividade das enzimas Gl-Px e SOD.

A Trx é uma selenoproteína que atua como dador de elétrons a outras enzimas antioxidantes intra e extracelulares, como a Gl-Px e a Prx (Almondes *et al.*, 2010).

O ácido úrico é um produto final do metabolismo de purinas, presente no plasma e, em concentrações fisiológicas removem radicais superóxido e hidroxilo (Larumbe, 1999).

1.4.2.2 Antioxidantes de fonte exógena

Diversos estudos têm sugerido que os antioxidantes obtidos através da alimentação podem ter um efeito preventivo no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata (Pathak *et al.*, 2003), nomeadamente, as vitaminas C, D e E, o selénio e os polifenóis como o epigalo- β -catequina-3-galato (Ansari *et al.*, 2002; Pathak *et al.*, 2003; Bettuzzi *et al.*, 2006; Russo *et al.*, 2010). Estes compostos combatem a lesão oxidativa de biomoléculas nomeadamente do ADN, prevenindo mutações que estão na base da carcinogénese (Olovnikov *et al.*, 2009; Garcia-Bailo *et al.*, 2011).

Outras propriedades destes compostos relacionam-se com a reparação da lesão oxidativa. Por exemplo, os polifenóis induzem a reparação do ADN mutado. Têm ainda a propriedade de inibir a angiogénese, “frenar” a resposta inflamatória, atuando sobre citocinas como o VEGF e a

cicloxygenase, envolvidos na carcinogénese (Bliveau e Gingras, 2007). A tabela I.1 ilustra diversos antioxidantes existentes nas respetivas fontes alimentares.

Tabela I.1 - Fontes alimentares de antioxidantes

Antioxidantes exógenos	Fontes alimentares
Selénio	Vegetais, grão, carne vermelha, peixe, aves, ovos
Catequinas	Chá verde, azeite
Vitamina C	Citrinos, morango, brócolos, repolho, pimento verde, damasco
Vitamina D	Fígado, leite, peixe gordo como o salmão e atum
Vitamina E	Cereais integrais, abacate, manteiga, brócolos e sementes

O selénio é um elemento vestigial presente no nosso organismo, que se encontra na natureza fundamentalmente sob a forma inorgânica de selenito e selenato, ou na forma orgânica de selenometionina e selenocisteína (Almondés *et al.*, 2010).

Este elemento tem sido associado à prevenção do cancro da próstata reconhecendo-se um papel importante na prevenção da lesão oxidativa do ADN, do stresse oxidativo e da inflamação. Pode também induzir a ativação de mecanismos que envolvem as selenoproteínas, nomeadamente a Gl-Px (Nadiminty e Gao, 2008). Contudo, concentrações elevadas de selénio, apresentam propriedades anticancerígenas através da inibição da proliferação celular e indução de apoptose em células tumorais. Estes efeitos têm sido demonstrados em células de cancro da próstata (Menter *et al.*, 2000; Husbeck *et al.*, 2005; Reagan-Shaw *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2011) e correlacionados com um aumento da relação BAX/BCL-2, de BAK e de BID e diminuição da expressão do fator anti-apoptótico BCL-2 (Reagan-Shaw *et al.*, 2008; Freitas *et*

al., 2011). A indução de apoptose tem sido também associada a um aumento de stresse oxidativo em resultado da diminuição de defesas antioxidantes nomeadamente da razão GSH/GSSG, concomitantemente com um aumento de anião superóxido em células de cancro da próstata (Husbeck *et al.*, 2005; Xiang *et al.*, 2009).

Guan e colaboradores (2009) referem que o selenito de sódio (Na_2SeO_3), uma forma inorgânica de selénio, altera a distribuição intracelular da (Mn-SOD), a qual diminui na mitocôndria e aumenta no citosol. Como consequência, os autores preveem uma acumulação de anião superóxido intracelular responsável pela indução de apoptose. Menter e colaboradores (2000) evidenciaram que o selenito de sódio é mais potente do que a selenometionina em termos de indução de apoptose. Outros autores, como Jiang e colaboradores (2002) demonstraram que a exposição de linhas celulares androgeno-independentes, como as células DU145, a selenometionina e ao selenito de sódio, induziam alterações específicas no ciclo celular (bloqueio) e apoptose mediada pela libertação do citocromo C. Tem sido ainda referida a sua participação na fosforilação de cinases como a proteína cinase B (AKT) e outras, designadamente, a *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK)1/2, a *Jun NH2-terminal kinase 1/2* (JNK1/2), e a *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK), bem como na participação da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, incluindo os inibidores de ciclinas dependentes de cinases (P27KIP1 e P21CIP1). Concomitantemente, a exposição ao selenito de sódio induz fragmentação de ADN, independentemente das caspases, e bloqueio do ciclo celular na fase S, o que poderá estar associado a uma diminuição da expressão de P27KIP1 e P21CIP1 e aumento da proteína supressora tumoral P53.

O selênio participa no sistema antioxidante como selenocisteína, sendo incorporando por várias selenoproteínas, entre elas a GPx e TRxR, as quais protegem o ADN da lesão oxidativa (Almondes *et al.*, 2010).

Alguns estudos, como já referimos, relacionam a toma de chá verde com a prevenção do cancro da próstata (Van Poppel e Tombal, 2011). O composto epigalo- β -catequina-3-galato pertencente aos polifenóis está presente no chá verde em elevadas concentrações sendo a catequina mais eficiente a reagir com as ROS. Além disso, sequestra iões metálicos, o que previne a formação de radicais (Lipinski, 2011; Tachibana, 2011) e evidencia ação antineoplásica através da inibição da proliferação celular e da indução de apoptose (Sara *et al.*, 2009; Cansar *et al.*, 2012).

A vitamina C é o antioxidante hidrossolúvel de maior abundância. Apresenta-se predominantemente na forma de ácido ascórbico. A vitamina C reage com os radicais hidroxilo, alcóxilo e peróxilo lipídico. Além disso, participa na reciclagem de vitamina E e GSH (Garcia-Bailo *et al.*, 2011) e pode reduzir metais de transição tais como o cobre e ferro (Valko *et al.*, 2007).

A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel, que compreende os derivados do tocoferol e do tocotrienol (Van Poppel e Tombal 2011; Kannappan *et al.*, 2012). O tocoferol apresenta quatro formas (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol), sendo o α -tocoferol a forma predominante no organismo. O tocoferol reage com radicais hidroxilo, alcóxilo e peróxil lipídico (Garcia-Bailo *et al.*, 2011). De acordo com Van Poppel e Tombal (2010), níveis elevados de α -tocoferol plasmático têm efeito preventivo no cancro da próstata e na inibição da proliferação celular ou no crescimento tumoral. Recentemente, Ledesma e colaboradores (2011) determinaram, num estudo clínico, que a ingestão de 50 mg diários de α -tocoferol reduz a incidência de cancro da próstata em 32% e a mortalidade ao fim de 8 anos, em 41% dos casos

estudados. Observaram ainda que essa redução é independente dos hábitos tabágicos (Ledesma *et al.*, 2011). Este composto evidencia ainda inibição da lipoxigenase e cicloxigenase, bem como diminuição de TNF- α envolvidos na inflamação, por sua vez relacionada com o aumento de ROS (Garcia-Bailo *et al.*, 2011).

Relativamente à vitamina D, é também um importante antioxidante capaz de prevenir a peroxidação lipídica (Wiseman, 1993).

1.5 O fumo do tabaco e o stresse oxidativo

Um distúrbio no equilíbrio redox pode estar implicado na patogenia de diversas doenças humanas, nomeadamente no carcinoma da próstata (Willis e Wians, 2003; Miyake *et al.*, 2004). Níveis elevados de ROS, acentuados pelo envelhecimento, inflamação ou por fatores externos como o tabaco a dieta e o consumo de álcool, podem lesar o ADN, as proteínas e os lípidos e, desta forma, contribuir para a desregulação de várias vias de transdução de sinal envolvidas na sobrevivência, na regulação do ciclo celular e na morte celular por apoptose (Beckman e Ames 1998; Finkel e Holbrook, 2000; Coussens e Werb, 2002; Willis e Wians, 2003). Assim, as ROS interferem na função celular normal com favorecimento de mutações, e instabilidade genética, mecanismos relacionados com a carcinogénese.

As ROS são formadas continuamente nas células como consequência natural do seu metabolismo durante a fosforilação oxidativa mitocondrial e outras reações que envolvem a transferência de eletrões, sendo de destacar o $O_2\cdot^-$, o $\cdot OH$ e o H_2O_2 presentes na mitocôndria (Novo e Parola, 2008). Uma vez que a mitocôndria é o organelo intracelular onde estas espécies são

maioritariamente produzidas o ADN mitocondrial torna-se um alvo fácil da lesão oxidativa, com consequente mutação genética, uma vez que é desprovido de histonas e se encontra próximo da fonte geradora de ROS (Fraga *et al.*, 1990; Sambade, 1999; Carew e Huang, 2002). Na realidade, as alterações do ADN mitocondrial também têm sido associadas ao processo de carcinogénese. Foi já demonstrado que células de indivíduos fumadores e, por conseguinte, expostas aos compostos presentes no tabaco, possuem maior quantidade de ADN mitocondrial, quando comparadas com células de não fumadores. Mais ainda, o fumo do tabaco pode induzir o aumento do conteúdo de ADN mitocondrial que está associado a lesão oxidativa, e/ou a alterações da atividade dos complexos da cadeia respiratória (Tan *et al.*, 2008).

O fumo do tabaco é formado por uma mistura complexa de compostos, entre os quais ROS e outras espécies radicalares, nomeadamente óxido nítrico. Este composto tem a capacidade para reagir com o oxigénio e formar ONOO⁻, uma espécie reativa de nitrogénio com elevada ação oxidativa, tendo sido implicado na carcinogénese e na promoção tumoral (Hecht, 1999; Hecht, 2006; Donohue, 2006; Biswas e Rahman, 2009).

Todos os órgãos e tecidos são potencialmente atingidos pelas ROS e outros metabolitos ativos do fumo do tabaco como os PAHs, podendo associar-se a diversos tipos de cancro, quer por contacto direto, como no cancro da laringe, do pulmão, e do esófago, quer pelo contacto com os produtos cancerígenos transportados na corrente sanguínea, como acontece no cancro do pâncreas e na leucemia mielóide aguda. Os tecidos podem ainda ser atingidos pelos metabolitos do fumo do tabaco aquando da sua excreção, como se verifica no cancro da bexiga (Taioli 2008; Hoffmann *et al.*, 2001). Contudo, permanece por esclarecer a ação dos hábitos tabágicos, no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata. Como veremos mais adiante, o risco em fumadores poderá estar condicionado pela associação a outros fatores de risco como o consumo

de álcool e/ou variações interindividuais, nomeadamente, na capacidade de metabolização e eliminação dos compostos carcinogéneos presentes no fumo de cigarro (Rybicki *et al.*, 2006).

A interação gene-ambiente nos diversos tipos de cancro associados aos hábitos tabágicos é complexa, dependendo da multiplicidade de genes envolvidos no metabolismo dos compostos do fumo do tabaco, da quantidade de substratos e do tipo de composto (Taioli, 2008).

Como vimos, o fumo do tabaco é composto por uma complexa mistura de substâncias com potencial carcinogéneo, expondo os fumadores a quantidades significativas de ROS (Bloomer, 2007).

Vários estudos indicam que os fumadores possuem níveis de biomarcadores compatíveis com aumento de stresse oxidativo. São exemplos, o aumento de grupos carbonilo, em resultado da oxidação proteica ou de malonilaldeído (MDA), associado à peroxidação lipídica (Bloomer, 2007).

Por outro lado os hábitos tabágicos associam-se a diminuição dos níveis séricos das vitaminas A e C, da razão GSH/GSSG e cisteína/cisteína oxidada (Yanbaeva *et al.*, 2007; Sarir *et al.*, 2009).

Um estudo preliminar, desenvolvido por Freitas e colaboradores (2007), revelou aumento de stresse oxidativo num grupo de doentes fumadores com cancro da próstata, traduzido por diminuição significativa do estado antioxidante total (TAS) e de GSH, bem como por aumento da peroxidação lipídica, sugerindo a participação dos hábitos tabágicos e do stresse oxidativo no desenvolvimento do cancro da próstata.

No entanto, Chaudhary e colaboradores (2007), observaram um aumento significativo da expressão da peroxirredoxina I (Prx I), em linhas celulares de cancro da próstata (22Rv1) e de epitélio não neoplásico (PrEC), quando tratadas com benzo(a)pireno. Uma vez que as Prx são enzimas antioxidantes, o seu aumento foi interpretado como um mecanismo de autodefesa destas

células. A Prx está aumentada também em vários outros tipos de cancro (Yanagawa *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2001).

Sarir e colaboradores (2009) evidenciaram que a exposição de macrófagos ao fumo de tabaco conduz a diminuição de GSH e aumento de ROS, de uma forma dependente da concentração.

A lesão oxidativa do ADN, baseado na quantificação de 8-hidroxi-desoxiguanosina, foi evidenciada em células da retina de ratos expostos de forma crónica ao fumo de tabaco (Fujihara *et al.*, 2008).

O tabaco é também, um promotor da resposta inflamatória generalizada resultando no aumento de leucócitos polimorfonucleados, eles próprios produtores de ROS (van Eeden e Hogg, 2000; Yanbaeva *et al.*, 2007).

Desta forma, o stresse oxidativo induzido pelo fumo do tabaco deverá estar relacionado com a lesão direta de ROS sobre as biomoléculas, bem como na capacidade para induzir a resposta inflamatória, modificações na atividade mitocondrial e diminuição de defesas antioxidantes o que pode contribuir para o desenvolvimento e progressão do cancro da próstata (van Eeden e Hogg, 2000; Yanbaeva *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2008; Sarir *et al.*, 2009) (Figura 1.10).

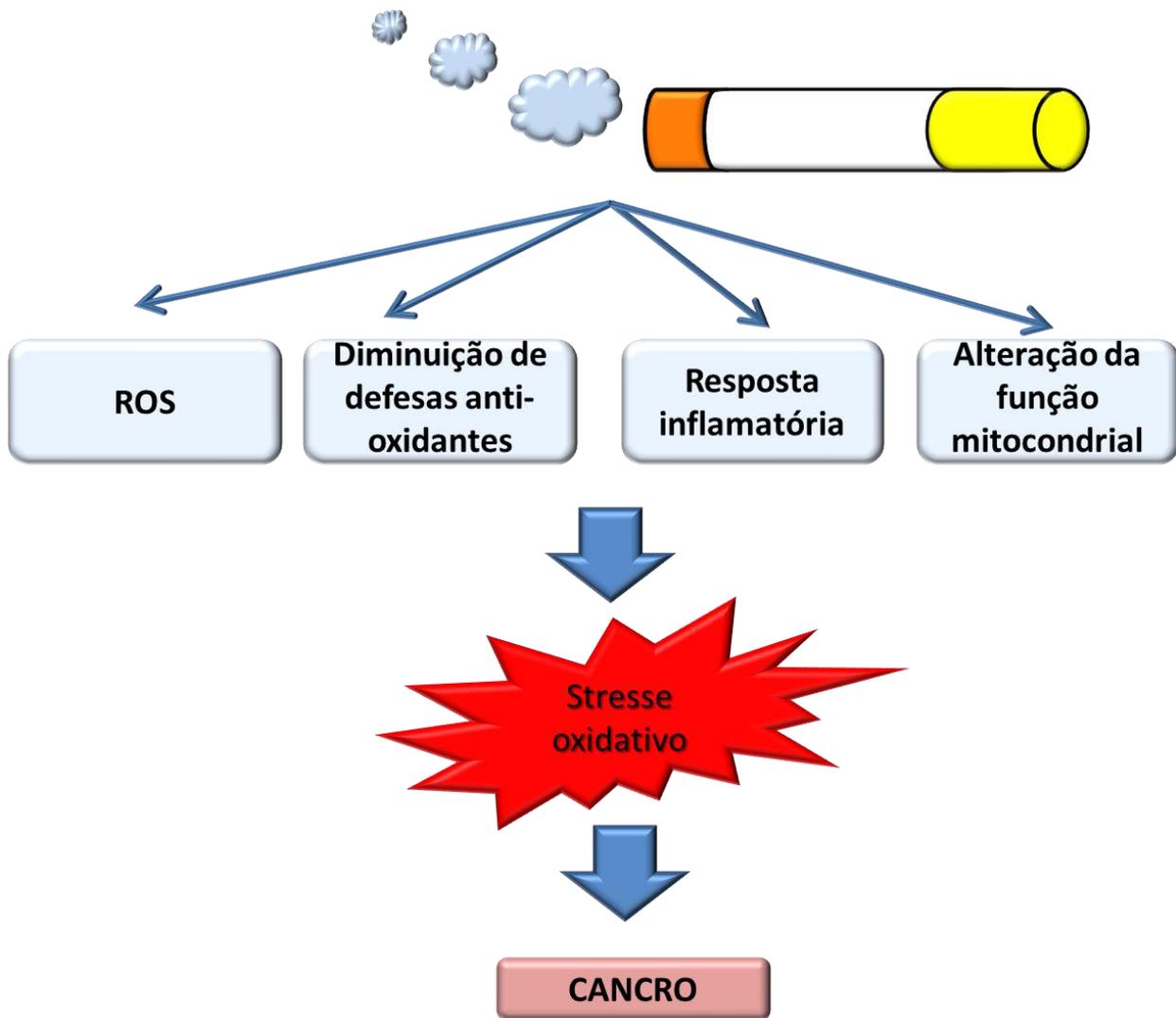


Figura 1.10 - Indução de stresse oxidativo mediado pelo fumo do tabaco.

Diversos estudos sugerem também que a suscetibilidade genética individual relacionada com a capacidade antioxidante e inativadora de carcinogéneos presentes no fumo do tabaco, poderá condicionar o desenvolvimento da doença, entre indivíduos fumadores (Rybicki *et al.*, 2006; Gsur *et al.*, 2001).

O efeito do stresse oxidativo depende ainda do tipo de ROS envolvido bem como da concentração e do tempo de exposição (Pelicano *et al.*, 2004).

1.6 Potencial ação cancerígena do fumo do tabaco

O fumo do tabaco contém compostos cancerígenos como os PAHs e as nitrosaminas, os quais estão associados à formação de adutos de ADN (Lodovici e Bigagli, 2009). Os PAHs e as nitrosaminas, são metabolizados numa primeira fase pelo sistema enzimático P450 em compostos eletrofílicos com capacidade para estabelecerem ligações covalentes com as macromoléculas de ADN, formando adutos (Sterling e Cutroneo, 2004). A reação inicial de hidroxilação, tal como ocorre com outros pró-carcinogéneos presentes no tabaco, é essencial para a conversão destas substâncias em carcinogéneos, capazes de provocarem mutações permanentes no ADN à semelhança do que ocorre em células de cancro (Hecht, 1999; Tan *et al.*, 2008).

Os adutos de ADN poderão participar na carcinogénese, sobretudo, se ocorrerem em determinados locais da molécula, como em genes supressores tumorais, proto-oncogenes, ou genes codificantes de enzimas responsáveis pela sua reparação, originando mutações que se perpetuam ao longo das divisões celulares (Rybicki *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2011).

Estes adutos de ADN são considerados por alguns autores como marcadores moleculares de exposição ao fumo do tabaco (Lodovici e Bigagli, 2009). De facto, diversos estudos epidemiológicos reportaram a associação entre os níveis de adutos de ADN e o cancro do pulmão, cabeça e pescoço, bexiga (Lodovici e Bigagli, 2009) e próstata (Rybicki *et al.*, 2006). Além disso, mostraram ainda que existe uma relação inversamente proporcional entre a presença dos adutos de ADN em tecido prostático humano, originados pela ação dos PAHs (PAH-DNA), a progressão da doença e os níveis de PSA. Uma vez que os adutos de ADN não são transmitidos às células filhas, estes vão diminuindo ao longo das mitoses celulares, o que é consistente com um papel importante destas alterações durante o processo inicial de carcinogénese.

O benzo(a)pireno é o PAH mais estudado no âmbito do cancro da próstata. A sua ação carcinogénica requer ativação metabólica (Kooiman *et al.*, 2000). Haque e colaboradores (2005) observaram um aumento da expressão da metaloproteinase 9 (MMP-9), uma enzima necessária à metastização, em células humanas de cancro da próstata expostas a PAHs, entre os quais o benzo(a)pireno. Estes compostos também parecem contribuir para a agressividade de outras células neoplásicas. Assim, a exposição de linhas celulares isoladas de cancro tiróide a benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno e benzo(k)fluoranteno resultou na indução da proliferação celular, sendo que o benzo(a)pireno teve um efeito mais acentuado (Kobayashi *et al.*, 2005).

Além de pró-carcinogénicos, o fumo do tabaco contém ROS associados ao desenvolvimento e progressão do cancro da próstata. Como mencionado, vários estudos indicam que os fumadores possuem um nível aumentado de biomarcadores de stresse oxidativo, quando comparados com não fumadores (Bloomer *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2007). O aumento de grupos carbonil, em parte resultantes da oxidação de resíduos de aminoácidos como a lisina, a arginina e a prolina foi verificado em fumadores, comparativamente a não fumadores (Nichols e Katiyar, 2010).

Para além das ROS, o fumo do tabaco, contém espécies reativas de nitrogénio, como o óxido nítrico (NO[•]). Este radical apresenta um papel fisiológico importante em concentrações adequadas, na modulação da pressão arterial e da neurotransmissão. No entanto, quando gerado em excesso o NO[•] torna-se tóxico e está implicado na carcinogénese. Um dos mecanismos pode estar relacionado com o facto do NO[•] reagir facilmente com o oxigénio e formar ONOO⁻, altamente reativo sobre as biomoléculas (Halliwell, 1987). Os hábitos tabágicos também têm sido associados a níveis aumentados de testosterona (Ferrini e Barrett-Connor, 1998; Plaskon *et al.*, 2003). Apesar dos androgénios serem necessários para o desenvolvimento e crescimento do tecido prostático normal, tal facto pode também potenciar a transformação maligna, pelo

aumento da proliferação celular (Nelson *et al.*, 2003). Concomitantemente, um estudo de Mehraein-Ghomi e colaboradores (2008) revela que os androgénios induzem a produção de ROS.

A nicotina também está presente no tabaco e é um reconhecido carcinogénico. Além de inibir a apoptose, pode ter um papel na sobrevivência das células neoplásicas (Wright *et al.*, 1993).

O tabagismo, habitualmente com carácter crónico, também interfere com o sistema imunitário, observando-se aumento de leucócitos polimorfonucleados e diminuição da atividade das células *natural killer* bem como dos linfócitos T supressores, em indivíduos fumadores (Hughes *et al.*, 1985; van Eeden e Hogg, 2000).

A figura 1.11 ilustra a potencial ação carcinogénica mediada pelo fumo do tabaco em resultado da presença de pró-carcinogénicos como os PAHs, ou de compostos indutores de stresse oxidativo.

Por último, Enokida e colaboradores (2006) demonstraram pela primeira vez uma relação significativa entre as alterações epigenéticas e o stresse oxidativo induzido pelo fumo do tabaco.

De facto, estes autores verificaram que existe uma relação entre o estado de hipermetilação dos ilhéus de CpG de diversos genes, nomeadamente, do *APC* (*adenomatous polyposis coli*), do *GSTP1* (*glutathione-S-transferase π 1*) e do *MDR1* (*multidrug resistance 1*), com os hábitos tabágicos. A metilação encontrada nos genes de indivíduos fumadores, revelou-se significativamente superior por comparação com os genes de indivíduos que nunca fumaram. Em doentes com cancro da próstata, observou-se uma associação entre a metilação destes genes e a carga tabágica, a qual é definida pelo produto entre o número de maços fumado diariamente e o número de anos que o indivíduo fumou (Ebbert *et al.*, 2003). O silenciamento de genes através da metilação do ADN em ilhéus CpG nas regiões promotoras é um dos mecanismos *major* de inativação de genes supressores tumorais (Jones e Baylin, 2007).

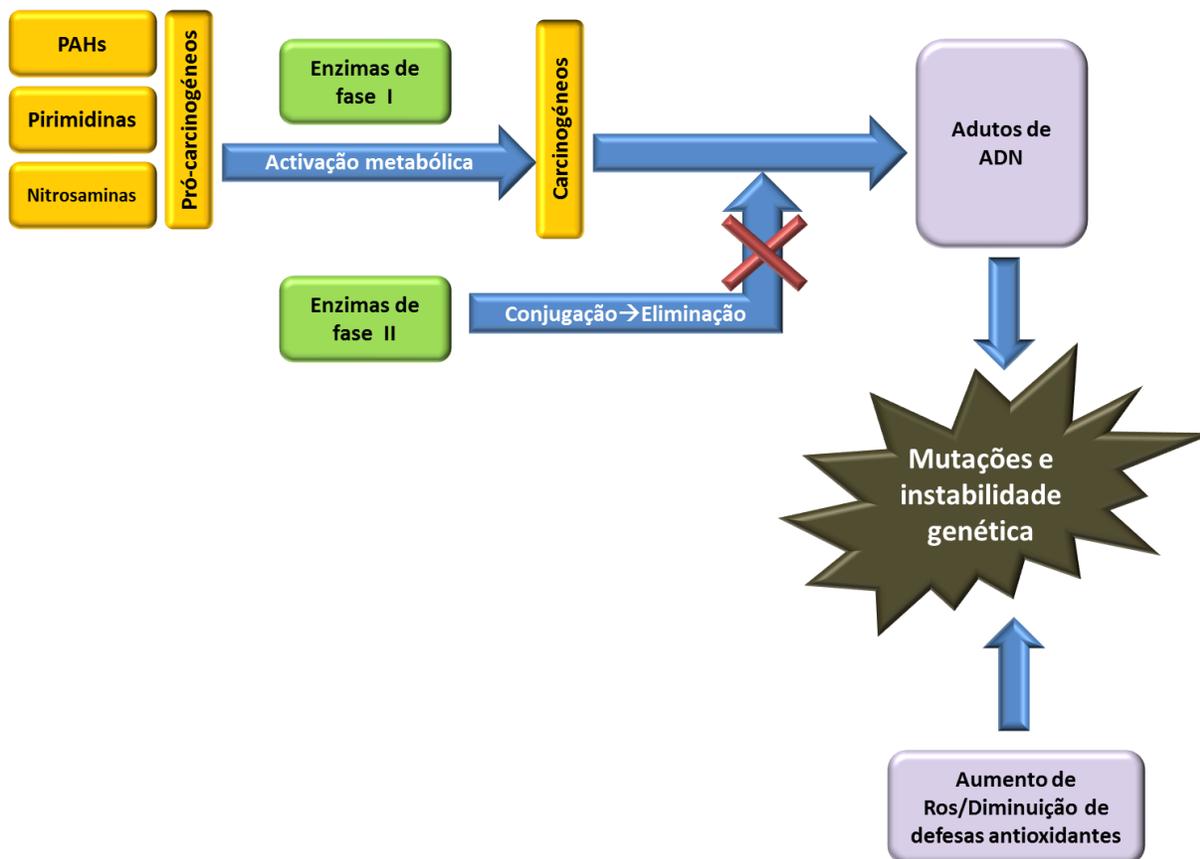


Figura 1.11 - Representação esquemática da potencial ação carcinogénica do fumo do tabaco. PAHs - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, ROS - espécies reativas de oxigénio.

O estado de metilação tem tendência a ser menor nos ex-fumadores do que em fumadores ativos, e maior em indivíduos com cancro da próstata avançado (Enokida *et al.*, 2006). De acordo com Marsit e colaboradores (2005) a metilação dos genes parece estar relacionada essencialmente com a idade de início dos hábitos tabágicos e não tanto com a carga tabágica.

1.7 Carcinogénese da próstata

Os indicadores estatísticos revelam diminuição na mortalidade do cancro da próstata, ao longo da última década (Figura 1.2) (Siegel *et al.*, 2012), em parte, devido ao rastreio atempado, que permite um diagnóstico precoce (Bosetti *et al.*, 2011). No entanto, alguns autores referem que cerca de metade dos casos ainda são diagnosticados em fase de doença avançada o que poderia ser evitado, atendendo ao longo período de latência evidenciado pela doença (Fleshner e Klotz, 1998). Sakr e colaboradores (1994) detetaram a presença de microfocos malignos em 30% dos homens com idades compreendidas entre os 30 e os 39 anos, sendo que as manifestações clínicas, ocorrem maioritariamente entre a sexta e a sétima década de vida (Fleshner e Klotz, 1998).

Assim, a carcinogénese da próstata é um processo lento que resulta da acumulação de mutações genéticas e epigenéticas ao longo do tempo, as quais conduzem inicialmente à transformação neoplásica e posteriormente à progressão e metastização do cancro (Klaunig *et al.*, 2010). A figura 1.12 resume as diferentes etapas que estão na base da carcinogénese da próstata.

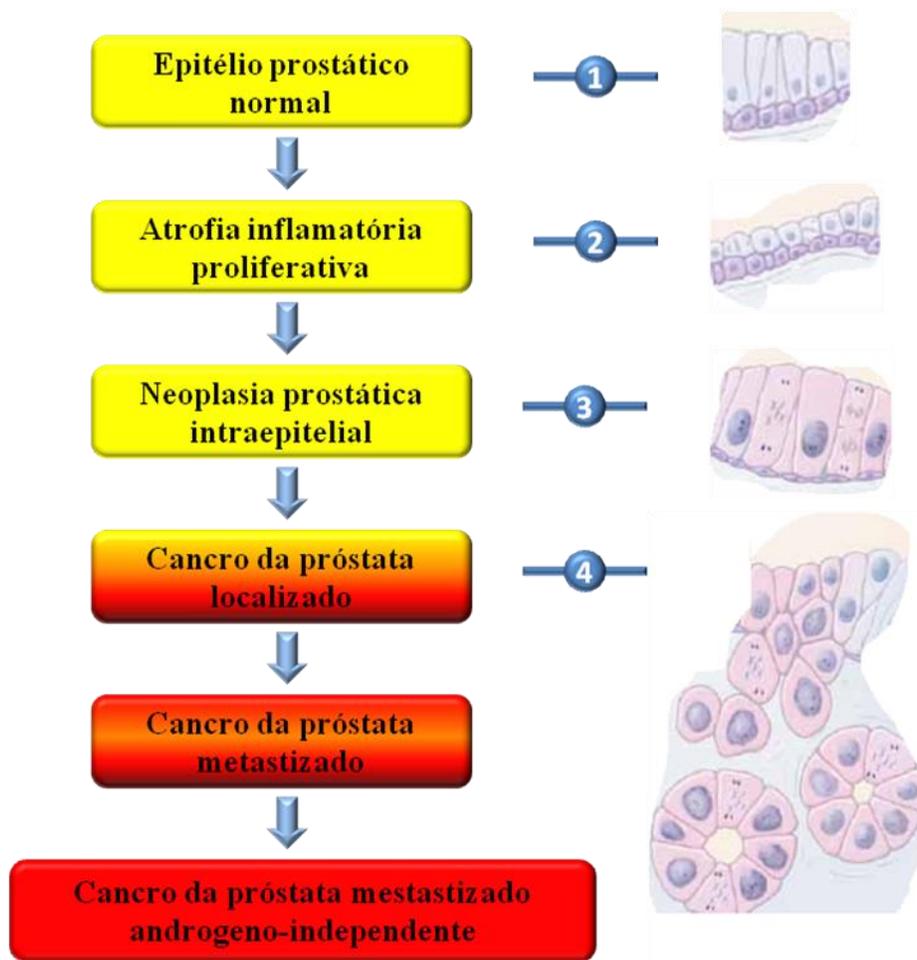


Figura 1.12 - Representação das diferentes etapas da carcinogénese da próstata.

De Marzo e colaboradores (1999), sugeriram que o cancro da próstata é precedido por uma lesão designada por atrofia inflamatória proliferativa (PIA), a qual progride para a neoplasia intraepitelial prostática (PIN) (Figura 1.12) e posteriormente para cancro da próstata. As lesões epiteliais caracterizam-se pela presença de células que perderam a capacidade de diferenciação em células cilíndricas secretoras, características deste epitélio, e ocorrem sobretudo, na região periférica da próstata, na qual se originam a maioria dos tumores prostáticos (De Marzo *et al.*, 1999). A sua distribuição é predominantemente multifocal e parece resultar da inflamação

crónica. Localiza-se em áreas adjacentes às lesões PIN e/ou ao cancro da próstata (De Marzo *et al.*, 1999, Putzi e de Marzo, 2000).

A localização comum das lesões PIA e das áreas de inflamação crónica sugere que as primeiras são o resultado da proliferação regenerativa do epitélio prostático como resposta à lesão oxidativa desencadeada pela inflamação (De Marzo *et al.*, 1999).

As células epiteliais características da PIA evidenciam vários sinais de resposta ao stresse oxidativo, como elevados níveis de GSTP1 ou de glutathione-S-transferase A1 (GSTA1) (De Marzo *et al.*, 1999, Parsons *et al.*, 2001). A perda de GSTP1, provavelmente como resultado da hipermetilação dos ilhéus CpG no gene *GSTP1*, parece associar-se à transição entre a PIA, a neoplasia (PIN) e o cancro da próstata (Lin *et al.*, 2001; Brooks *et al.*, 1998).

A lesão PIN corresponde a uma proliferação de células epiteliais prostáticas transformadas, confinada aos ductos ou ácinos glandulares (McNeal, 1969; McNeal, 2003) que, de acordo com Zynger e Yang (2009), representa uma lesão diretamente precursora do cancro da próstata.

As mutações que condicionam a transformação neoplásica (Nelson *et al.*, 2003) resultam numa célula alterada que se torna anárquica, e que transmite essas características às células filhas (Civetta e Civetta, 2011). A carcinogénese em geral compreende a fase de iniciação que envolve alterações genéticas irreversíveis, a promoção geralmente associada a proliferação acentuada e a fase de progressão que resulta normalmente na formação de novas mutações que conduzem à aquisição do fenótipo maligno ou invasivo (Klaunig *et al.*, 2010). O cancro da próstata avançado ou metastizado compreende uma fase inicial hormono-dependente na qual as células requerem androgénios para a sua proliferação, progredindo posteriormente para a fase hormono-independente (Figura 1.11) (Klaunig *et al.*, 2010). A adição de mutações genéticas que se traduzem por uma atividade aberrante de inúmeras vias de sinalização e regulação celulares,

condicionam o crescimento celular desregulado, potencial replicativo ilimitado, evasão à apoptose, invasão tecidual, angiogénese participando no crescimento e metastização do tumor (Klaunig *et al.*, 2010; Israel e Schwartz, 2011; Civetta e Civetta, 2011; Kannappan *et al.*, 2012). No cancro da próstata estas alterações envolvem em parte a sinalização mediada pelo AR, (Quinn *et al.*, 2005; Marks *et al.*, 2008) e a hipermetilação dos ilhéus CpG do gene *GSTP1* com consequente supressão enzimática e contributo para o aumento de stresse oxidativo.

As mutações observadas na carcinogénese em geral, resultam na expressão aberrante de genes, nomeadamente na ativação de oncogenes como o *BCL2*, *K-RAS*, *N-RAS*; *ERB-B-2*, *C-MYC*, *C-FOS* (Civetta e Civetta, 2011) e na inibição de genes supressores tumorais (*P53* ou *PRB*) (Traynor *et al.*, 2008; Klaunig *et al.*, 2010; Trosko, 2011; Israel e Schwartz, 2011; Civetta e Civetta, 2011; Gordon e Du, 2011). Um estudo de Traynor e colaboradores (2008) revelou uma associação entre o aumento da expressão do oncogene *N-RAS* e a evolução do cancro da próstata hormono-dependente para hormono-refratário ou hormono-independente.

Enquanto os oncogenes estimulam a divisão celular; os genes supressores tumorais inibem a divisão celular, freiam citocinas, induzem a diferenciação e a morte celular por apoptose, e regulam a progressão do ciclo celular a fim de proporcionar a reparação de erros celulares (Gordon e Du, 2011; Civetta e Civetta, 2011). Como exemplo, pode citar-se o gene *P53*, que codifica uma proteína com capacidade de promover a reparação do ADN e o bloqueio do ciclo celular, ou, em alternativa, de induzir a senescência e apoptose (Kumar *et al.*, 2011). No entanto, a persistência de ROS pode inibir a sua formação em resultado da lesão oxidativa dos resíduos de cisteína (Olovnikov *et al.*, 2009; Durackova, 2010). Neste contexto, a célula perde a capacidade de prolongar a fase G1 do ciclo celular para a reparação de erros, e progride para a fase de síntese S (Civetta e Civetta, 2011).

No cancro da próstata os genes supressores tumorais *P53* e *PRB* estão mutados, sendo que as mutações do gene *P53* podem ocorrer quer precocemente na carcinogénese, quer associadas a metastização e a um fenótipo hormono-independente (Heidenberg *et al.*, 1995; Cooney *et al.*, 1996; Downing *et al.*, 2003). Como já referido, as mutações genéticas e a amplificação do recetor do androgénio podem influenciar o crescimento celular descontrolado e a resistência à apoptose em doentes com cancro da próstata (Culig *et al.*, 1993; Koivisto *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1997; Paule, 2005).

O crescimento do tumor caraterizado pela proliferação celular exagerada requer um maior consumo de oxigénio, contribuindo para a condição de hipóxia, isto é, reduzida concentração de oxigénio nas células que carateriza o microambiente dos tumores sólidos (Kizaka-Kondoh *et al.*, 2011). Por outro lado, o aumento de tamanho do tumor condiciona um défice de aporte sanguíneo às células tumorais o que é contrariado pela formação de novos vasos sanguíneos, a angiogénese (Klaunig *et al.*, 2010). Para a formação de neovasos é necessária a participação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF). A expressão destes fatores é aumentada pela ação do fator induzido de hipóxia 1 (HIF-1) (Singh *et al.*, 2011). No cancro da próstata o VEGF apresenta-se também como um fator indutor de proliferação celular e da linfangiogénese. De acordo com Li e colaboradores (2004) a sua expressão encontra-se sobre regulada nesta neoplasia. Para além da angiogénese, a capacidade de migração celular, invasão tecidual e evasão à resposta imunitária do hospedeiro, são condições fundamentais para que ocorra a metastização do tumor (Klaunig *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011). A invasão celular requer a degradação da matriz celular através da ação proteolítica de metaloproteinases (MMP) (Civetta e Civetta, 2011). Reis e colaboradores (2011) observaram, em tecido de cancro da próstata, sobre expressão de MMP-9 sugerindo uma possível participação

das MMP-9 durante a carcinogénese. Adicionalmente, encontraram uma relação entre o aumento de PSA e a sobre regulação da MMP-9.

Para a migração celular contribui a diminuição da função das moléculas de adesão celular como as integrinas e as caderinas (Drivalos *et al.*, 2011). As células perdem o contacto célula-célula e adquirem um fenótipo mesenquimal e migratório, o que resulta no aumento da mobilidade celular e do potencial invasivo (Tanno e Matsui, 2011).

As células malignas também escapam ao controlo imunológico através da produção de moléculas imunossupressoras como o TGF- β , alteração da expressão de antigénios de superfície com perda ou redução da expressão de moléculas do complexo major de histocompatibilidade 1 (Duray *et al.*, 2010), e ausência da proteína B7, necessária para que haja uma apresentação adequada do complexo aos linfócitos citotóxicos CD8 (Civetta e Civetta, 2011).

1.8 Associação entre hábitos tabágicos e a carcinogénese da próstata

Apesar da exposição das células da próstata aos PAHs constituir um fator de risco para o desenvolvimento do cancro da próstata, e destes compostos se encontrarem presentes no fumo do tabaco, não é consensual uma relação causa-efeito entre os hábitos tabágicos e o desenvolvimento desta neoplasia. Os estudos desenvolvidos por Lotufo e colaboradores (2000) e Rohrmann e colaboradores (2007), não evidenciaram uma associação estatisticamente significativa entre o tabagismo e a incidência, e mortalidade do cancro da próstata. Por outro lado, Plaskon e colaboradores (2003) observaram uma relação causa-efeito entre os hábitos tabágicos e o risco de desenvolvimento de cancro da próstata. A associação foi encontrada em

fumadores ativos à data do diagnóstico, em indivíduos com hábitos tabágicos prolongados por mais de quarenta anos, ainda que os tenham cessado à data do diagnóstico, e em fumadores expostos a mais de 40 UMA, ou seja a uma carga tabágica, traduzida pelo número de unidades maço/ano (UMA). De acordo com o estudo, estes indivíduos apresentam um risco de doença aumentado em 40 a 60% relativamente aos não fumadores.

Alguns trabalhos evidenciaram uma associação entre o aumento da mortalidade por cancro da próstata em indivíduos fumadores (Hickey *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2008), comparativamente aos que nunca fumaram, aquando do diagnóstico de cancro da próstata, em homens com idade inferior a 65 anos (Gong *et al.*, 2008). O Health Professionals Follow-Up Study evidenciou que, homens com uma carga tabágica superior ou igual a 15 UMA, tinham maior risco de desenvolver doença avançada e maior probabilidade de morrer por cancro da próstata do que os não fumadores (Giovannucci *et al.*, 1999). Observou-se ainda uma associação entre os hábitos tabágicos e o desenvolvimento clínico de doença mais agressiva, reforçando a ideia de que o tabaco poderá influenciar o decurso da doença, nomeadamente, através da aquisição de um fenótipo tumoral mais agressivo (Plaskon *et al.*, 2003).

Como mencionado, estudos em linhas celulares de cancro da próstata demonstraram que os PAHs poderão aumentar a produção de metaloproteinases, sugerindo a sua influência na metastização (Haque *et al.*, 2005). Em linhas celulares de cancro da tiróide, os PAHs evidenciaram um efeito indutor da proliferação (Kobayashi *et al.*, 2005).

Pelo exposto, o fumo do tabaco apresenta uma ação carcinogénea em resultado do seu potencial mutagénico.

1.9 Influência de polimorfismos genéticos em enzimas detoxificadoras

O cancro da próstata é, como referido, uma doença multifatorial, condicionada pela ação de inúmeras variáveis. Neste sentido, o risco em fumadores poderá estar dependente da associação a outros fatores de risco, como a capacidade de metabolização e eliminação de substâncias tóxicas presentes no fumo de cigarro (Rybicki *et al.*, 2006).

Muitos destes compostos, uma vez no organismo, são metabolizados, no fígado, num processo de duas fases. A fase I envolve a ativação do composto pró-carcinogénico pelas enzimas codificadas pela superfamília de genes do citocromo P450 (CYP) (Taioli, 2008) seguindo-se a fase II. Nesta, os carcinogénicos são transformados em elementos hidrofílicos para facilitar a sua excreção. A GST é, em grande parte, responsável por este processo (Taioli, 2008). A GST é capaz de catalisar a biotransformação, por conjugação com o glutatião, de metabolitos ativados como o benzo(a)pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido (BPDE), resultante do benzo(a)pireno, permitindo a sua eliminação. Uma vez desativado, o composto fica impedido de se ligar ao ADN e de formar adutos (Nebert e Vasiliou, 2004). Desta forma, a GST protege a célula da ação dos PAHs sobre o genoma.

Várias isoformas de GST podem ser encontradas nas células prostáticas, nomeadamente, α , β , η e π , sendo esta última a mais abundante (GSTP1). A GSTP1 é expressa nas células basais do epitélio prostático normal (Nelson *et al.*, 2003), mas não na maioria das células de cancro da próstata, devido à hipermetilação que ocorre nos ilhéus CpG da sequência reguladora do gene (Lin *et al.*, 2001; Meiers *et al.*, 2007). A variabilidade genética interindividual relativamente à atividade da GSTP1 encontra-se associada à existência de polimorfismos, relacionados com a troca de uma adenina por uma guanina na posição 313 do gene. Daqui resulta a substituição de

uma valina por uma isoleucina no codão 105, designado por GSTP1 Ile105/Ile o que confere maior atividade enzimática de acordo com Board e colaboradores (1989). Este fenótipo foi já associado quer ao aumento (Autrup *et al.*, 1999; Gsur *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2004; Rybicki *et al.*, 2006) quer à diminuição de risco de cancro da próstata (Harries *et al.*, 1997; Wadelius *et al.*, 1999). De acordo com Mao e colaboradores (2004), o genótipo Ile 105/Ile encontra-se fortemente associado a maior risco para desenvolver cancro da próstata em indivíduos fumadores. No entanto, Rybicki e colaboradores (2006) sugerem que os indivíduos portadores do polimorfismo GSTP1 Ile 105Val, expostos ocupacionalmente aos PAHs apresentam maior risco de cancro da próstata. Este polimorfismo também foi associado à suscetibilidade para o desenvolvimento precoce da doença, isto é, em indivíduos com idade inferior a 60 anos, fumadores, ou com história familiar de cancro da próstata.

A ação de GSTP1 relativamente aos compostos presentes no fumo de cigarro foi ainda evidenciada por Nelson e colaboradores (2001), num estudo efetuado em linhas celulares de cancro da próstata (LNCaP), modificadas para expressarem GSTP1. Após exposição destas células a PhIP, uma amina aromática heterocíclica, observou-se menor formação de adutos de ADN comparativamente a células não modificadas.

Nock, e colaboradores (2006) estudaram a participação do gene funcional *GSTM1* relacionado com detoxificação de metabolitos resultantes dos PAHs e analisaram as variantes polimórficas do *GSTM*. Os autores verificaram que, os indivíduos fumadores portadores do alelo correspondente à variante *null deletion*, que conduz à perda total da enzima, apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento do cancro da próstata, em oposição aos portadores do fenótipo *nondeleted*. Outros estudos, indicam que os indivíduos fumadores que expressam a

enzima GSTT1, ou seja uma variante que também conduz a perda total da enzima, apresentam maior risco de cancro da próstata (Kelada *et al.*, 2000; Komiya *et al.*, 2005).

De acordo com o anteriormente referido, o fumo do tabaco é também indutor da produção de ROS. Além disso, diversas defesas antioxidantes como a Mn-SOD, desempenham um papel ativo no combate às ROS. Choi e colaboradores (2007) estudaram a associação entre a presença de um ou mais polimorfismos destas enzimas e o risco de cancro da próstata, não tendo encontrado qualquer associação, mesmo nos fumadores com maior carga tabágica. No entanto, noutros estudos observou-se maior do risco de cancro da próstata em indivíduos com a variante Mn-SOD Ala-16-Val a qual se encontra relacionada com um transporte menos eficaz da enzima para a mitocôndria, sobretudo no grupo de homens com carcinoma de elevado grau (Woodson *et al.*, 2003).

Outro trabalho mostrou uma associação entre cancro da próstata e o genótipo Mn-SOD AA em homens que foram fumadores e/ou com genótipo de acetilador rápido para a N-acetil transferase (NAT1) (Iguchi *et al.*, 2009). Esta enzima ativa aminas aromáticas e heterocíclicas presentes no tabaco. O perfil de acetilador rápido da NAT1 (NAT1R) parece estar associado a uma maior formação de metabolitos derivados das aminas heterocíclicas e aromáticas, expondo os seus portadores, que sejam fumadores, a maiores quantidades dos referidos compostos. Wang e colaboradores (1999) concluíram que este genótipo constitui um fator de risco em indivíduos fumadores.

Assim, e uma vez não sendo consensual a relação entre o desenvolvimento do cancro da próstata e o tabaco, torna-se necessário esclarecer a possível interação entre os PAHs e o stresse oxidativo no processo de carcinogénese da próstata. Contudo, não podemos esquecer que diversas

evidências sugerem que a relação entre o tabagismo e o desenvolvimento do cancro da próstata poderá ser influenciada pelo património genético individual.

1.10 Resistência ao tratamento

Os androgénios são necessários para a manutenção da homeostasia entre a proliferação e a apoptose das células da glândula prostática com referido (Gelman, 2002). Sendo o cancro da próstata geralmente dependente dos androgénios, na fase inicial do seu desenvolvimento, a estratégia da ablação androgénica, ainda hoje mantida como terapêutica do cancro da próstata, assumiu importância clínica tal no início da sua divulgação, que valeu a Huggins, o prémio Nobel da Medicina (Denis e Griffiths, 2000; Wilson e Crawford, 2006; Walsh, 2012).

No entanto, as células neoplásicas poderão adaptar-se a reduzidas concentrações de androgénios resultando na progressão do tumor hormono-dependente para um estágio hormono-independente ou hormono-refratário (Isaacs e Isaacs, 2004).

Alguns estudos sugerem que alterações genéticas e funcionais do AR podem influenciar o crescimento celular descontrolado e a resistência à apoptose em doentes com cancro da próstata contribuindo para a resistência à terapêutica (Giovanucci *et al.*, 1997; Debes e Tindal, 2004; Paule, 2005).

A radioterapia, está também indicada no tratamento do cancro da próstata e assenta no princípio da indução de níveis elevados de ROS sobre as células neoplásicas, com a finalidade de induzir lesão oxidativa e consequente morte (Haimovitz-Friedman, 1998). No entanto, as células de metástase de cancro da próstata, apresentam frequentemente resistência a esta terapêutica tendo

sido demonstrado *in vitro* por Makarovskiy e colaboradores (2002). Alguns autores, justificam esta resposta celular com base na capacidade de adaptação do sistema antioxidante, como o aumento do GSH (Coffey, 2000). A dificuldade de controlo da doença metastizada observa-se também no tratamento com quimioterapia em que o docetaxel é o fármaco de eleição. Este composto pertence à família dos taxanos, e atua através da sua ligação à subunidade IV da tubulina, induzindo desta forma a estabilização de microtúbulos, o que resulta no atraso do ciclo celular na fase G2/M, inibição da mitose e indução da apoptose (Menter *et al.*, 2000; Husbeck *et al.*, 2005; Reagan-Shaw *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2009).

1.11 Objetivos

Objetivos gerais:

Pretende-se com este trabalho contribuir para uma melhor compreensão do papel do stresse oxidativo e do tabaco, no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata. Além disso, esperamos contribuir para a identificação de biomarcadores moleculares preditivos do prognóstico e avaliar de que forma a modulação do stresse oxidativo poderá constituir uma nova abordagem terapêutica para esta neoplasia.

Para a concretização desta proposta de trabalho foram sistematizados os seguintes objetivos recorrendo a estudos *in vivo* e *in vitro*:

Estudos *in vivo*:

1. Caracterizar o stresse oxidativo, em particular, níveis de oxidação de biomoléculas, defesas antioxidantes e NO, em sangue periférico de indivíduos sem doença neoplásica conhecida ou outra patologia prostática, em participantes com hiperplasia benigna da próstata, com prostatite e em doentes com cancro da próstata localizado e metastizado.

2. Avaliar a influência dos hábitos tabágicos nos níveis de stresse oxidativo e a sua participação na progressão da doença, através de estudos, em sangue periférico de indivíduos sem doença neoplásica conhecida ou outra patologia prostática e em doentes com cancro da próstata localizado e com doença avançada, fumadores e não fumadores.

3. Estudar a participação de outras variáveis indutoras de stresse oxidativo, como os hábitos alcoólicos e a gordura corporal (avaliada pelo índice de massa corporal - IMC) na progressão da doença e no stresse oxidativo, analisadas em sangue periférico.

4. Avaliar a relação entre variantes polimórficas de genes envolvidos na metastização, nomeadamente, do *VEGF*, com o stresse oxidativo e a progressão do cancro da próstata.

Estudos *in vitro*:

5. Caracterizar o stresse oxidativo, em particular a produção de ROS, defesas antioxidantes e lesão oxidativa nas linhas celulares representativas das diferentes etapas da progressão da doença,

nomeadamente, na linha RWPE1, isolada de epitélio prostático humano não neoplásico, HPV10, isolada de cancro localizado e PC3, isolada de metástase óssea.

6. Avaliar o efeito da modulação do stresse oxidativo como estratégia terapêutica, através da indução da diminuição de defesas antioxidantes, recorrendo à utilização de dietil maletato e à associação de selenito de sódio (indutor da diminuição da razão GSH/GSSG) e docetaxel (composto usado na quimioterapia do cancro da próstata).

7. Estudar a participação da mitocôndria na produção de ROS, e a sua relação com a progressão do cancro da próstata, através da quantificação do número de mitocôndrias e da atividade dos complexos da cadeia respiratória, nas diferentes linhas celulares.

8. Estudar o efeito de compostos presentes no fumo do tabaco (PAHs) nos níveis de stresse oxidativo e a sua relação com a progressão do cancro da próstata através da avaliação da proliferação celular, e da expressão de moléculas envolvidas na metastização.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção de doentes e controlos

Os doentes e controlos foram selecionados durante as consultas de rotina, em colaboração com o Serviço de Urologia do Instituto Português de Oncologia (IPO) do Centro (Coimbra), o Serviço de Urologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, o Serviço de Urologia do Hospital Militar do Porto, o Serviço de Urologia do Hospital S. João do Porto e o Serviço de Urologia do IPO do Porto, após aprovação pela comissão de ética e a assinatura de um termo de consentimento informado por parte do doente, e explicativo das orientações sobre os objetivos do trabalho de investigação.

Para a população controlo foram selecionados indivíduos sem patologia conhecida, nomeadamente, neoplásica, cardiovascular e/ou neurodegenerativa.

Os doentes foram estudados e selecionados com base em parâmetros clínico-laboratoriais, como, a fase de deteção da doença, fase de desenvolvimento e progressão do tumor (presença ou ausência de metástases), níveis de PSA e índice de massa corporal (IMC). Os controlos foram selecionados mediante exame clínico e laboratorial (PSA) de rotina. Foram também caracterizados os hábitos tabágicos e a ingestão de álcool dos indivíduos participantes.

A população total, consistia numa amostra de 165 indivíduos, dos quais 23 não evidenciavam patologia prostática (controlos) (G1), 6 apresentavam prostatite crónica (G2) e 9 eram portadores de hiperplasia benigna da próstata (BPH) (G3). Dos restantes, 127 eram doentes (G4), dos quais, 104 apresentavam cancro da próstata localizado (G5) e 23 evidenciavam doença avançada (G6). Os estudos de stresse oxidativo em sangue periférico incluíram a avaliação de defesas antioxidantes envolvidas no ciclo de oxidação/redução do GSH, incluindo a determinação dos níveis de glutatião reduzido (GSH) e da atividade das enzimas peroxidase do glutatião (G1-Px) e

redutase do glutatião (GI-Red), bem como a avaliação dos níveis de defesas antioxidantes enzimáticas glutathiona-S-transferase (GST), e das não enzimáticas vitamina A (VIT A), vitamina E (VIT E) e ácido úrico (AU). Estes estudos também abrangeram a determinação do estado de oxidação total (TAS), a análise da lesão oxidativa de proteínas através da quantificação de grupos carbonilo (GC) e da peroxidação lipídica (MDA) e, por fim, a determinação da produção de óxido nítrico (NO·) e de colesterol total (CHL).

A determinação de GSH, TAS, MDA, atividades da GI-Red e da GI-Px foi avaliada na população total. A avaliação de GST, VIT A, VIT E, AU, CHL, GC e NO· foi realizada em 85 indivíduos, dos quais 18 voluntários saudáveis (G1) e 67 portadores de cancro da próstata (G4). Destes participantes, 48 apresentavam adenocarcinoma da próstata localizado (G5) e 19 apresentavam doença avançada (G6).

2.1.1 Isolamento de células sanguíneas

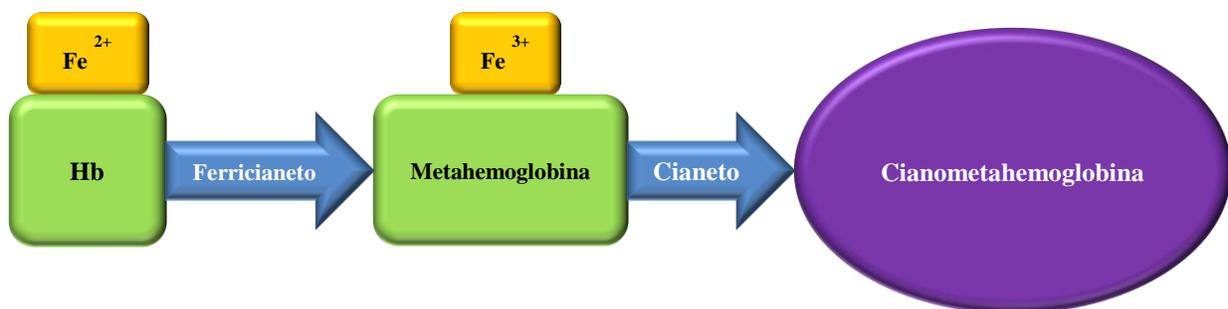
A avaliação do stresse oxidativo em sangue periférico e os estudos genéticos, foram realizados, procedendo-se à colheita de 10mL de sangue periférico por punção venosa em doentes com cancro da próstata e em controlos sem neoplasia. Do volume de sangue retirado, 8mL foram introduzidos num tubo heparinizado para posterior isolamento de eritrócitos e 2mL foram colocados em tubos de colheita com EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*) como anticoagulante, e acondicionados a -20°C, para extração e análise de ADN.

O isolamento de eritrócitos foi realizado a 4°C por centrifugação do sangue a 600xg, durante 10 minutos. Após recolha do plasma, a fração eritrocitária foi lavada 3 vezes com cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% (p/v) por centrifugação, como previamente descrito. O concentrado de eritrócitos

foi ressuspenso em NaCl a 0,9% (p/v), tendo-se ajustado a concentração de hemoglobina a 100g/L, de acordo com a metodologia que irá ser descrita em 2.1.2. Seguidamente, a fração eritrocitária bem como o plasma foram distribuídos por alíquotas, e armazenados a -80°C para a avaliação de parâmetros de stresse oxidativo, nomeadamente os níveis de vitamina A e E, a atividade enzimática da redutase do glutationo (Gl-Red) e da peroxidase do glutationo (Gl-Px), a concentração de glutationo reduzido (GSH) e de glutathione-S-transferase (GST), o estado de antioxidação total (TAS), os níveis de peroxidação lipídica, de oxidação proteica, de óxido nítrico, de ácido úrico (AU) e de colesterol total (CHL).

2.1.2 Análise quantitativa da concentração de hemoglobina

A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada a partir de um método desenvolvido por Dacie e Lewis (1984) baseado no princípio da oxidação da Hb em cianometahemoglobina, na presença de ferricianeto de potássio e cianeto de potássio (solução de Drabkin) (Sigma Diagnostics). O ferricianeto adicionado ao sangue, oxida o ferro ferroso (Fe^{2+}) da Hb, convertendo-o em ferro férrico (Fe^{3+}), enquanto a Hb é transformada em metahemoglobina. Esta ao reagir com o cianeto forma cianometatoglobina (como representado no esquema seguinte), um composto estável e mensurável a um comprimento de onda de 540nm.



Para quantificar a Hb, adicionaram-se 20 μ L da suspensão de eritrócitos a 5mL de solução de Drabkin (Sigma Diagnostics) composta por 0,45M de ferricianeto de potássio, 4,5mM de cianeto de potássio e 0,25M de fosfato de monopotássio. Após agitação em vortex e incubação à temperatura ambiente, durante 10 minutos, procedeu-se à leitura da densidade ótica das amostras e dos padrões de cianometahemoglobina, preparados em condições idênticas às das amostras, num espectrofotómetro (Shimadzu UV 120-02), a um comprimento de onda de 540nm. A concentração de Hb na amostra, expressa em g/L (g Hb/L), determinou-se por comparação com a curva padrão. Posteriormente, esta concentração foi ajustada a 100g Hb/L, em todas as amostras, com a utilização de NaCl a 0,9% (p/v).

2.1.3 Extração e quantificação de vitamina A e E

A determinação de vitamina A e E foi efetuada em plasma e em eritrócitos de doentes com cancro da próstata e em controlos sem neoplasia.

2.1.3.1 Extração e quantificação de vitamina A e E plasmáticas

A quantificação dos níveis plasmáticos de vitamina A e E foi realizada em simultâneo por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em fase reversa de acordo com os métodos desenvolvidos por Milne e Botnen (1986) e Zaman (1993), com algumas modificações, através da utilização de um produto comercial designado por *Vitamin A/E by HPLC* (BioRad).

Inicialmente procedeu-se à desproteínização e extração da fração lipídica. Para o efeito, a 200µL de plasma adicionou-se igual volume de solução comercial de etanol/n-hexano contendo 1,2 mg/mL de δ-tocoferol como padrão interno (*Vitamin A/E by HPLC*), e agitou-se em vortex, durante 1 minuto. Para a separação de fases adicionaram-se 200µL de sulfato de amónio em metanol (*Vitamin A/E by HPLC*) seguido de agitação, conforme já descrito, e centrifugou-se durante 5 minutos a 10000xg. O sobrenadante límpido foi recolhido para o tubo do auto-injetor modelo 234 Gilson, tendo sido aplicados 20µL de amostra no cromatógrafo equipado com coluna analítica de fase reversa Spherisorb ODSI-5µm, 250 x 4,6mm mantida à temperatura de 45°C, a um débito de 2,5mL/minuto. As vitaminas A e E foram detetadas a um comprimento de 340 e 295 nm, respetivamente, através de um detetor ultravioleta *Model 1801 UV-detector 119*. A identificação das vitaminas A e E foi efetuada por comparação com os tempos de retenção do respetivo padrão interno (retinol e δ-tocoferol), previamente adicionado à amostra. A quantificação das vitaminas foi determinada por avaliação da altura dos picos.

2.1.3.2 Extração e quantificação de vitamina E eritrocitária

A extração de vitamina E eritrocitária foi efetuada de acordo com Graham e colaboradores (1985). A 500 μ L de suspensão de eritrócitos com concentração de Hb previamente ajustada a 100g/L, adicionaram-se 1,5 mL de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) (10 mM) e 2mL de etanol absoluto. A emulsão foi agitada em vortex durante 1 minuto seguindo-se a adição de 2 mL de *n*-hexano e uma nova agitação por mais 3 minutos, para completa separação de fases. O extrato foi centrifugado a 300xg e recolheu-se 1mL da fase superior (*n*-hexano) que foi evaporada até à secura sob corrente de azoto e armazenada a -80°C, para posterior processamento. O extrato lipídico foi retomado com 250 μ l de *n*-hexano imediatamente antes de ser analisado por HPLC de fase reversa, em conformidade com o descrito por Proença (2002). A aplicação desta técnica tem por princípio os estudos de Vatassery e colaboradores (1978). Injetaram-se 20 μ l da amostra em coluna Spherisorb S10w (250 x 4,6 mm), eluída com *n*-hexano, modificado com 0,9% (v/v) de metanol, mantida a um fluxo de 1,5mL/minuto. O cromatógrafo estava equipado com um sistema de injeção automático, modelo 231 da Gilson. A deteção espectrofotométrica em ultravioleta foi realizada a um comprimento de onda de 287nm.

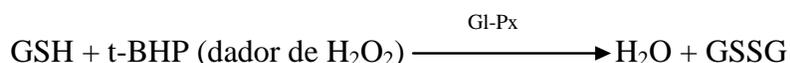
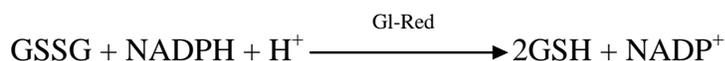
A quantificação da vitamina E foi determinada por comparação das alturas dos picos das amostras e dos padrões obtidos com soluções de δ -tocoferol em *n*-hexano. As concentrações eritrocitárias de vitamina E obtidas, são expressas em nmol/gHb.

2.1.4 Extração e quantificação da atividade de enzimas antioxidantes

As atividades enzimáticas da peroxidase do glutatião (Gl-Px) e da redutase do glutatião (Gl-Red) foram determinadas nos eritrócitos com a concentração de Hb ajustada a 100g/L.

2.1.4.1 Peroxidase do glutatião

As enzimas foram extraídas, a partir de um hemolisado obtido pela adição de 9,5mL de água desionizada a 0,5mL da suspensão de eritrócitos lavados. Para determinar a atividade enzimática da Gl-Px adicionaram-se 0,25mL de uma solução transformante (KCN 4,5 mM, $K_3(Fe(CN)_6)$ 0,45M, KH_2PO_4 , 0,25M), a 0,5mL do hemolisado, seguindo-se uma incubação durante 5 minutos a 37°C com a finalidade de minimizar a atividade da pseudoperoxidase da Hb. Posteriormente, recolheram-se 100µL de amostra para a determinação da atividade da Gl-Px de acordo com o método desenvolvido por Paglia e Valentine (1967) e adaptado por Wendel (1981). O método baseia-se na utilização do tert-butil-hidroperóxido como substrato e na capacidade da Gl-Px para catalisar a reação de transformação do glutatião reduzido (GSH) em glutatião oxidado (GSSG), na presença de peróxidos, envolvendo a participação da enzima redutase do glutatião (Gl-Red) e do fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH), como representado nas seguintes equações:



Assim, foram misturados 100 μ L de amostra com 800 μ L de mistura reacional contendo 100mM de fosfato de potássio (pH 7), 0,1 mM de EDTA, 1mM de GSH, 0,24 U de Gl-Red e 0,25mM de NADPH em hidrogeno carbonato de sódio (0,1%) (p/v). A reação foi iniciada pela adição de 100 μ L de tert-butil hidroperóxido numa concentração final de 1,2 mM. A oxidação do NADPH foi avaliada através da leitura da absorvância a um comprimento de onda de 340nm num espectrofotómetro termostatizado *UVIKON 933 UV/ Visible*, a 37°C. Com a finalidade de evitar a interferência resultante da oxidação espontânea do NADPH, esta foi avaliada na ausência de hemolisado, e subtraída ao valor total. Foi ainda preparado um branco contendo água desionizada em substituição do NADPH, a partir do qual se mediu a absorvância. A atividade enzimática é expressa em unidades internacionais de enzima (U) por grama de Hb (U/gHb). Considera-se uma unidade (1U) como a quantidade de enzima que promove a oxidação de uma mole de NADPH por minuto.

2.1.4.2 Redutase do glutatião

O método de quantificação da atividade da Gl-Red é baseado na capacidade desta enzima catalisar a reação de transformação do GSSG em GSH na presença de NADPH, de acordo com o esquema ilustrado em 2.1.4.1. Para o efeito a atividade da enzima é avaliada através da quantificação do consumo de NADPH a 340nm (Goldberg e Spooner, 1983), num espectrofotómetro termostatizado *UVIKON 933 UV/ Visible*, a 37°C. A atividade da Gl-Red foi expressa em unidades internacionais de enzima por grama de hemoglobina (U/gHb).

As enzimas foram extraídas a partir de um hemolisado obtido pela adição de 0,5mL de água desionizada a 0,5mL da suspensão de eritrócitos lavados seguindo-se uma diluição de 1:8 em NaCl (0,9%)(p/v). Para determinar a atividade enzimática da Gl-Red recolheram-se 100µL de amostra que foram adicionados a mistura reacional contendo 0,5M de di-hidrogeno fosfato de potássio (pH 7,2), 2,2mM de GSSG, 0,5mM de EDTA, 0,38mM de β NADPH em NaHCO₃ (1%) com volume final de 2950µL. A reação foi iniciada pela adição de 50µL de NADPH numa concentração final de 0,16mM. A oxidação do NADPH foi avaliada através da leitura da absorvância a um comprimento de onda de 340nm, num espectrofotómetro termostaticado a 37°C.

2.1.5 Quantificação de glutatião reduzido

A concentração de GSH foi avaliada nos eritrócitos lavados e no plasma dos doentes a 420nm. Para o efeito foi utilizado um *kit* comercial (*OxisResearch, Bioxytech:GSH 420*) provido de solução de precipitação (ácido tricloroacético), tampão (fosfato de potássio, ácido dietileno triamina pentaacético e lubrol) (pH 7,8), solução de redução (Tris(2-carboxietil) fosfina em HCl), cromogénio (1-Metil-4-cloro-7-trifluorometilquinolinio metil sulfato em HCl) e solução *Color Developer* (NaOH em água). Este método é baseado na deteção de tiona corada, a qual é proporcional à concentração de GSH.

O procedimento foi efetuado de acordo com as instruções do fabricante. Preparou-se uma curva padrão com os calibradores fornecidos e o branco (água), para permitir a posterior determinação da concentração de GSH, por extrapolação das densidades óticas.

Para preparação das amostras adicionou-se um volume de 300µL de solução de precipitação a 100µL de eritrócitos e 200µL de plasma, centrifugando-se de seguida a 10 000xg, durante 5

minutos à temperatura ambiente, com posterior recolha de sobrenadante. Posteriormente a 200µL das amostras obtidas, calibradores e branco, adicionou-se igual volume de tampão, de solução de redução, seguindo-se a agitação da mistura. Em seguida, adicionaram-se 200µL de cromogénio repetindo-se a agitação. Por fim, adicionaram-se 200µL de solução *Color Developer*, e incubaram-se as amostras, calibradores e branco, no escuro durante 30 minutos, à temperatura ambiente, para leitura a 420nm.

Os resultados são expressos em µM, ou µmol por grama de hemoglobina (µmol/gHb), consoante a determinação tenha sido realizada no plasma ou nos eritrócitos, respetivamente.

2.1.6 Quantificação de Glutathione-S-Transferase

A determinação de glutathione-S-transferase (GST) nomeadamente, do subgrupo Pi (GST-Pi), foi realizada no plasma de doentes e controlos por espectrofotometria, através do teste de ELISA *Enzyme Immunoassay (EIA)* (Immunodiagnostik), de acordo com as instruções do fabricante, a um comprimento de onda de 450nm. Neste procedimento a GST Pi encontra-se previamente aderente à superfície dos poços da placa de ELISA. Calibradores para a curva padrão e amostras, são incubados com um anticorpo policlonal de Coelho anti GST Pi. A GST Pi presente nos calibradores e nas amostras compete com a GST Pi da superfície dos poços da placa de Elisa pela ligação a um anticorpo anti-coelho. Após um passo de lavagem a deteção da ligação ao anticorpo de coelho é conseguido pela adição de peroxidase de cabra associada a anti-anticorpo de coelho (POD-antibody). A intensidade da cor resultante é quantificada por espectrofotometria e é inversamente proporcional à concentração de GST Pi. Os resultados são expressos em µM de GST.

As amostras de plasma foram centrifugadas a 10 000xg durante 10 minutos. Seguidamente, preparou-se uma mistura contendo 25µL de sobrenadante e 200µL de anticorpo primário de coelho anti GST-Pi, seguida de uma incubação ao longo de 16 horas, a 4°C. Procedeu-se da mesma forma a uma reação de incubação com os reagentes standards fornecidos pelo *Kit*, para obter uma curva padrão. A placa de ELISA foi lavada com solução de lavagem disponibilizada pelo *Kit* e adicionaram-se 100µL das soluções previamente incubadas, aos poços da placa de ELISA. Procedeu-se a uma incubação de 4 horas à temperatura ambiente com agitação num misturador horizontal. No final o conteúdo da placa foi decantado e lavaram-se 5 vezes os poços com 250µL de solução de lavagem EIA. O passo seguinte consistiu na adição de 100µL de peroxidase de cabra marcada com anticorpo anti-coelho a cada poço, seguido de nova incubação durante 45 minutos à temperatura ambiente, com agitação num misturador horizontal. O conteúdo da placa foi decantado e lavado por 5 vezes como descrito. Posteriormente, pipetaram-se 100µl de uma solução de tetrametilbenzidina (TMB) EIA que se adicionaram a cada poço seguindo-se uma incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim, adicionaram-se 50µl de solução *STOP* (EIA) contendo ácido sulfúrico, a fim de cessar a reação cromogénica e procedeu-se à leitura da placa de ELISA a um comprimento de onda de 450nm.

2.1.7 Avaliação do estado de antioxição total

O estado de antioxição total (TAS) foi determinado no plasma, de acordo com um método colorimétrico (Randox Laboratories Crumham's, North Ireland) sob a designação de *Total Antioxidant Status*, com adaptações. Este método é baseado na capacidade dos antioxidantes

plasmáticos inibirem a formação do radical catiónico ABTS⁺ (2,2'-azino-di- (3-etilbenzotiazolina sulfonato)), mensurável a 600nm.

Para o efeito adicionaram-se 20µL de plasma a 1mL de tampão fosfato 80mM (pH 7,4), contendo metamioglobina 6,1µM e ABTS 610µM. Posteriormente homogeneizou-se e mediu-se a absorvância inicial, A₁ a 600nm em espectrofotómetro UVIKON 933-UV/Visible, termostatizado e computadorizado. Seguidamente adicionaram-se 200µL de substrato constituído por 100µM de H₂O₂ em tampão fosfato 48mM (pH 7,4) e procedeu-se rapidamente à homogeneização da amostra. Seguiu-se a leitura de absorvância, a 37°C, durante 3 minutos, que se designou de segunda leitura (A₂). Desta forma foram analisadas as variações de absorvância (ΔA) considerando-se: $\Delta A = A_2 - A_1$.

Efetuuou-se o mesmo procedimento para preparar o ensaio do branco, substituindo o plasma por água ultra pura. Uma vez que o branco não possui capacidade antioxidante o valor encontrado para a sua ΔA , foi subtraído a todas as amostras (Proença, 2002). No final os resultados são expressos em mM de TAS.

2.1.8 Avaliação do grau de lipoperoxidação

A peroxidação lipídica foi realizada no plasma e nos eritrócitos de doentes e controlos. A lesão oxidativa de lípidos foi avaliada através da formação de ácido tiobarbitúrico (TBA), um aduto de malonilaldeído (MDA), posteriormente separado por cromatografia líquida de alta resolução, HPLC (Draper e Hadley, 1990; Knight *et al.*, 1998).

Para o efeito, 250µL de amostra foram fervidas durante 60 minutos com igual volume de água desionizada e de ácido fosfórico 0,44M, juntamente com 500µL de TBA 42mM. Posteriormente,

procedeu-se à desproteinização com 500µL de etanol/NaOH 1M (10:1) seguido de centrifugação a 300xg durante 10 minutos. Injetaram-se 20µL do sobrenadante em coluna de HPLC Gilson, fluxo de 1ml/minuto, equipado com coluna analítica Spherisorb 5µm ODS₂ (250 x 4,6mm), detetor UV-Vis e injetor automático de amostras modelo 234 Gilson.

A eluição decorreu com uma solução de tampão de fosfato de potássio a 60% (v/v) na concentração de 50mM a pH 6,8 e metanol a 40% (v/v) (Sarmiento-Ribeiro, 2000; Proença, 2002).

Os adutos de TBA-MDA foram detetados a 532nm e quantificados através da extrapolação da área dos picos da curva de calibração a partir das soluções standard de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) sujeitos a tratamento idêntico ao das amostras. Os resultados são expressos em µM ou µmol/g Hb de MDA consoante a determinação tenha sido realizada no plasma ou nos eritrócitos, respetivamente.

2.1.9 Avaliação da oxidação proteica

A oxidação proteica plasmática foi realizada através da quantificação de grupos carbonilo (GC) das proteínas resultantes da fragmentação e oxidação de grupos amina. Estes reagem com a 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) originando hidrazonas, mensuráveis por espectrofotometria a 360nm (Baldeiras *et al.*, 2010).

O procedimento teve início com a indução de uma reação de precipitação com HCl. Para cada amostra considerou-se um branco respetivo. Desta forma partiu-se de um volume de 400µl de plasma, que se separou em duas partes iguais, tratando o branco com 1mL de HCl 2M e a

amostra para teste com 1mL de DNPH 1mM em HCl. Agitou-se em vortex e incubou-se durante 90 minutos, a 37°C. Após arrefecimento adicionou-se 1mL de ácido tricloroacético (28%)(p/v) e procedeu-se a nova homogeneização por agitação em vortex. Posteriormente efetuou-se uma centrifugação a 3000xg durante 10 minutos rejeitando-se o sobrenadante. O precipitado foi sujeito a lavagem por adição de 1mL de etanol/acetato de etilo (1:1) e conseqüente agitação em vortex. Repetiu-se o passo de lavagem e ressuspendeu-se o precipitado em 1mL de guanidina-HCl 6M seguindo-se nova centrifugação. O sobrenadante foi retirado para leitura espectrofotométrica, subtraindo-se posteriormente o valor de absorvância do branco ao da respetiva amostra. Os resultados obtidos são expressos em concentração (μM) de GC.

2.1.10 Quantificação dos níveis plasmáticos de colesterol

Os níveis plasmáticos de colesterol foram determinados em conformidade com o descrito por Proença (2002), através de um teste colorimétrico enzimático que utiliza reagentes comercializados pela Chemelex, sob a designação de *Cholesterol-Enzymatic Colorimetric Test (CHOD-PAP)*. Este teste baseia-se na hidrólise e posterior oxidação do colesterol com formação de quinonas, de acordo com as seguintes reações:

- 1) Éster de colesterol + H_2O \rightarrow colesterol + ácidos gordos, reação catalisada pela esterase do colesterol
- 2) Colesterol + O_2 \rightarrow colesterol-4-ene-3-ona + H_2O_2 , reação catalisada pela oxidase do colesterol
- 3) $2\text{H}_2\text{O}_2$ + fenol + 4aminofenazona \rightarrow quinonimina + H_2O , catalisada pela peroxidase

Para o efeito a 10µL de plasma adicionou-se 1mL de reagente contendo oxidase do colesterol (300U/mL), peroxidase (1250U/mL), esterase do colesterol (300U/mL) e fenol 26mM. A mistura foi homogeneizada e incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente.

A formação de quinonimina é avaliada pela determinação da absorvância a 505nm num espectrofotómetro Shimadzu UV-120-02.

Posteriormente calculou-se a razão Vitamina E/Colesterol.

2.1.11 Avaliação de óxido nítrico

Os níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO·) foram determinados através de um método espectrofotométrico utilizando o teste *Nitric Oxide Colorimetric Assay* (Roche) que quantifica a presença de nitrito e nitratos, resultantes da oxidação de NO· (Baldeiras *et al.*, 2010). No presente ensaio o nitrato é reduzido a nitrito pela NADPH na presença da enzima redutase do nitrato.

Nitrato + NADPH+H⁺ → Nitrito + NADP⁺ + H₂O, reação catalisada pela redutase do nitrato.

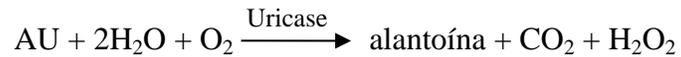
O nitrito formado reage com sulfanamida e diclorido de N-(1-naftil)-etilenodiamina originando um composto diazo de cor vermelha, mensurável a 550 nm, de acordo com a seguinte reação:

Nitrito + sulfanamida + diclorido de N-(1-naftil)-etilenodiamina → diazo vermelho

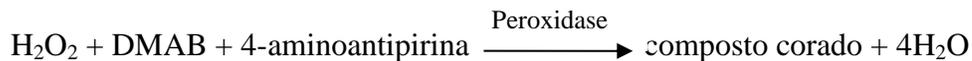
Para o efeito procedeu-se à ultrafiltração da amostra através da adição de 300µL da mesma a igual volume de fosfato de potássio, seguindo-se a aplicação da solução resultante numa membrana (e.g., 10000 MWCO) (Sartorius, Vivascience) para ultracentrifugação a 1250xg, durante 45 minutos, a 20°C. Paralelamente às amostras foi preparado um branco e uma curva padrão a partir de soluções padronizadas de nitrato incluídas no *Kit*. Posteriormente adicionaram-se 50µL de *Reaction mixture 2* (tampão fosfato de potássio a pH 7,5, 0,5 mg de NADPH e 0,01mg de FAD) do teste, a 500µL do filtrado, das soluções padronizadas, e do branco, seguindo-se uma homogeneização por vortex. Após um minuto, adicionaram-se 20µL de *Solution 3* (contendo 4U de redutase do nitrato) e homogeneizou-se novamente. Posteriormente, procedeu-se a uma incubação a 20°C durante 30 minutos. Decorrido este tempo aplicaram-se 150µL da solução de reação a poços de placa de ELISA, com posterior adição de 75µL de *Color Reagent I* (sulfanamida), seguido da adição de 75µL de *Color Reagent II* (diclorido de N-(1-naftil)-etilenodiamina). Realizou-se uma homogeneização por agitação horizontal, durante 5 minutos, a 20°C e procedeu-se à leitura das absorvâncias, tendo por base a determinação das concentrações a partir da curva padrão e a subtração do valor do branco a todas as leituras. Os resultados foram expressos em termos de concentração (µM) de nitritos e nitratos conjuntamente.

2.1.12 Quantificação dos níveis de ácido úrico plasmático

Para a determinação dos níveis de ácido úrico (AU) no plasma reproduziu-se um protocolo descrito por Proença (2002), baseado na utilização de um método enzimático comercializado pela Sclavo que assenta no princípio da redução do AU a alantoina por ação da uricase, com libertação de peróxido de hidrogénio, de acordo com a seguinte equação:



A quantidade de H_2O_2 formada é proporcional ao AU e quantificada pela presença de um composto corado (ver equação seguinte).



Desta forma adicionaram-se 10 μl de plasma a 1mL de tampão fosfato, contendo ácido dimetil-amino-benzóico (DMAB) 1mM, peroxidase de concentração superior ou igual a 1000U/mL, uricase superior ou igual a 40U/mL, 4-aminoantipirina 0,05mM e azida de sódio 0,1 g/L como conservante. Após homogeneização e incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente procedeu-se à leitura espectrofotométrica a 550nm, usando como branco o próprio reagente. Simultaneamente foi preparada uma solução padrão de AU 0,355mM e, por comparação das densidades óticas foi calculada a concentração plasmática de AU na amostra.

2.1.13 Análise genotípica das variantes polimórficas -634G > C do *VEGF*

2.1.13.1 Extração e amplificação do ADN genómico

O ADN genómico das células mononucleares do sangue periférico foi extraído pela técnica de adsorção em matriz de sílica utilizando o protocolo de extração da QIAGEN, de acordo com as

instruções do fabricante. Esta metodologia baseia-se na capacidade de adsorção dos ácidos nucleicos a formulações de sílica, de modo dependente do pH e da concentração salina, permitindo a obtenção de amostras de ADN de elevada pureza e integridade física (Gonçalves, 2010).

Desta forma, colocaram-se 200µL de amostra de sangue, armazenada em tubo de colheita com EDTA, num *eppendorf* estéril de 1,5mL, juntamente com 20µL de proteinase e 200µL de tampão de lise (tampão AL). Posteriormente, procedeu-se à incubação a 56°C, durante 10 minutos, invertendo-se o tubo a cada 2 minutos para homogeneizar a mistura. De seguida adicionaram-se 200µL de etanol a 100% (v/v), transferindo-se posteriormente para uma coluna NucleoSpin Blood seguido de centrifugação a 8000xg durante 1 minuto. Após centrifugação, colocou-se a coluna num novo tubo, rejeitando o sobrenadante. Seguiu-se a adição de 500µl de tampão do *kit* designado por AW1 e de AW2, intercalados por centrifugação a 14000xg, durante 3 minutos. Por último, incubou-se o ADN durante 1 minuto à temperatura ambiente com 200µL de tampão AE, tendo sido recolhido por centrifugação a 8000xg e guardado a -20°C, até posterior utilização. A concentração de ADN nas amostras foi determinada através da leitura em espetrofotómetro a 260nm.

Para a determinação da frequência das variantes polimórficas -634G > C do VEGF recorreu-se ao método de *Restritivo Fragmento Light Polimorfismo – Polimerase Chin Reaction* (RFLP-PCR) descrito por Sfar e colaboradores (2006). Após o isolamento de ADN procedeu-se à amplificação do fragmento de 470 pares de base do gene do VEGF humano, com o código de acesso NM_001025366.1 (GenBank). Para o efeito os *primers* utilizados na reação de PCR foram sintetizados pela Bioron, sendo as sequências de nucleótidos 5' – TTGCTTGCCATTCCCCACTTGA – 3' e 5' – CCGAAGCGAGAACAGCCCAGAA – 3',

correspondentes aos primers *Forward* e *Reverse*, respetivamente. Para a reação de PCR foram utilizados 200ng de ADN genómico, 0,5µM de cada um dos *primers*, *PCR buffer complete* (160mM de (NH₄)₂SO₄, 670mM de Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% de Tween-20 e 25mM MgCl₂), 100µM de dNTP e 0,5U de *Taq DNA polimerase* (Bioron), num volume final de 20µL.

O programa de PCR consistiu num primeiro passo de desnaturação a 96°C durante 2 minutos, seguindo-se 34 ciclos com passos de 30 segundos a 96°C, 40 segundos a 61°C e 40 segundos a 72°C, com uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. Foi utilizado como controlo negativo uma reação de PCR sem ADN, sendo substituído por igual volume de água estéril. O fragmento amplificado foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v), imerso em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), a 120V com um tempo de corrida de 45 minutos, e corado com brometo de etídio (AppliChem), na concentração final de 4g/mL.

2.1.13.2 Digestão enzimática por RFLP

O fragmento de ADN amplificado por PCR foi tratado com a enzima de restrição *BsmFI* (BioLabs) durante 1 hora a 65°C. A digestão enzimática ocorre pelo reconhecimento da seguinte sequência nucleotídea:



Na reação da digestão foram utilizados 15 µL de ADN, NEBuffer 4 suplementado com 100 µg/mL de BSA e 0,5 µL de enzima, num volume final de 50 µL. O resultado da digestão foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v). O alelo -634G foi cortado em 2 fragmentos de 196 bp e 274 bp contrariamente ao alelo -634C que não sofreu digestão

enzimática (470 pb). Os produtos resultantes do PCR foram sequenciados, utilizando os *primers forward e reverse* da reação de PCR.

Para assegurar a validação do protocolo descrito procedeu-se previamente à sequenciação de uma amostra de ADN, representativa de cada uma das variantes polimórficas, -634G > C do VEGF, no Laboratório de Sequenciação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

2.2 Caraterização do modelo experimental de linhas celulares de cancro da próstata

Neste estudo estabeleceu-se um modelo *in vitro* que pudesse representar as várias etapas da carcinogénese da próstata. Para o efeito os estudos *in vitro* foram realizados em três linhas celulares, uma isolada de epitélio prostático humano normal, as células RWPE1 (Bello *et al.*, 1997) e duas linhas celulares obtidas de células de cancro da próstata, nomeadamente, a linha celular HPV10, isolada de cancro localizado (Weijerman *et al.*, 1994), e a linha celular PC3, isolada de metástase óssea (Kaighn *et al.*, 1979). As linhas celulares foram obtidas através da American Type Culture Collection (ATCC) e mantidas em cultura nas condições ótimas de crescimento.

2.2.1 Manutenção das culturas de linhas celulares

As linhas celulares RWPE1 e HPV10 foram mantidas em cultura em meio de queratinócitos

(Keratinocytes medium) (Gibco), suplementado com 5ng/mL de fator de crescimento epidermal humano recombinante (rEGF) (Gibco) e 0,05mg/mL de extrato de pituitária bovino (BPE) (Invitrogen, formely Gibco-BRL). A linha celular PC3 foi mantida em cultura em meio RPMI 1640 (Sigma) enriquecido com 10 % (v/v) de soro fetal bovino inativado (FBS) (Biochrom) e 2 mM de L-glutamina (Sigma). Ambos os meios foram suplementados com 100U/mL de Penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 5µg/mL de canamicina (Sigma). As células foram mantidas numa incubadora humidificada com 5% de CO₂, a 37°C em frascos de cultura de 25 ou 75 cm² ou em placas de cultura com 6 a 24 compartimentos, de acordo com a quantidade de células necessária.

Tratando-se de células aderentes, para proceder à maior parte dos ensaios e para a manutenção das culturas celulares, foi necessário destacá-las da superfície de crescimento. A separação foi realizada com tripsina. Assim, para destacar as células, aspirou-se o meio de cultura, o qual se lavou com PBS (tampão fosfato salino). Em seguida adicionou-se tripsina-EDTA (Gibco) (0,05%) (p/v) numa quantidade correspondente a 1/6 do volume do meio de incubação e colocaram-se as células na incubadora a 37°C, durante 2 minutos. Nos frascos contendo as células PC3, procedeu-se à inibição da tripsina, fazendo uso do FBS. Desta forma, adicionou-se um volume de RPMI 1640 (Sigma) enriquecido com 10 % (v/v) de FBS, que era triplo do volume de tripsina. No entanto, para a inativação da tripsina presente nos frascos com as células HPV10 e RWPE1, foi necessária a preparação prévia do inibidor da tripsina (Soybean Tripsin Inhibitor), o qual se esterilizou por filtração através de membrana de acetato de celulose com poro de 0,45µm e foi adicionado num volume três vezes superior ao volume da tripsina. Posteriormente, todas as células foram colhidas e lavadas duas vezes com PBS por centrifugação a 300xg durante cinco minutos.

2.2.2 Incubação das linhas celulares com os compostos selecionados

Ao longo do trabalho, as linhas celulares foram incubadas com diferentes compostos, de acordo com o estudo em causa. Desta forma as células foram tratadas com indutores de stresse oxidativo (peróxido de hidrogénio (Sigma), dietilmaleato (DEM) (Sigma) e selenito de sódio (Sigma)), fármacos anticancerígenos (docetaxel) (Taxotere, Aventis) e carcinogéneos presentes no fumo de tabaco (PAHs (pireno, benzo(a)pireno, criseno e benzo(k)fluoranteno) (Sigma Aldrich)). O docetaxel foi dissolvido em 13% de etanol e os PAHs, foram dissolvidos em dimetilsulfoxido (DMSO). No final as culturas tratadas com PAHs continham 1% (v/v) de DMSO e as culturas tratadas com docetaxel continham uma percentagem de etanol inferior a 0,1% (v/v).

Para os diversos ensaios, as linhas celulares RWPE1 e HPV10 foram incubadas com uma densidade de 5×10^5 células/mL, enquanto para a linha celular PC3 se optou por uma densidade de 3×10^5 células/mL. Nestas condições as células foram incubadas ao longo de 24 horas. Decorrido este período de tempo, as células foram lavadas através da eliminação do meio de cultura e respetiva substituição.

Posteriormente, adicionou-se o composto pretendido, nomeadamente, peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (10nM a $500\mu M$), dietil maleato (DEM) ($50\mu M$), docetaxel (5 a $500nM$), selenito de sódio (10nM a $10\mu M$) ou poliaromáticos cíclicos (PAHs) (10nM a $1\mu M$). As incubações com os compostos decorreram por períodos de 24, 48 e 72 horas.

2.2.3 Análise da morfologia celular

A morfologia das células foi analisada por microscopia ótica após realização de esfregaços de células e coloração dos mesmos com corante de *May-Griuenwald-Giemsa*, utilizando um microscópio Nikon Eclipse, equipado com câmara digital Nikon Digital Camera, acoplado a *software* Lucia.

Os esfregaços foram preparados a partir da recolha de células obtidas como descrito em 2.2.1. O concentrado de células foi ressuspenso em FBS. Obtido o esfregaço, as células foram coradas com solução de *Griuenwald* preparada na altura da utilização (em 0,3% (v/v) de metanol e diluída na proporção de 1:1 com água destilada), seguida de coloração em solução de *Giemsa* (1g de corante *Giemsa*, em 132mL de solução final, contendo glicerol e metanol na razão de 1:1, e posteriormente diluída 8 vezes com água destilada, na altura da utilização). Após lavagem com água destilada, os esfregaços foram secos ao ar e a morfologia das células foi analisada por microscopia ótica (Sarmiento-Ribeiro, 2000).

2.2.4 Estudos de proliferação e morte celular

2.2.4.1 Análise da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada por espectrofotometria através do ensaio colorimétrico de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico) (Sigma), baseado no princípio da redução do sal de tetrazólio amarelo em cristais de formazan de cor púrpura, por

ação de desidrogenases presentes maioritariamente nas mitocôndrias das células viáveis (Alley *et al.*, 1998). Desta forma, no final de cada período de incubação de 24, 48 ou 72 horas, foi aspirado o meio de cultura das células tratadas e respetivos controlos, seguindo-se a lavagem das mesmas com PBS (Gibco). Este foi posteriormente aspirado e substituído por MTT, na concentração de 0,5mg/mL, suplementado com 1mM de CaCl₂ (Sigma). As células foram incubadas a 37°C, durante 2 horas. Os cristais de formazan originados foram dissolvidos em HCl 0,04M preparado em isopropanol. A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 570nm (Freitas *et al.*, 2011). Os resultados obtidos representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.4.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo, assenta no princípio da variação da quantidade de ADN ao longo das diversas fases do ciclo celular (G0/G1, S, G2 e M). Os resultados de citometria traduzem-se na obtenção de um histograma no qual é possível a identificação de três grupos distintos de células, sendo, um com menor conteúdo em ADN, que corresponde ao pico G0/G1 do histograma e outro com maior conteúdo em ADN, com uma fluorescência dupla do primeiro e que corresponde às células em fase G2/M. Entre ambos, existe uma população intermédia de células correspondente às células em fase de síntese (S) (Figura 2.1) (Sarmiento-Ribeiro, 2000).

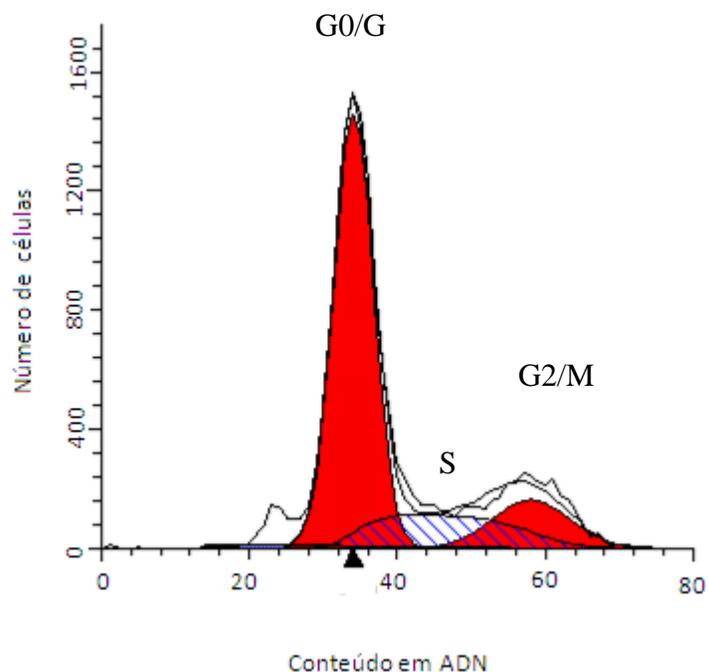


Figura 2.1 - Histograma representativo do ciclo celular. O primeiro pico corresponde ao grupo de células com menor quantidade em ADN e que se encontram em fase G0/G1. O segundo pico evidencia uma quantidade de ADN, com uma fluorescência dupla do primeiro e corresponde às células em fase G2M. Entre estes existe um grupo de células com uma densidade de ADN intermédia e corresponde às células em fase de síntese (S).

O conteúdo em ADN é visualizado através da marcação prévia deste com a sonda fluorescente, iodeto de propídio (Sarmiento-Ribeiro, 2000). Esta técnica baseia-se na capacidade do iodeto de propídio se intercalar na estrutura de ADN, e quando excitado com luz de comprimento de onda de 480nm, emitir fluorescência com um máximo de emissão a 620nm (Sarmiento-Ribeiro, 2000). A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de ADN ligado tornando possível avaliar o conteúdo celular em ADN.

Para o efeito, obteve-se uma quantidade de 1×10^6 células tratadas com os compostos em estudo, e respetivos controlos (células sem tratamento), conforme o procedimento descrito em 2.2.1. As células foram posteriormente incubadas com 1mL de uma solução para marcação de ADN (Cytognos), contendo iodeto de propídio, detergente para permeabilização celular e RNase. Prosseguiu-se o protocolo de acordo com as instruções do fabricante, incubando as células no

escuro, à temperatura ambiente, durante 10 minutos, em posição horizontal. Após este período as células foram imediatamente analisadas por citometria de fluxo, num citómetro de fluxo FACScalibur. A percentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular foi calculada utilizando um programa ModFit LT V2.0. Os resultados obtidos representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.4.3 Análise da viabilidade e morte celular por citometria de fluxo utilizando a marcação dupla com anexina V e iodeto de propídio

A viabilidade e o tipo de morte celular foram analisados por citometria de fluxo através da marcação das células com anexina V em combinação com iodeto de propídio. Esta técnica permite distinguir células viáveis de células não viáveis, e entre estas as que se encontram em apoptose e/ou necrose. Contudo, não distingue as células que se encontram em apoptose tardia daquelas que evoluíram para necrose (Sarmiento-Ribeiro, 2000).

A apoptose é caracterizada pela alteração da distribuição assimétrica dos fosfolípidos da bicamada lipídica. A fosfatidilserina, um fosfolípido de carga negativa que normalmente se localiza no folheto interno da membrana celular, sofre externalização durante o processo apoptótico, mantendo-se contudo a integridade da membrana celular. A anexina V é uma molécula com elevada afinidade para fosfolípidos de carga negativa, como a fosfatidilserina, ligando-se especificamente a esta na presença de cálcio (Ca^{2+}). Desta forma permite fazer a distinção entre células em apoptose e células em necrose (Sarmiento-Ribeiro, 2000). As células em necrose caracterizam-se pela perda de integridade da membrana, tornando-se permeáveis ao iodeto de propídio, que ao intercalar-se nas moléculas de ADN permite a identificação das células em

necrose. A marcação simultânea com anexina V e iodeto de propídio, permite distinguir as células apoptóticas que coram para a anexina, mas não para o iodeto de propídio. As células em apoptose tardia e/ou em necrose coram para ambos os fluorocromos, enquanto, que as células viáveis não coram por nenhum dos corantes (Sarmiento-Ribeiro, 2000).

Após 24 horas de incubação recolheram-se 1×10^6 células tratadas e respectivos controles correspondentes quer às células não viáveis, presentes no sobrenadante, quer às células viáveis, aderentes à superfície de crescimento. Estas últimas foram recolhidas de acordo com o procedimento descrito em 2.2.1, até à fase de inibição da tripsina, tendo-se posteriormente adicionado as células em suspensão no meio, e procedido à lavagem conjunta de toda a população, com PBS por centrifugação a $1000 \times g$, durante 5 minutos.

Posteriormente, recolheram-se 1×10^5 células que foram ressuspensas em $100 \mu\text{l}$ de tampão de ligação (0,025M de CaCl_2 , 1,4M de NaCl e 0,1M de tampão hepes), contendo $5 \mu\text{L}$ de anexina-V marcada com a sonda fluorescente alofococianina (APC) e $2 \mu\text{L}$ de iodeto de propídio $3 \mu\text{M}$ (PI) (Invitrogen-Molecular Probes). De seguida, as amostras foram incubadas no escuro à temperatura ambiente, durante 15 minutos, de acordo com as instruções do fabricante e imediatamente analisadas no citómetro FACScalibur (Becton Dickison), provido de um *software* próprio para o efeito “*Cellquest and Paint-a-gate software*” (BD Bioscience) (Freitas *et al.*, 2011). Para o estudo, foram colhidas 10 000 células. Os resultados obtidos representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.4.4 Análise da expressão de moléculas envolvidas na morte celular por citometria de fluxo

Para avaliar a expressão das proteínas envolvidas na morte celular por apoptose, nomeadamente das proteínas BAX, BCL-2, Caspase 3 e Citocromo C, recorreu-se à citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais marcados com sondas fluorescentes.

Desta forma, 1×10^6 células tratadas nas condições do estudo, e respetivos controlos, foram isoladas de acordo com o descrito na secção 2.2.4.3. e posteriormente permeabilizadas e fixadas com 250 μ L de uma solução *Cytofix–Cytoperm* (Kit, Cytofix/Cytoperm, Pharmigen) (R&D systems), durante 20 minutos a 4°C. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com solução de lavagem, Perm/Wash diluída de 1:1 com água desionizada (Kit, Cytofix/Cytoperm, Pharmigen), por centrifugação a 300xg durante 5 minutos. Em seguida as células foram incubadas com os respetivos anticorpos e lavadas duas vezes com solução PBS por centrifugação durante 5 minutos a 300xg e ressuspensas em 0,5mL deste tampão.

Para a deteção da razão BAX/BCL-2 marcaram-se as células com 2 μ g do anticorpo monoclonal anti-BAX (Santa Cruz Biotechnology) e 1 μ g do anticorpo monoclonal anti-BCL-2 (Pharmingen (BD) conjugados diretamente com ficoeritrina (*PE*) e isotiocianato de fluoresceína (*FICT*), respetivamente. Posteriormente as células foram incubadas no escuro à temperatura ambiente, durante 15 minutos.

Para avaliar a expressão de caspase, as células foram marcadas com 2 μ g de anticorpo anti-caspase, combinado com ficoeritrina (pharmingen (BD)) seguindo-se um período de incubação de 45 minutos no escuro à temperatura ambiente. A marcação com citocromo C, foi efetuada tratando as células com 0,5 μ g de anticorpo primário anti-citocromo C (Santa Cruz), durante 15

minutos no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente as células foram marcadas com 0,5 μ g de anticorpo monoclonal secundário combinado com a sonda fluorescente, ficoeritrina.

Após lavagem com PBS por centrifugação durante 5 minutos a 300xg as células foram ressuspensas em 500 μ l do mesmo tampão para análise imediata por citometria de fluxo, num citómetro FACScalibur, provido de um *software* próprio *Cellquest and Paint-a-gate software* (BD Bioscience). Para o estudo, foram colhidas 10 000 células. Os resultados obtidos são expressos em Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) e representam a média mais ou menos (\pm) um desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes (Freitas *et al.*, 2011).

2.2.4.5 Análise do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial $\Delta\psi_{mit}$ foi avaliado por citometria de fluxo através da utilização da sonda fluorescente 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol carbocianina iodada (JC1) (Cell Technology).

A sonda JC1 desenvolvida por Cossarizza e colaboradores (1993) é um catião lipofílico que atravessa as membranas biológicas acumulando-se no interior da mitocôndria polarizada. No entanto, quando ocorre diminuição do $\Delta\psi_{mit}$, correspondente a despolarização da membrana mitocondrial, a sonda permanece no citoplasma sob a forma monomérica (M) emitindo fluorescência ao comprimento de onda de 527nm após excitação a 490nm. Com o aumento do $\Delta\psi_{mit}$, os monómeros da sonda entram para o interior da mitocôndria formando agregados (A), que emitem fluorescência detetada ao comprimento de onda de 590nm. Desta forma a variação de $\Delta\psi_{mit}$, pode ser traduzida pela razão entre M/A.

Neste ensaio, 5×10^5 células obtidas em conformidade com o descrito em 2.2.1, foram ressuspensas em 0,5 mL de reagente de solução 1x JC-1 (Molecular Probes Invitrogen) com 1 μ L de JC1, numa concentração final de 5 μ g/mL de JC1. As células foram incubadas durante 15 minutos, a 37°C com 5% de CO₂, ao abrigo da luz. De seguida, as células foram lavadas com PBS por centrifugação durante 5 minutos a 300xg e ressuspensas em 0,5 mL de tampão de ensaio e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. Para o estudo, foram colhidas 10 000 células. Os resultados obtidos representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.5 Estudos de stresse oxidativo em linhas celulares

2.2.5.1 Preparação de lisados celulares

Após 24 horas de incubação das células com os compostos em estudo, estas foram lavadas com PBS por aspiração do meio de incubação, substituição com PBS e respetiva aspiração. Em seguida, as células foram destacadas da superfície aderente por raspagem, e ressuspensas em 1mL de PBS. Posteriormente as células foram submetidas a 3 pulsos de sonicação (Bandelin Sonorex) de 10 segundos cada, no gelo, com um minuto de intervalo entre cada ciclo.

2.2.5.2 Quantificação de proteína

Imediatamente após a obtenção dos lisados celulares procedeu-se à determinação da concentração de proteína através do método do ácido bicinconínico *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. Após a quantificação proteica, os lisados celulares foram guardados a -80°C.

2.2.5.3 Avaliação da atividade enzimática da peroxidase do glutatião e da redutase do glutatião

A atividade da **peroxidase do glutatião (Gl-Px)** foi determinada a partir de um volume de 0,5mL de lisado celular de concentração proteica conhecida, incubado com 0,25mL de uma solução transformante (KCN 4,5mM, $K_3(Fe(CN)_6)$ 0,45M, KH_2PO_4 0,25M), prosseguindo-se com o procedimento previamente descrito em 2.1.4.1. A atividade enzimática é expressa em unidades internacionais de enzima por grama de proteína (U/g prot). Os resultados obtidos representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes (Freitas *et al.*, 2012b).

A atividade da **redutase do glutatião (Gl-Red)** foi determinada nos lisados celulares obtidos em conformidade com o descrito na secção 2.2.5.1. Para determinar a atividade enzimática da Gl-Red, a 100 μ L de lisado celular adicionou-se uma mistura reacional contendo 0,5M de di-hidrogeno fosfato de potássio (pH 7,2), 2,2mM de GSSG, 0,5mM de EDTA, 0,38mM de β

NADPH em NaHCO₃ (1%) prosseguindo-se o ensaio de acordo com o procedimento descrito em 2.1.4.2.

A atividade enzimática é expressa em unidades internacionais de enzima por grama de proteína (U/g prot) (Freitas *et al.*, 2012b). Os resultados obtidos representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.5.4 Quantificação de glutatão reduzido e de Glutathione-S-Transferase

A concentração de **glutatão reduzido (GSH)** foi avaliada em 200 μ L de lisado celular obtido de acordo com o descrito na secção 2.2.5.1 e posteriormente sujeitos ao mesmo tratamento das amostras analisadas na secção 2.1.5 (Freitas *et al.*, 2012b).

Os resultados obtidos são expressos em μ mol de GSH por grama de proteína (μ mol/g prot) e representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

A determinação de **glutathione-S-transferase (GST)** nomeadamente, do subgrupo Pi (GST-Pi), foi realizada nos lisados celulares sujeitos ao mesmo tratamento das amostras analisadas na secção 2.1.6 (Freitas *et al.*, 2012b).

Os resultados são expressos em μ mol de GST por grama de proteína (μ mol/g prot) e representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.5.5 Estado de antioxição total

O estado de antioxição total (TAS) foi determinado, nos lisados celulares, através do método descrito na secção 2.1.7 (Freitas *et al.*, 2012b). Os resultados são expressos em μmol de TAS por grama de proteína ($\mu\text{mol/g}$ proteína) e representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.5.6 Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada nas linhas celulares a partir dos lisados obtidos em conformidade como descrito na secção 2.2.5.1. sendo os lisados celulares sujeitos ao mesmo tratamento das amostras analisadas na secção 2.1.8.

Os resultados são expressos em μmol de MDA por grama de proteína ($\mu\text{mol/g}$ proteína) e representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.5.7 Análise da produção de espécies reativas de oxigénio

A determinação da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) intracelulares foi baseada na marcação das células com as sondas fluorescentes 2',7' - diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma) e dihidroetídeo (DHE) para deteção de peróxidos (H_2O_2) e anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), respetivamente. A deteção foi efetuada por citometria de fluxo recorrendo ao

equipamento já descrito anteriormente. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.5.8 Determinação da produção de peróxidos

A concentração de peróxidos intracelulares, nos lisados celulares, foi determinada por citometria de fluxo de acordo com Freitas e colaboradores (2012b). Para o efeito, 5×10^5 células foram marcadas com $5 \mu\text{M}$ da sonda DCFH-DA (Sigma) de acordo com adaptações aos procedimentos descritos por Rothe e Valet (1990). Desta forma, após marcação das células com a sonda, procedeu-se à incubação durante 1 hora a 37°C , no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS por centrifugação a $300 \times g$, durante 5 minutos. As células foram ressuspensas em $0,5 \text{ mL}$ de PBS e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. Esta metodologia é baseada na desacetilação de DCFH-DA a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) por esterases intracelulares e consequente oxidação no composto fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF). A fluorescência emitida, após excitação a 488 nm , é captada a 525 nm , sendo proporcional aos níveis intracelulares de peróxidos (Halliwell, 1985).

2.2.5.9 Determinação da produção de anião superóxido

A produção intracelular de anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) foi determinada por citometria de fluxo com recurso à sonda DHE. Para o efeito, 5×10^5 células previamente lavadas com PBS por

centrifugação a 300xg durante 5 minutos, foram incubadas durante 10 minutos no escuro, à temperatura ambiente, com 5µM de DHE (Sigma-Aldrich), preparado em dimetil sulfoxido (DMSO) a 1mM. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS por centrifugação conforme descrito anteriormente. As células foram ressuspensas em 0,5mL de PBS e imediatamente analisadas por citometria de fluxo.

A DHE atravessa as membranas celulares e é convertida no composto fluorescente de cor vermelha, maioritariamente, por ação do O^{2*} . O etídio intercala-se no ADN, permanecendo no interior da célula. Uma pequena percentagem de oxidação pode ser resultante da ação de outras ROS e espécies radicalares como o H_2O_2 , $ONOO^-$ ou ácido hipocloroso (HOCl) (Xiang *et al.*, 2009; Gonçalves, 2010).

2.2.6 Análise da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial por espectrofotometria

Para avaliar a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, I, II+III (redutase do succinato-citocromo C, SCCR) e da sintase do citrato, recorreu-se à espectrofotometria de duplo comprimento de onda, baseada na oxidação dos respetivos substratos (Sarmiento-Ribeiro, 2000).

As linhas celulares foram submetidas a um ciclo de congelamento durante 20 minutos em gelo seco seguido de descongelamento, para lise das membranas e precipitação. Para o efeito, utilizaram-se cerca de 2×10^6 células de cada linha celular, as quais foram obtidas por raspagem da superfície de crescimento do frasco de cultura. As células foram recolhidas para um volume de 200µl de meio de homogeneização (0,25M de sacarose e 5mM de HEPES-Na a pH 7,4).

A atividade do complexo IV foi avaliada tendo por base o método descrito por Wharton e Tzagoloff (1967). Este complexo enzimático utiliza o citocromo C reduzido como substrato para a sua oxidação, sendo a reação monitorizada a 550nm numa solução contendo fosfato de sódio 0,1M a pH 7, dodecil maltosídeo 1,25mM, um detergente que permite a deteção da velocidade máxima do complexo, de ferricianida de potássio 0,1M e citocromo C 50 μ M. Como a enzima é rapidamente inibida pelo citocromo C oxidado, a velocidade de reação tende a diminuir, pelo que a atividade do complexo pode ser calculada a partir da velocidade inicial pseudo linear ou calculando a velocidade de 1ª ordem para a reação de oxidação deste complexo enzimático (Sarmiento-Ribeiro, 2000).

A atividade do complexo II+III foi avaliada através da quantificação da redução do citocromo C após a adição de succinato num meio contendo 10mM de fosfato monopotássico, a pH 7,4 e EDTA 2 mM, utilizando um comprimento de onda de 550nm. Para evitar o efeito inibitório do oxaloacetato na atividade da desidrogenase do succinato, o ensaio foi feito na presença de rotenona, um inibidor do complexo I. A rotenona reduz a formação de oxaloacetato a partir de malato obtido a partir do fumarato durante a oxidação do succinato.

A inibição dos complexos II e III foi feita pela presença de antimicina A.

A atividade da sintase do citrato, uma enzima da matriz mitocondrial, que catalisa a reação de formação de citrato a partir de oxaloacetato e acetil CoA, foi determinada tendo por base a deteção da densidade ótica de 5-tio-2-nitrobenzoato. Este composto é quantificado a 412nm e formado pela reação da acetil CoA com o reagente 5,5'-ditio-2-ácido nitrobenzóico (DTNB). A atividade da enzima foi avaliada após a adição de oxaloacetato a meio Tris de pH 8 contendo acetil CoA, DTNB e Triton-X100.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados a 37°C e os resultados são expressos em Unidades/mg proteína ou Unidades/atividade de citrato sintase e representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.7 Avaliação da expressão de HIF-1 α e VEGF

Para avaliar a expressão dos fatores HIF-1 α e VEGF, envolvidos na metastização, recorreu-se à citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais marcados com sondas fluorescentes.

Para a detecção da expressão de HIF-1 α e VEGF, as linhas celulares, foram incubadas nas condições ótimas de crescimento já referidas, em normóxia e em hipóxia. Para criar o ambiente de hipóxia, as células tratadas e não tratadas com os compostos foram cultivadas com 100 μ M de cloreto de cobalto (CoCl₂). Posteriormente, 1x10⁶ células obtidas como anteriormente descrito, foram permeabilizadas e fixadas com 250 μ L de uma solução *Cytofix–Cytoperm* (Kit, Cytofix/Cytoperm, Pharmigen) (R&D systems), durante 20 minutos a 4°C.

Em seguida as células foram lavadas duas vezes com solução de lavagem, *Perm/Wash* diluída de 1:1 com água desionizada (Kit, Cytofix/Cytoperm, Pharmigen), por centrifugação a 300xg durante 5 minutos. Em seguida as células foram incubadas com os respectivos anticorpos e lavadas duas vezes com solução PBS. Para a marcação com VEGF adicionaram-se 10 μ L de uma solução *stock* de 25 μ g/mL de anticorpo monoclonal anti-VEGF humano, conjugado diretamente com a sonda fluorescente ficoeritrina, durante 45 minutos, no escuro à temperatura ambiente. Para a detecção de HIF-1 α , as células foram marcadas com 10 μ L de anticorpo monoclonal de rato anti-HIF-1 α e incubadas durante 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. As células foram lavadas como anteriormente referido e marcadas com 10 μ L de uma solução *stock* a 25 μ g/mL de

anticorpo anti-rato conjugado com ficoeritrina seguindo-se uma incubação de 20 minutos, no escuro, à temperatura ambiente.

As células foram ressuspensas em 500µL do mesmo tampão e analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur *Cellquest*) através do *software Paint-a-gate* (BD Bioscience). Para o referido estudo foram analisadas 10 000 células por ensaio. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.8 Tratamento estatístico

Para a comparação entre médias de grupos com variáveis de distribuição normal recorreu-se ao teste T-student e ANOVA, consoante se tratasse da comparação entre dois ou mais grupos, respetivamente. Para a análise de variáveis não paramétricas recorreu-se ao teste de Kruskal Wallis e Mann Whitney.

A avaliação do coeficiente de correlação de *Spearman's rho* foi utilizado para analisar a relação entre os parâmetros estudados.

Para os estudos de polimorfismos genéticos recorreu-se ao teste exato de Fisher a fim de avaliar o risco relativo (*Odd's Ratio-OD*).

Para todos os testes estatísticos considerou-se o nível de significância a 95% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Estudos em sangue periférico de doentes e controlos

3.1.1 Avaliação do stresse oxidativo em doentes com cancro da próstata – Influência na progressão da doença

A participação do stresse oxidativo na etiopatogenia e progressão do cancro da próstata foi avaliada pela análise de defesas antioxidantes plasmáticas, nomeadamente, os níveis de glutatião reduzido (GSH), glutathione-S-transferase (GST), ácido úrico (AU), vitaminas A e E (VIT A e VIT E, respetivamente), pela determinação dos níveis de defesas antioxidantes eritrocitárias como do GSH e da VIT E, pela análise da atividade de defesas antioxidantes enzimáticas, nomeadamente, da redutase do glutatião (Gl-Red) e da peroxidase do glutatião (Gl-Px), pela avaliação do estado de antioxidação total (TAS), pela determinação de marcadores de lesão oxidativa como o malonilaldeído (MDA) plasmático e o eritrocitário, grupos carbonilo (GC), e ainda pela quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO·) e de colesterol (CHL).

A população total, consistia numa amostra de 165 indivíduos, dos quais 23 não evidenciavam patologia prostática (controlos) (G1), 6 apresentavam prostatite crónica (G2) e 9 eram portadores de hiperplasia benigna da próstata (BPH) (G3). Dos restantes, 127 eram doentes com cancro da próstata (CaP) (G4), dos quais, 104 apresentavam cancro da próstata localizado (G5) e 23 evidenciavam doença avançada (G6). A determinação de GSH, TAS, MDA, atividades da Gl-Red e da Gl-Px foi avaliada na população total. A avaliação de GST, VIT A, VIT E, AU, CHL, GC e NO· foi realizada em 85 indivíduos, dos quais 18 voluntários saudáveis (G1) e 67

portadores de cancro da próstata (G4). Destes, 48 apresentavam adenocarcinoma da próstata localizado (G5) e 19 apresentavam doença avançada (G6).

Tabela III.1.1 - Características clínico-laboratoriais dos indivíduos representativos do grupo controlo (sem doença maligna, ou outra patologia prostática) e do grupo de doentes com cancro da próstata

	Controlo (G1) (n=18)	Cancro da próstata (G4) (n=67)	p
Idade ao diagnóstico (anos) *	76,0 (65,8-80,0)	71,0 (65,0-75,0)	0,124
PSA ao diagnóstico (ng/mL) *	4,0 (2,0-8,5)	9,9 (6,0-17,1)	0,001
IMC (kg/m²) **	28,0±3,3	27,5±2,8	0,528
Score de Gleason			
< 7	--	25 (61,0%)	--
≥ 7	--	16 (39,0%)	--
Estádio clínico			
Localizado	--	45 (73,8%)	--
Avançado	--	16 (26,2%)	--

Os grupos do estudo incluem: Controlos – G1 - (sem neoplasia ou outra patologia prostática) e doentes com cancro da próstata – G4.

*Resultados apresentados como mediana (intervalo interquartil): comparação entre grupos através do teste Mann-Whitney; **Resultados apresentados como média ± desvio padrão: comparação entre grupos através do teste-t.

Sempre que possível procedeu-se à caracterização clínico-laboratorial dos homens participantes neste estudo, a qual está representada nas tabelas III.1.1 e III.1.2. Entre os diferentes grupos estudados, não se observam diferenças significativas relativamente à idade e índice de massa corporal (IMC). No entanto, e como seria de esperar, os doentes com cancro da próstata (G4) apresentam valores de PSA significativamente superiores em relação ao grupo controlo (G1) (Tabela III.1.1). Além disso, no grupo com doença avançada (G6), o PSA é significativamente

superior quando comparado com o grupo de doentes com cancro localizado (G5) (Tabela III. 1.2) e com o grupo controlo (G1). No entanto, não se observaram diferenças significativas entre os grupos representativos de prostatite (G2) e BPH (G3), comparativamente ao grupo controlo (G1) e ao grupo representativo de cancro da próstata metastizado (G6) (resultados não apresentados).

Tabela III.1.2 - Características clínico-laboratoriais dos indivíduos representativos do grupo de doentes com cancro da próstata localizado e com doença avançada

	Cancro da próstata		p
	Localizado (G5) (n=48)	Avançado (G6) (n=19)	
Idade ao diagnóstico (anos) *	71,0 (65,0-76,0)	67,0 (65,0-73,0)	0,186
PSA ao diagnóstico (ng/mL) *	9,0 (6,0-15,0) ⁺	32,5 (9,0-63,0) ^{&#}	
IMC, kg/m² **	27,3±3,0	28,0±2,2	0,552

Os grupos do estudo incluem doentes: G5 - com cancro da próstata localizado e G6 - com cancro da próstata avançado.

*Resultados apresentados como mediana (intervalo interquartil): comparação entre grupos através do teste Kruskal Wallis. Controlos vs CaP localizado (⁺P=0,004), Controlos vs CaP avançado ([&]P<0,0001) e CaP localizado vs CaP avançado ([#]P=0,003), calculados através do teste Mann Whitney.

**Resultados apresentados como média ± desvio padrão: comparação entre grupos através da análise por ANOVA fatorial.

Os resultados de stresse oxidativo evidenciados na tabela III.1.3 representam as defesas antioxidantes envolvidas no ciclo de oxidação/redução do glutatião, nomeadamente, a atividade das enzimas Gl-Px e Gl-Red e os níveis de GSH, nos diferentes grupos do estudo (G1 - sem neoplasia ou outra patologia prostática, G2 - portadores de prostatite crónica, G3 - portadores de hiperplasia benigna da próstata, (BPH), G4 - doentes com cancro da próstata, G5 - doentes com cancro da próstata localizado e G6 - doentes com cancro da próstata em fase avançada).

Tabela III.1.3 - Avaliação de defesas antioxidantes envolvidas no ciclo de oxidação/redução de GSH e representação de TAS e da peroxidação lipídica em doentes com cancro da próstata e em controlos

Grupos de Estudo	Defesas antioxidantes envolvidas na oxidação/redução de GSH e TAS					Peroxidação lipídica	
	Marcadores Eritrocitários			Marcadores Plasmáticos		MDA (µM)	MDA (µmol/gHb)
	Defesas Enzimáticas		Defesas não enzimáticas		TAS (mM)		
Gl-Px (mU/gHb)	Gl-Red (mU/gHb)	GSH (µmol/gHb)	GSH (µM)				
⁺ G1 (sem patologia prostática) (n=23)	7,5 ±3,5	5,6 ±1,8	4,9 ±1,5	33,4 ±10,2	1,3 ±0,4	1,8 ±0,6	0,09 ±0,07
[§] G2 (prostatite) (n=6)	⁺ 5,2 ±3,6	5,6 ±1,4	5,2 ±1,5	⁺ 26,3 ±3,9	1,4 ±0,2	1,8 ±0,4	0,11 ±0,09
[#] G3 (BPH) (n=9)	⁺⁺ 4,1 ±3,4	5,8 ±2,4	5,8 ±2,4	^{++§§} 47,7 ±17,5	1,3 ±0,3	^{+#} 1,5 ±0,5	⁺ 0,14 ±0,07
G4 (Cancro da próstata) (todos) (n=127)	[#] 6,3 ±3,6	5,7 ±1,9	5,2 ±1,8	^{##} 35,6 ±15,0	1,2 ±0,7	[#] 1,9 ±0,6	[#] 0,08 ±0,07
[†] G5 (Cancro localizado) (n=104)	^{###} 6,4 ±3,6	5,8 ±2,7	5,3 ±1,8	^{###} 36,1 ±15,8	1,3 ±0,1	^{##} 2,0 ±1,0	[#] 0,08 ±0,07
G6 (Cancro avançado) (n=23)	^{+#} 5,9 ±3,4	5,6 ±1,8	^{#†} 4,6 ±1,7	^{++++###†††} 26,7 ±10,0	^{++§#†} 1,0 ±0,4	[#] 1,8 ±0,5	[#] 0,09 ±0,05

Os grupos do estudo incluem: Controlos - G1 (sem neoplasia ou outra patologia prostática), G2 - (portadores de prostatite crónica) e G3 - (portadores de hiperplasia benigna da próstata, BPH); Doentes – G4 - (doentes com cancro da próstata), G5 - (doentes com cancro da próstata localizado) e G6 - (doentes com cancro da próstata avançado). Os resultados obtidos representam a média ± desvio padrão dos valores encontrados para os diferentes parâmetros de stresse oxidativo. Glutatião reduzido (GSH), peroxidase do glutatião (Gl-Px), redutase do glutatião (Gl-Red), malonilaldeído (MDA) e estado de antioxição total (TAS). As diferenças significativas encontradas são consideradas para ⁺p<0,05, ⁺⁺p<0,01 e ⁺⁺⁺p<0,001 relativamente ao grupo G1; [§]p<0,05, e ^{§§}p<0,01 relativamente ao grupo G2; [#]p<0,05, ^{##}p<0,01 e ^{###}p<0,001, relativamente ao grupo G3, [†]p<0,05, ^{††}p<0,001, relativamente ao grupo G5.

O estado de antioxidação total designado por TAS e a lesão oxidativa de biomoléculas, particularmente, da peroxidação lipídica determinada através da quantificação dos níveis de malonilaldeído (MDA), estão também representados. De uma forma geral este estudo revela que as alterações de stresse oxidativo no cancro da próstata são mais acentuadas na fase de doença avançada. Assim, nos indivíduos com cancro metastizado (G6), é de salientar uma diminuição significativa do TAS ($1,0 \pm 0,4 \text{mM}$) relativamente a todos os grupos estudados, nomeadamente, G1 ($1,3 \pm 0,4 \text{mM}$), G2 ($1,4 \pm 0,2 \text{mM}$), G3 ($1,3 \pm 0,3 \text{mM}$) e G5 ($1,3 \pm 0,1 \text{mM}$). Esta alteração é, em parte, acompanhada de diminuição de defesas antioxidantes que participam diretamente no ciclo de oxidação/redução de GSH. Assim, observa-se diminuição significativa de GSH plasmático ($26,7 \pm 10,0 \mu\text{M}$) comparativamente ao encontrado para G1 ($33,4 \pm 10,2 \mu\text{M}$), G3 ($47,7 \pm 17,5 \mu\text{M}$) e G5 ($36,1 \pm 15,8 \mu\text{M}$). A nível eritrocitário também se observa diminuição significativa de GSH ($4,6 \pm 1,7 \mu\text{mol/gHb}$), comparativamente ao grupo de doentes com cancro localizado (G5) ($5,3 \pm 1,8 \mu\text{mol/gHb}$) e ao grupo com BPH (G3) ($5,8 \pm 2,4 \mu\text{mol/gHb}$). Além disso, ocorre diminuição significativa da atividade da Gl-Px ($5,9 \pm 3,4 \text{mU/gHb}$) relativamente ao grupo sem neoplasia ou outra doença prostática (G1) ($7,5 \pm 3,5 \text{mU/gHb}$). A diminuição de defesas antioxidantes nos doentes com cancro em fase avançada não se restringe àquelas que participam diretamente no ciclo de oxidação/redução de GSH. Neste grupo (G6) também se observa diminuição de VIT A ($1,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$) comparativamente ao grupo controlo (G1) ($2,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$) e ao grupo com cancro da próstata localizado (G5) ($2,4 \pm 1,3 \mu\text{M}$), bem como uma tendência para a diminuição de GST (Tabela III.1.4). Apesar da diminuição de TAS e das defesas antioxidantes referidas, não se observou aumento significativo da lesão oxidativa de biomoléculas (MDA e GC) (Tabelas III.1.3 e III.1.4). Porém, a análise de $\text{NO}\cdot$ revelou aumento nos indivíduos com cancro da próstata em fase avançada ($10,4 \pm 4,7 \mu\text{M}$) relativamente aos indivíduos do grupo

controlo (G1) ($7,7 \pm 3,1 \mu\text{M}$) (Tabela III.1.4). Embora o aumento de $\text{NO}\cdot$ apresente significado estatístico ($p < 0,05$) apenas no grupo de doentes com cancro metastizado (G6), também evidencia valores mais elevados no grupo com doença localizada (G4) ($9,8 \pm 5,9 \mu\text{M}$) sugerindo o seu aumento progressivo durante a evolução do cancro da próstata (Tabela III.1.4).

Tabela III.1.4 - Avaliação dos níveis plasmáticos e eritrocitários de defesas antioxidantes e de lesão oxidativa em doentes com cancro da próstata e em controlos

Grupos de Estudo	Defesas antioxidantes					Lesão oxidativa e $\text{NO}\cdot$		
	Plasmáticas					Eritrocitárias		
	GST (ng/ml)	VIT A (μM)	VIT E (μM)	VITE/ CHL	AU (mM)	VIT E (nmol/gHb)	GC (μM)	$\text{NO}\cdot$ (μM)
⁺ G1 (sem patologia prostática) (n=18)	190 $\pm 44,5$	2,2 $\pm 0,7$	27,0 $\pm 12,8$	4,5 $\pm 1,4$	0,3 $\pm 0,1$	365,0 ± 180	204,0 $\pm 3,7$	7,7 $\pm 3,1$
[†] G5 (Cancro localizado) (n=48)	173,4 $\pm 51,3$	2,4 $\pm 1,3$	26,4 $\pm 7,3$	4,9 $\pm 1,2$	0,3 $\pm 0,2$	316,2 ± 186	211,0 $\pm 37,6$	9,8 $\pm 5,9$
G6 Cancro avançado (n=19)	167 $\pm 37,7$	^{+,†} 1,8 $\pm 0,5$	27,5 $\pm 6,0$	5,4 $\pm 0,8$	0,3 $\pm 0,1$	361,0 ± 186	198,8 $\pm 27,7$	⁺ 10,4 $\pm 4,7$

Os grupos do estudo incluem: Controlo – G1 (sem neoplasia ou outra patologia prostática) e Doentes – G5 (doentes com cancro da próstata localizado) e G6- (doentes com cancro da próstata avançado). Os resultados obtidos representam a média \pm desvio padrão dos valores encontrados para os diferentes parâmetros de stresse oxidativo. Os parâmetros de stresse oxidativo incluem glutationa-S-transferase (GST), vitamina A (VIT A), vitamina E (VIT E), razão vitamina E/colesterol (VIT E/CHL), ácido úrico (AU), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e grupos carbonilo (GC). Os resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores encontrados. As diferenças significativas são consideradas para ⁺ $p < 0,05$ relativamente ao grupo controlo (G1) e para [†] $p < 0,05$ relativamente ao grupo com cancro localizado (G5).

Para além do $\text{NO}\cdot$ existem outros parâmetros de stresse oxidativo que sofrem alteração, ainda que não significativa, durante a fase de cancro localizado, e que se acentua na fase de doença avançada, sugerindo a sua alteração gradual durante progressão da doença. São exemplos a diminuição da atividade da Gl-Px (Tabela III.1.3) e dos níveis de GST (Tabela III.1.4).

No grupo de doentes com cancro da próstata (G4) observa-se aumento de MDA plasmático ($1,9\pm 0,6\mu\text{M}$) comparativamente aos grupos sem neoplasia (G1) ($1,8\pm 0,6\mu\text{M}$) e G3 ($1,5\pm 0,5\mu\text{M}$). No entanto, como podemos verificar na tabela III.1.3 é o grupo de doentes com cancro localizado (G5) que apresenta aumento significativo de MDA ($2,0\pm 1,9\mu\text{M}$) ($p<0,05$).

Pelo exposto, os resultados sugerem a participação do stresse oxidativo no cancro da próstata, no qual importa referir uma diminuição significativa das defesas antioxidantes GSH, VIT A e de atividade da Gl-Px bem como uma tendência para a diminuição de GST, refletindo-se, possivelmente, na redução significativa de TAS e no aumento de $\text{NO}\cdot$ observados.

Além do cancro, a próstata é alvo de outras patologias como a prostatite, ou a BPH que se poderão associar a alterações de stresse oxidativo. Neste estudo observámos que os doentes com prostatite (G2) (tabela III.1.3) apresentam diminuição significativa de GSH plasmático ($26,3\pm 3,9\mu\text{M}$) quando comparados com o grupo de indivíduos sem neoplasia ou outra patologia prostática (G1) ($33,4\pm 10,2\mu\text{M}$) ($p<0,05$), com o grupo com BPH (G3) ($47,7\pm 17,5\mu\text{M}$) ($p<0,01$) e com os doentes com cancro (G4) ($35,6\pm 15,0\mu\text{M}$) ($p<0,05$), em particular com cancro localizado (G5) ($36,1\pm 15,8\mu\text{M}$) ($p<0,05$). De uma forma geral estes resultados são acompanhados de diminuição da atividade da Gl-Px.

A prostatite é caracterizada por um processo inflamatório da próstata, em que está envolvida a produção de ROS. Assim, a diminuição de defesas antioxidantes observada nesta patologia

parece acentuar um aumento de stresse oxidativo, o qual poderá contribuir para o desenvolvimento do cancro da próstata.

Pelo contrário, os indivíduos com BPH (G3), apresentam valores de GSH plasmático significativamente aumentados ($47,7 \pm 17,5 \mu\text{M}$) relativamente a todos os grupos estudados, como se pode observar na tabela III.1.3. Este aumento de GSH é acompanhado de diminuição significativa de MDA ($1,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$) plasmático sugerindo um efeito protetor do GSH. No entanto, neste grupo de indivíduos observa-se uma diminuição de Gl-Px eritrocitária ($4,1 \pm 3,4 \text{mU/gHb}$) relativamente ao grupo sem neoplasia ou patologia prostática (G1) ($7,5 \pm 3,5 \text{mU/gHb}$) ($p < 0,01$) e a todos os grupos de doentes G4 ($6,3 \pm 3,6 \text{mU/gHb}$), G5 ($6,4 \pm 3,6 \text{mU/gHb}$) e G6 ($5,9 \pm 3,4 \text{mU/gHb}$) ($p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respetivamente), acompanhado de um aumento significativo de MDA eritrocitário ($0,14 \pm 0,07 \mu\text{mol/gHb}$). Assim, os resultados sugerem que a diminuição da Gl-Px favorece a peroxidação lipídica eritrocitária.

De acordo com o evidenciado, as patologias prostáticas estudadas parecem relacionar-se com um aumento de stresse oxidativo. No cancro da próstata o stresse oxidativo é mais acentuado na fase de metastização.

É também de referir que a análise da correlação *Spearman's rho* nos diversos grupos de estudo evidenciou uma associação positiva entre o GSH e o TAS ($r = 0,290$, $p = 0,016$) evidenciando a importância desta relação na caracterização do stresse oxidativo.

O stresse oxidativo, é influenciado pela gordura individual (Fernández-Shánchez, 2011). O índice de massa corporal (IMC) é utilizado como indicador da gordura corporal e é obtido pela razão entre a altura (m) e o quadrado do peso (Kg^2) do indivíduo ($\text{IMC} = \text{Altura}/\text{Peso}^2$) (WHO, 1995). Esta classificação distingue os indivíduos com baixo peso ($\text{IMC} < 18,5$), dos de peso normal ($18,5 < \text{IMC} < 25$), excesso de peso ($25 < \text{IMC} < 30$) e obesos ($\text{IMC} > 30$).

Tabela III.1.5 - Avaliação do stresse oxidativo em função do IMC em doentes com cancro da próstata e em controlos sem patologia prostática

PARÂMETROS DE STRESSE OXIDATIVO	Índice de Massa Corporal (IMC)					
	IMC<25		25<IMC<30		IMC>30	
	Controlos n=3	Doentes n=21	Controlos n=10	Doentes n=49	Controlos n=4	Doentes n=19
Defesas antioxidantes envolvidas na oxidação/redução de GSH						
<i>Enzimáticas</i>						
Gl-Px (mU/gHb)	4,2±1,7	6,0±3,9	9,9±3,4	*7,9±3,1	6,3±1,4	*7,6±3,1
Gl-Red (mU/gHb)	6,3±1,6	5,4±3,7	5,8±1,5	*6,4±2,1	5,9±2,6	6,3±2,1
<i>Não enzimáticas</i>						
GSH (µmol/gHb) eritrocitário	5,8±0,1	5,0±2,0	5,8±1,5	5,6±1,6	5,0±0,8	5,5±1,7
GSH (µM) plasmático	37,1±9,2	36,5±15,7	32,5±17,4	34,6±16,9	41,8±13,9	34,9±15,4
Outras defesas antioxidantes e TAS						
<i>Enzimáticas</i>						
GST (µM)	165±9	179±57	122±82	168±51	197 ±76	171±48
<i>Não Enzimáticas</i>						
AU (mM)	0,4±0,0	0,3±0,0	0,4±0,2	0,4±0,2	0,4±0,1	0,3±0,2
VITA (µM)	2,7±1,1	1,9±0,5	2,2±0,9	2,6±1,5	2,5±0,4	2,4±1,4
VITE (µM) plasmática	22,2±16,3	22,6±8,1	31,0±7,1	29,1±6,2	17,2±12,1	**27,9±7
VIT E/CHL	7,3±2,4	4,9±0,0	5,6±1,0	5,3±1,3	6,1±2,2	5,3±1,2
VIT E (nmol/gHb) eritrocitária	502±157	*297±1	194±8	*254±90	254±98	270±186
TAS (mM)	1,4±0,6	*1,0±0,3	1,1±0,3	1,3±0,9	1,2±0,2	1,3±0,9
Parâmetros de lesão oxidativa e NO·						
MDA eritrocitário (µmol/gHb)	0,04±0,02	*0,08±0,06	0,03±0,01	*0,06±0,04	0,03±0,02	*0,07±0,0
MDA plasmático (µM)	3,0±0,8	*1,9±0,8	1,9±1,0	2,1±1,0	1,4±0,6	*2,1±1,0
GC plasmático (µM)	178±12	199±22	190±77	216±44,7	223±82	213 ±40
NO· (µM)	8,2±2,5	8,1±2,8	8,5±3,9	10,4±5,1	6,4±3,7	10,6±5,9

Os resultados representam os parâmetros de stresse oxidativo na população controlo (doentes sem neoplasia ou outra doença prostática) e na de cancro da próstata em função do índice de massa corporal (IMC): atividade da peroxidase do glutatião (Gl-Px), atividade da redutase do glutatião (Gl-Red), glutatião reduzido (GSH), glutatona-S-transferase (GST), ácido úrico (AU), vitamina A (VIT A), vitamina E (VIT E), razão vitamina E/colesterol (VIT E/CHL), estado de antioxição total (TAS), malonilaldeído (MDA), grupos carbonilo (GC) e óxido nítrico (NO·). Os resultados representam a média ± desvio padrão dos valores encontrados. As diferenças significativas são consideradas para *p<0,05 e **p<0,01 relativamente ao controlo.

Neste estudo a maioria dos indivíduos apresentava excesso de peso (Tabela III.1.5). O tamanho reduzido das amostras, sobretudo, no que respeita aos grupos controlo, limitou a análise dos resultados. No entanto, é de salientar que da comparação entre os grupos de doentes com os controlos de igual IMC, se destaca um aumento consistente da peroxidação lipídica eritrocitária (MDA) nos doentes ($0,08 \pm 0,06$ vs $0,04 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/gHb}$ para $\text{IMC} < 25$, $0,06 \pm 0,04$ vs $0,03 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/gHb}$ para $25 < \text{IMC} < 30$ e $0,07 \pm 0,0$ vs $0,03 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/gHb}$ para $\text{IMC} > 30$) (Tabela III.1.5).

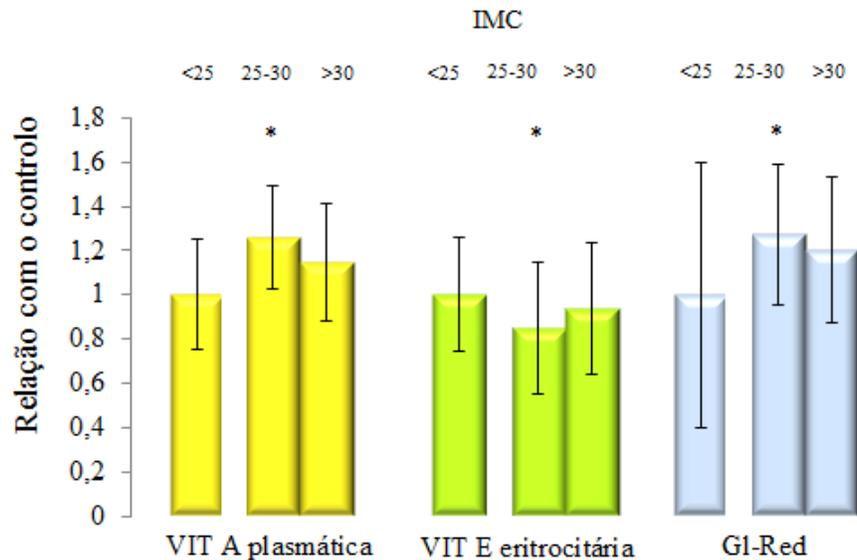


Figura 3.1.1 - Comparação de vitamina A plasmática, vitamina E eritrocitária e atividade de GI-Red no grupo de doentes com cancro da próstata em função IMC. Os parâmetros de stresse oxidativo incluem vitamina A (VIT A) plasmática, vitamina E (VIT E) eritrocitária e atividade da GI-Red (GI-Red). Os resultados obtidos representam a média \pm desvio padrão dos valores encontrados. As diferenças significativas são consideradas para $*p < 0,05$ relativamente ao grupo de doentes com $\text{IMC} < 25$.

Nos grupos de doentes formados por indivíduos com excesso de peso e obesos, é de notar uma tendência para o aumento de MDA plasmático ($2,1 \pm 1,0$ vs $1,9 \pm 1,0 \mu\text{M}$ e $2,1 \pm 1,0$ vs $1,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ para $p < 0,05$, respetivamente), bem como aumento de $\text{NO}\cdot$ ($10,4 \pm 5,1$ vs $8,5 \pm 3,9 \mu\text{M}$ e $10,6 \pm 5,9$ vs

6,4±3,7 μ M, respetivamente) (Tabela III.1.5) comparativamente aos controlos saudáveis com IMC correspondente, sugerindo aumento de stresse oxidativo nos doentes com excesso de peso e obesos. Todavia, observa-se uma tendência para o aumento da VIT E eritrocitária e aumento da atividade da Gl-Red nos grupos de doentes com excesso de peso (6,4±2,1 vs 5,8±1,5 mU/gHb, para $p<0,05$) e em obesos (6,3±2,1 vs 5,9±2,6 mU/gHb), comparativamente aos controlos saudáveis com IMC correspondente, sugerindo uma resposta ao stresse oxidativo (Tabela III.1.5). Nomeadamente, observa-se aumento da atividade da Gl-Red para IMC associado a excesso de peso ($p<0,05$) e a obesidade, quer na população geral de doentes (Figura 3.1.1), quer na de cancro localizado (Tabela III.1.6), comparativamente aos grupos de peso normal. Desta forma os resultados reforçam o aumento da atividade da Gl-Red em função do aumento de peso, particularmente para IMC entre 25 e 30, nos doentes com cancro da próstata. Pelo contrário, não se estabeleceu a mesma relação para a VIT E eritrocitária (Figura 3.1.1).

Apesar do aumento de stresse oxidativo nos doentes com excesso de peso e obesos (comparativamente aos controlos saudáveis) ser marcado pelo aumento da peroxidação lipídica (Tabela III.1.5), o mesmo não foi encontrado na população geral de doentes (resultados não apresentados), nem de cancro localizado (Tabela III.1.6), comparativamente aos grupos de peso normal. No entanto, no grupo com cancro da próstata localizado, é de salientar uma tendência para o aumento de $\text{NO}\cdot$ nos indivíduos com excesso de peso por comparação com os de menor IMC (Tabela III.1.6). Paralelamente, observa-se diminuição significativa da VIT E eritrocitária (Tabela III.1.6), também evidenciado na população total de doentes (Figura 3.1.1).

Tabela III.1.6 - Avaliação do stresse oxidativo em função do IMC em doentes com cancro da próstata localizado

PARÂMETROS DE STRESSE OXIDATIVO	Índice de Massa Corporal (IMC)		
	IMC<25 n=17	25<IMC<30 n=36	IMC>30 n=16
<i>Defesas antioxidantes envolvidas na oxidação/redução de GSH</i>			
<i>Enzimáticas</i>			
Gl-Px (mU/gHb)	6,8±3,9	*8,2±2,8	7,0±3,3
Gl-Red (mU/gHb)	5,0±3,2	*6,4±2,2	5,9±2,1
<i>Não enzimáticas</i>			
GSH (µmol/g Hb) eritrocitário	5,3±0,03	5,8±1,3	5,2±2,0
GSH (µM) plasmático	36,4±12,0	37,4±19,0	36,3±7,3
<i>Outras defesas antioxidantes e TAS</i>			
<i>Enzimáticas</i>			
GST (µM)	174±45	174±58	170±39
<i>Não Enzimáticas</i>			
AU (mM)	0,3±0,07	0,3±0,13	0,3±0,09
VITA (µM)	1,9±0,5	*2,6±1,2	1,8±0,7
VITE (µM) plasmática	23,4±8,9	*28,8±6,9	23,9±7,8
VIT E/CHL	4,5±1,6	*5,6±1,3	4,6±1,3
VIT E (nmol/gHb) eritrocitária	306±107	*232±115	316±179
TAS (mM)	1,1±0,3	1,1±0,6	1,5±0,9
<i>Parâmetros de lesão oxidativa</i>			
MDA eritrocitário (µmol/gHb)	0,05±0,03	*0,03±0,01	*0,03±0,01
MDA plasmático (µM)	2,0±0,8	2,2±0,9	2,2±1,1
GC plasmático (µM)	201±19	216±46	208±28
NO· (µM)	8,2±1,9	9,9±5,1	9,4±3,4

Os resultados representam os parâmetros de stresse oxidativo nos doentes com cancro da próstata localizado em função do índice de massa corporal (IMC): atividade da peroxidase do glutatião (Gl-Px), atividade da redutase do glutatião (Gl-Red), glutatião reduzido (GSH), glutathiona-S-transferase (GST), ácido úrico (AU), vitamina A (VIT A), vitamina E (VIT E), colesterol (CHL), estado de antioxição total (TAS), malonilaldeído (MDA), grupos carbonilo (GC) e óxido nítrico (NO·). Os resultados representam a média ± desvio padrão dos valores encontrados. As diferenças significativas são consideradas para *p<0,05 relativamente ao grupo formado por indivíduos com IMC <25.

No entanto, observa-se aumento de algumas defesas antioxidantes, o que poderá constituir um mecanismo de resposta ao desequilíbrio de oxidação/redução. Assim, encontramos aumento significativo de VIT A nos doentes com cancro localizado que apresentam excesso de peso (Tabela III.1.6), concordante com o observado para a população total de doentes (Figura 3.1.1), bem como aumento de VIT E plasmática e da razão VIT E/CHL nos primeiros (Tabela III.1.6). Nos, doentes com cancro localizado, observa-se ainda uma tendência para o aumento das atividades da Gl-Px e Gl-Red (já referida), que assumem valores significativos no grupo com excesso de peso (Tabela III.1.6). É ainda de salientar uma associação estatisticamente significativa entre o IMC e a concentração plasmática de MDA, no grupo de doentes com cancro da próstata avançado ($r=0,626$, $p=0,013$) de acordo com a correlação *Spearman's rho* (Figura3.1.2).

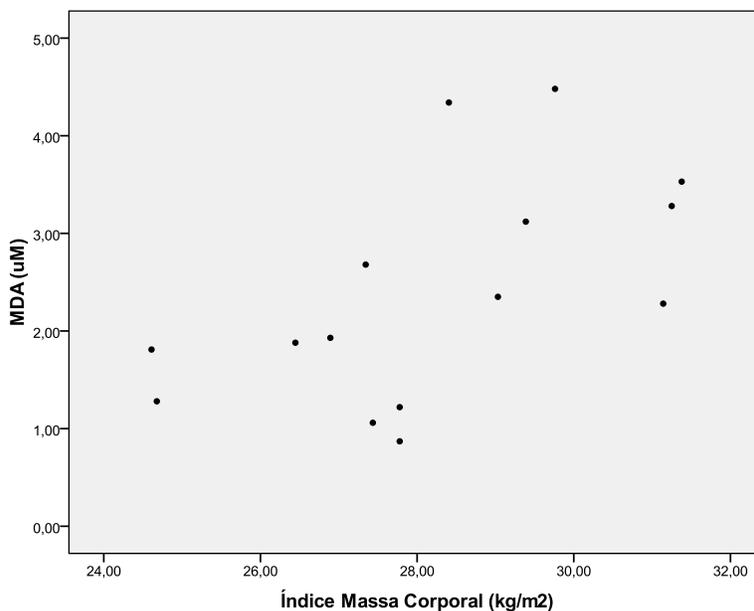


Figura 3.1.2 - Análise da correlação *Spearman's rho* entre o IMC e a concentração plasmática de MDA restrita ao grupo de doentes com cancro da próstata avançado ($r=0,626$, $p=0,013$).

Posteriormente, avaliámos de que forma o aumento do antigénio específico da próstata (PSA), um marcador determinante na monitorização desta neoplasia, se relaciona com o stresse oxidativo. Para o efeito do estudo estabeleceram-se três grupos, consoante o PSA fosse inferior a 4ng/ml (geralmente não associado a patologia), entre 4 e 10 ng/ml e acima de 10 ng/ml.

A informação sobre o PSA foi obtida para os doentes com cancro da próstata e para os indivíduos sem neoplasia ou outra doença prostática. Os resultados já apresentados no início desta secção confirmam que o PSA é significativamente superior no grupo de doentes com esta neoplasia (Tabela III.1.1), particularmente nos doentes em fase avançada da doença (Tabela III.1.2).

Na tabela III.1.7 são comparados os parâmetros de stresse oxidativo entre doentes e controlos, para o mesmo intervalo de PSA. Relativamente às defesas antioxidantes envolvidas na oxidação/redução de GSH, importa referir uma tendência para a diminuição de GSH eritrocitário, quer em doentes, quer em controlos, com o aumento do PSA. No grupo de doentes com PSA mais elevado ($4 < \text{PSA} < 10$), esta diminuição é acompanhada de uma redução significativa da atividade da Gl-Red, comparativamente aos controlos ($5,4 \pm 2,0$ vs $6,7 \pm 2,1$ mU/gHb), o que poderá justificar a diminuição de GSH nos doentes. Neste contexto é de salientar a diminuição progressiva da atividade da Gl-Red nos doentes com cancro localizado, em função do aumento de PSA (Tabela III.1.8). Já nos controlos, com PSA mais elevado, a diminuição de GSH poderá estar relacionado com a sua oxidação a GSSG, dado o aumento da atividade da Gl-Px ($9,6 \pm 3,7$ vs $7,3 \pm 4$ mU/gHb) (Tabela III.1.7).

Tabela III.1.7 - Avaliação do stresse oxidativo em função do PSA em doentes com cancro da próstata e em controlos sem patologia prostática

PARÂMETROS DE STRESSE OXIDATIVO	Antigénio específico da próstata (PSA) (ng/mL)			
	PSA<4		4<PSA<10	
	Controlos (n=8)	Doentes (n=36)	Controlos (n=8)	Doentes (n=25)
<i>Defesas antioxidantes envolvidas na oxidação/redução de GSH</i>				
<i>Enzimáticas</i>				
Gl-Px (mU/gHb)	7,3±4	7,3±5,3	9,6±3,7	*7,6±3,3
Gl-Red (mU/gHb)	6,1±1,6	6,2±2,7	6,7±2,1	*5,4±2,0
<i>Não enzimáticas</i>				
GSH (µmol/g Hb)	5,8±0,1	5,3±1,7	4,5±2,2	4,9±1,7
GSH (µM)	37,1±13,2	32,3±14,0	38,9±14,9	36,0±16,9
<i>Outras defesas antioxidantes e TAS</i>				
<i>Enzimáticas</i>				
GST (µM)	148,5±101	172,4±63	154±76	171,6±44
<i>Não enzimáticas</i>				
AU (mM)	0,4±0,0	0,3±0,1	0,3±0,1	0,4±0,2
VITA (µM)	2,6±1,1	2,2±0,7	2,3±0,3	2,2±0,7
VITE (µM)	22,9±10,9	24,8±8,1	35,5±11,5	30,8±7,7
VIT E/CHL	3,9±1,8	**5,1±1,8	5,6±1,0	5,7±0,8
VIT E (nmol/gHb)	278,1±190	275,8±152	187±100	*315±90
TAS (mM)	1,3±0,4	1,3±0,3	1,3±0,9	1,3±0,7
<i>Parâmetros de lesão oxidativa</i>				
MDA eritrocitário (µmol/gHb)	0,03±0,01	*0,08±0,06	0,03±0,01	*0,06±0,03
MDA plasmático (µM)	2,4±1,6	2,0±0,7	1,6±1,1	2,3±1,0
GC plasmático (µM)	178,7±83	*210,2±21	218±82	223,9±57,5
NO· (µM)	7,1±2,9	12,5±7,5	8,3±3,7	9,7±4,0

Os resultados obtidos representam a média ± desvio padrão dos valores encontrados para os diferentes parâmetros de stresse oxidativo: atividade da peroxidase do glutatião (Gl-Px), atividade da redutase do glutatião (Gl-Red), Glutatião reduzido (GSH), glutathiona-S-transferase (GST), ácido úrico (AU), vitamina A (VIT A), vitamina E (VIT E), colesterol (CHL), estado de antioxição total (TAS), malonilaldeído (MDA), grupos carbonilo (GC) e óxido nítrico (NO·). As diferenças significativas encontradas são consideradas para *p<0,05 e **p<0,01 relativamente ao grupo controlo (doentes sem cancro da próstata ou outra patologia prostática).

Tabela III.1.8 - Avaliação de parâmetros de stresse oxidativo no grupo de doentes com cancro localizado em função do PSA.

Parâmetros de stresse oxidativo				
PSA (ng/ml)	AU	Gl-Red	VIT E	NO·
	(mM)	(mU/gHb)	(nmol/gHb)	(μ M)
< 4 (n =21)	0,30 \pm 0,11	6,5 \pm 3,1	268,5 \pm 150	8,4 \pm 2,7
4-10 (n =15)	**0,48 \pm 0,3	5,0 \pm 2,7	358,7 \pm 278,7	*10,5 \pm 4,2
>10 (n =7)	*0,42 \pm 0,29	*3,7 \pm 1,6	*438,0 \pm 354,5	**12,6 \pm 5,6

Os resultados obtidos representam a média \pm desvio padrão dos valores encontrados para os diferentes parâmetros de stresse oxidativo. Ácido úrico (AU), atividade da redutase do glutatião (Gl-Red), vitamina E (VIT E) e óxido nítrico (NO·), As diferenças significativas encontradas são consideradas para *p<0,05 e **p<0,01 relativamente ao grupo formado por indivíduos com PSA<4ng/ml.

No que respeita à lesão oxidativa evidenciada pelos níveis de GC, parece existir concordância com o observado para o teor em GSH. Assim observa-se tendência para o aumento de GC em doentes e em controlos, com o aumento do PSA (Tabela III.1.7). Entre doentes e controlos com valores de PSA<4 observa-se, nos primeiros, um aumento significativo de GC (210,2 \pm 21 vs 178,7 \pm 83 μ M).

Relativamente ao NO· nesta amostragem importa referir uma tendência para o aumento nos doentes relativamente ao controlo (Tabela III.1.7). No entanto, não é visível o seu aumento na população total de doentes, em função do PSA (Tabela III.1.8). Já na população de doentes com cancro localizado observa-se aumento significativo de NO· para o intervalo de PSA entre 4 e 10 (10,5 \pm 4,2 vs 8,4 \pm 2,7ng/ml para p<0,05) e para PSA acima de 10ng/ml (12,6 \pm 5,6 vs 8,4 \pm 2,7ng/ml para p<0,01). É de referir que o aparente aumento de stresse oxidativo relacionado o aumento do PSA, não se reflete numa diminuição de TAS (Tabela III.1.7). Neste sentido poderão participar

algumas defesas que se encontram significativamente aumentadas como a VIT E eritrocitária e a razão VIT E/CHL (Tabela III.1.7 e Tabela III.1.8).

Observa-se ainda uma tendência para o aumento de GST nos doentes relativamente aos controlos o que poderá constituir um mecanismo de resposta ao aumento de stresse oxidativo.

Nos doentes com cancro da próstata localizado observa-se ainda aumento significativo de AU para valores de PSA superiores a 4ng/mL. Assim o aumento de stresse oxidativo evidenciado quer pela lesão oxidativa de biomoléculas, quer pela redução de defesas antioxidantes parece acompanhar a progressão do cancro da próstata e o aumento do PSA. Contudo, nos doentes com cancro em fase avançada, não se observaram diferenças significativas nos parâmetros de stresse oxidativo quando comparamos os doentes em função dos intervalos de PSA (resultados não apresentados).

3.1.2 Avaliação do efeito do tabaco no stresse oxidativo e na progressão do cancro da próstata

Para avaliar a relação entre o efeito do tabaco no stresse oxidativo e o desenvolvimento e progressão do cancro da próstata, os indivíduos participantes no estudo foram selecionados de acordo com os hábitos tabágicos. Assim, num grupo foram incluídos os indivíduos com uma carga tabágica superior a 10 unidades maço/ano (UMA), e noutro, os indivíduos que nunca fumaram (0 UMA). A carga tabágica definida por UMA, resulta do produto entre número de maços de tabaco fumados diariamente e o número de anos que o indivíduo fumou (Ebbert *et al.*, 2003).

Tabela III.1.9 - Avaliação do stresse oxidativo em doentes com cancro da próstata e em controlos sem patologia prostática em função dos hábitos tabágicos

PARÂMETROS DE STRESSE OXIDATIVO	Carga tabágica > 10 UMA	
	Controlos (n=4)	Doentes (n=13)
<i>Defesas antioxidantes envolvidas na oxidação/redução de GSH</i>		
<i>Enzimáticas</i>		
Gl-Px (mU/gHb)	6,7±2,6	6,4±1,3
Gl-Red (mU/gHb)	7,5±0,9	7,5±1,6
<i>Não enzimáticas</i>		
GSH (µmol/g Hb)	5,0±0,9	6,1±1,1
GSH (µM)	44,3±14,5	*30,9±6,5
<i>Outras defesas antioxidantes e TAS</i>		
<i>Enzimáticas</i>		
GST (µM)	166±10,5	*145,5±29,9
<i>Não enzimáticas</i>		
AU (mM)	0,4±0,1	0,3±0,0
VITA (µM)	2,71±1,0	2,41±0,9
VITE (µM)	21,2±12,1	*31,9±7,3
VIT E/CHL	3,8±1,0	4,4±0,9
VIT E (nmol/gHb)	281±100	*184±52
TAS (mM)	1,3±0,5	*0,9±0,2
<i>Parâmetros de lesão oxidativa</i>		
MDA eritrocitário (µmol/gHb)	0,02±0,00	*0,03±0,01
MDA plasmático (µM)	2,8±2,1	2,2±0,3
GC plasmático (µM)	192,0 ±15	*221±26
NO· (µM)	8,9±3,0	*12,7±6,9

Os resultados obtidos representam a média ± desvio padrão dos valores encontrados para os diferentes parâmetros de stresse oxidativo: atividade da peroxidase do glutatião (Gl-Px), atividade da redutase do glutatião (Gl-Red), glutatião reduzido (GSH), glutatião-S-transferase (GST), ácido úrico (AU), vitamina A (VIT A), vitamina E (VIT E), colesterol (CHL), estado de antioxição total (TAS), malonilaldeído (MDA), grupos carbonilo (GC) e óxido nítrico (NO·). As diferenças significativas encontradas são consideradas para *p<0,05 e **p<0,01 relativamente ao grupo controlo (doentes sem cancro da próstata ou outra patologia prostática).

Os resultados apresentados na tabela III.1.9 evidenciam um aumento da lesão oxidativa nos doentes fumadores comparativamente aos controlos fumadores, caracterizado por um aumento significativo de GC (221 ± 26 vs $192,0\pm 15$ μM), MDA eritrocitário ($0,03\pm 0,01$ vs $0,02\pm 0,00$ $\mu\text{mol/gHb}$) e ainda de $\text{NO}\cdot$ ($12,7\pm 6,9$ vs $8,9\pm 3,0$ μM). O aumento de MDA eritrocitário poderá estar em parte relacionado com uma diminuição significativa de VIT E eritrocitária observada nos doentes fumadores (184 ± 52 vs 281 ± 100 nmol/gHb). A lesão oxidativa também poderá estar relacionada com uma diminuição significativa das defesas antioxidantes GSH plasmático ($30,9\pm 6,5$ vs $44,3\pm 14,5$ μM) e GST ($145,5\pm 29,9$ vs $166\pm 10,5$ μM) bem como devido ao aumento significativo de $\text{NO}\cdot$, refletindo-se numa diminuição de TAS ($0,9\pm 0,2$ vs $1,3\pm 0,5$ mM) (Tabela III.1.9). Para além das alterações estatisticamente significativas, observa-se uma ligeira tendência para a diminuição da atividade da Gl-Px, níveis de vitamina A e AU. Desta forma, os hábitos tabágicos parecem induzir aumento de stresse oxidativo nos doentes com cancro da próstata comparativamente aos controlos, podendo contribuir para a progressão da doença.

Posteriormente analisámos a relação entre os hábitos tabágicos e o stresse oxidativo, em cada uma das populações do estudo, ou seja em controlos sem neoplasia ou outra doença prostática (Tabela III.1.10) e em doentes com cancro da próstata (Tabela III.1.11).

Como se pode observar na tabela III.1.10, existe uma tendência para o aumento de marcadores associados a lesão oxidativa, nomeadamente, GC e $\text{NO}\cdot$ e MDA plasmático, o que poderá estar relacionado com a diminuição de defesas antioxidantes, como a atividade da Gl-Px e do conteúdo em VIT E ($21,2\pm 12,1$ vs $31,6\pm 11,9$ μM) no plasma dos indivíduos fumadores do grupo controlo. No entanto, observa-se uma diminuição significativa de MDA nos eritrócitos destes indivíduos. A redução da peroxidação lipídica eritrocitária poderá estar relacionada com um aumento da atividade da Gl-Red, sugerindo capacidade adaptativa dos indivíduos não

neoplásicos ao stresse oxidativo induzido pelo tabaco. De facto, neste grupo não se observou diminuição de TAS. Pelo contrário, nos doentes fumadores o aumento de GC, e $\text{NO}\cdot$ são significativos (221 ± 26 vs 203 ± 26 μM e $12,7\pm 6,9$ vs $8,9\pm 3,2$ μM , respetivamente) e acompanhados da diminuição significativa de TAS ($0,9\pm 0,2$ vs $1,2\pm 0,5$ mM), refletindo uma menor capacidade adaptativa nos doentes ao stresse oxidativo induzido pelo tabaco (Tabela III.1.11). Para este aumento de stresse oxidativo poderá contribuir não só a tendência para a diminuição da atividade da Gl-Px, como no controlo, mas sobretudo, a diminuição significativa de GST (145 ± 30 vs 182 ± 55 μM) e VIT E eritrocitária (184 ± 52 vs 318 ± 211 nmol/gHb) (Tabela III.1.11). Por oposição é visível aumento da atividade da Gl-Red ($7,5\pm 1,6$ vs $6,4\pm 1,3$ mU/gHb) que embora se possa relacionar com a diminuição de MDA eritrocitário ($0,03\pm 0,00$ vs $0,04\pm 0,02$ $\mu\text{mol/gHb}$), à semelhança do observado para o grupo controlo, não assegura adaptação ao stresse oxidativo nos doentes fumadores.

Tabela III.1.10 - Avaliação do stresse oxidativo no grupo de indivíduos sem neoplasia ou outra doença prostática em função da carga tabágica

PARÂMETROS DE STRESSE OXIDATIVO	Carga tabágica	
	0 UMA (n=7)	> 10 UMA (n=4)
<i>Defesas antioxidantes envolvidas na oxidação/redução de GSH</i>		
<i>Enzimáticas</i>		
Gl-Px (mU/gHb)	7,1±5,3	6,7±2,6
Gl-Red (mU/gHb)	6,0±2,0	*7,5±0,9
<i>Não enzimáticas</i>		
GSH (µmol/g Hb)	5,6±1,7	5,0±0,9
GSH (µM)	31,8±8,7	44,3±14,5
<i>Outras defesas antioxidantes e TAS</i>		
<i>Enzimáticas</i>		
GST (µM)	149±138	166±10,5
<i>Não enzimáticas</i>		
AU (mM)	0,3±0,04	0,4±0,1
VITA (µM)	2,5±1,0	2,71±1,4
VITE (µM)	31,6±11,9	*21,2±12,1
VIT E/CHL	5,9±1,2	3,8±1,0
VIT E (nmol/gHb)	318±211	281±100
TAS (mM)	1,1±0,4	1,3±0,5
<i>Parâmetros de lesão oxidativa</i>		
MDA eritrocitário (µmol/gHb)	0,04±0,02	**0,02±0,00
MDA plasmático (µM)	2,6±1,1	2,8±2,1
GC plasmático (µM)	162,5±1,1	192±15
NO· (µM)	8,3±2,5	8,9±3,0

Os resultados obtidos representam a média ± desvio dos valores encontrados para as defesas antioxidantes plasmáticas - glutatião reduzido (GSH), glutatona -S-transferase (GST), vitamina A (VIT A), vitamina E (VIT E), colesterol (CHL), ácido úrico (AU) e estado de anto oxidação total (TAS), parâmetros de stresse oxidativo: lesão oxidativa através da quantificação de óxido nítrico (NO·), grupos carbonilo (GC) e malonilaldeído (MDA); atividade das defesas antioxidantes eritrocitárias, peroxidase do glutatião (Gl-Px), redutase do glutatião (Gl-Red), glutatião reduzido (GSH) e vitamina E (VIT E). As diferenças significativas encontradas são consideradas para *p<0,05 e **p<0,01 quando se compara o grupo de fumadores com o de não fumadores.

Tabela III.1.11 - Avaliação do stresse oxidativo no grupo de doentes com cancro da próstata em função da carga tabágica

PARÂMETROS DE STRESSE OXIDATIVO	Carga tabágica	
	0 UMA (n=37)	> 10 UMA (n=13)
<i>Defesas antioxidantes envolvidas na oxidação/redução de GSH</i>		
<i>Enzimáticas</i>		
Gl-Px (mU/gHb)	7,1±5,3	6,4±1,3
Gl-Red (mU/gHb)	6,4±1,3	*7,5±1,6
<i>Não enzimáticas</i>		
GSH (µmol/g Hb)	5,6±1,7	6,1±1,1
GSH (µM)	33,2±7,7	30,9±6,5
<i>Outras defesas antioxidantes e TAS</i>		
<i>Enzimáticas</i>		
GST (µM)	182±55	*145±30
<i>Não enzimáticas</i>		
AU (mM)	0,3±0,1	0,3±0,0
VITA (µM)	2,19±1,5	2,41±0,9
VITE (µM)	24,8±7,7	***31,9±7,3
VIT E/CHL	5,3±1,1	4,4±0,9
VIT E (nmol/gHb)	318±211	*184±52
TAS (mM)	1,2±0,5	*0,9±0,2
<i>Parâmetros de lesão oxidativa</i>		
MDA eritrocitário (µmol/gHb)	0,04±0,02	**0,03±0,00
MDA plasmático (µM)	2,5±1,1	2,2±0,3
GC plasmático (µM)	203±26	*221±26
NO· (µM)	8,9±3,2	*12,7±6,9

Os resultados obtidos representam a média ± desvio padrão dos valores encontrados para os diferentes parâmetros de stresse oxidativo: lesão oxidativa através da quantificação de óxido nítrico (NO·), grupos carbonilo (GC) e malonilaldeído (MDA); atividade das defesas antioxidantes eritrocitárias, peroxidase do glutatião (Gl-Px), redutase do glutatião (Gl-Red) glutatião reduzido (GSH) e vitamina E (VIT E) e defesas antioxidantes plasmáticas - glutatião reduzido (GSH), glutatona -S-transferase (GST), vitamina A (VIT A), vitamina E (VIT E), colesterol (CHL), ácido úrico (AU) e estado de oxidação total (TAS). As diferenças significativas encontradas são consideradas para *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 quando se compara o grupo de fumadores em relação ao de não fumadores.

A comparação dos resultados obtidos entre os doentes fumadores com cancro da próstata em fase avançada e com cancro localizado (resultados não evidenciados), não revelam diferenças significativas. Possivelmente o número reduzido de casos (n=3) condicionou a falta de poder estatístico.

3.1.3 Avaliação do efeito dos hábitos alcoólicos no stresse oxidativo e na progressão do cancro da próstata

Para avaliar os efeitos do álcool no stresse oxidativo e a sua influência no cancro da próstata, em particular na progressão da doença, foram incluídos no estudo, doentes com cancro da próstata e indivíduos sem doença neoplásica ou outra patologia prostática, com uma ingestão de álcool diária superior a de 60g (aproximadamente 500 mL de vinho) e abstémios. Este valor foi obtido em função da % (v/v) de álcool presente nas respetivas bebidas ingeridas e do volume de álcool consumido.

A comparação entre os hábitos alcoólicos nos indivíduos sem cancro da próstata (controlo) e destes com os doentes que ingerem acima de 60g de álcool diariamente (resultados não evidenciados), não revelou diferenças significativas entre os parâmetros de stresse oxidativo. No entanto, no grupo de doentes, a ingestão de álcool associa-se a um aumento da lesão oxidativa evidenciado por um aumento significativo do conteúdo em GC e MDA plasmático ($220 \pm 49 \mu\text{M}$ vs 196 ± 22 e $3,3 \pm 1,1$ vs $1,9 \pm 0,7 \mu\text{M}$, respetivamente) (Tabela III.1.12). Contudo, os níveis de TAS, não sofreram alterações significativas. É ainda de referir uma tendência para o aumento de $\text{NO}\cdot$ no grupo de doentes com hábitos alcoólicos.

Tabela III.1.12 - Avaliação do stresse oxidativo no grupo de doentes com cancro da próstata de acordo com os hábitos alcoólicos

PARÂMETROS DE STRESSE OXIDATIVO	Consumo de álcool (g/dia)	
	0 (n=17)	>60 (n=29)
<i>Enzimáticas</i>		
Gl-Px (mU/gHb)	8,3±2,1	8,19±1,5
Gl-Red (mU/gHb)	5,93±2,2	6,28±3,9
<i>Não enzimáticas</i>		
GSH (µmol/g Hb)	6,1±0,9	6,0±1,5
GSH (µM)	30,9±0,7	33,4±7,8
<i>Outras defesas antioxidantes e TAS</i>		
<i>Enzimáticas</i>		
GST (µM)	196±22	*220±49
<i>Não enzimáticas</i>		
AU (mM)	0,32±0,1	0,35±0,2
VITA (µM)	2,1±1,4	2,2±0,8
VITE (µM)	27,3±6,5	28,6±6,0
VIT E (nmol/gHb)	304±124	309±146
TAS (mM)	1,35±0,9	1,37±0,7
<i>Peroxidação lipídica</i>		
MDA eritrocitário (µmol/gHb)	0,04±0,02	0,04±0,02
MDA plasmático (µM)	1,9±0,7	***3,3±1,1
GC plasmático (µM)	196±22	*220±49
NO· (µM)	8,9±3,2	9,3±4,0

Os resultados obtidos representam a média ± desvio padrão dos valores encontrados para os diferentes parâmetros de stresse oxidativo: lesão oxidativa através da quantificação de óxido nítrico (NO·), grupos carbonilo (GC) e malonilaldeído (MDA); atividade das defesas antioxidantes eritrocitárias, peroxidase do glutatião (Gl-Px), redutase do glutatião (Gl-Red), glutatião reduzido (GSH) e vitamina E (VIT E) e defesas antioxidantes plasmáticas, glutatião reduzido (GSH), glutatona -S-transferase (GST), vitamina A (VIT A), vitamina E (VIT E), colesterol (CHL), ácido úrico (AU) e estado de oxidação total (TAS). As diferenças significativas são consideradas para *p<0,05, e ***p<0,001 no grupo de doentes com consumo de álcool superior a 60g comparativamente ao grupo de doentes sem hábitos alcoólicos (0).

Apesar dos indicadores de stresse oxidativo referidos, não se observa alteração significativa no TAS na população geral de doentes, o que poderá estar relacionado com o aumento significativo da defesa antioxidante GST (220 ± 49 vs 196 ± 22 μM).

No entanto, comparando doentes metastizados com doentes com cancro localizado e com controlos, consumidores de álcool, foi possível observar uma diminuição significativa de GSH (verde) e aumento significativo de $\text{NO}\cdot$ (amarelo), sugerindo alterações relacionadas com o aumento de stresse oxidativo, de forma mais acentuada, na doença avançada, em resultado da ingestão de álcool.

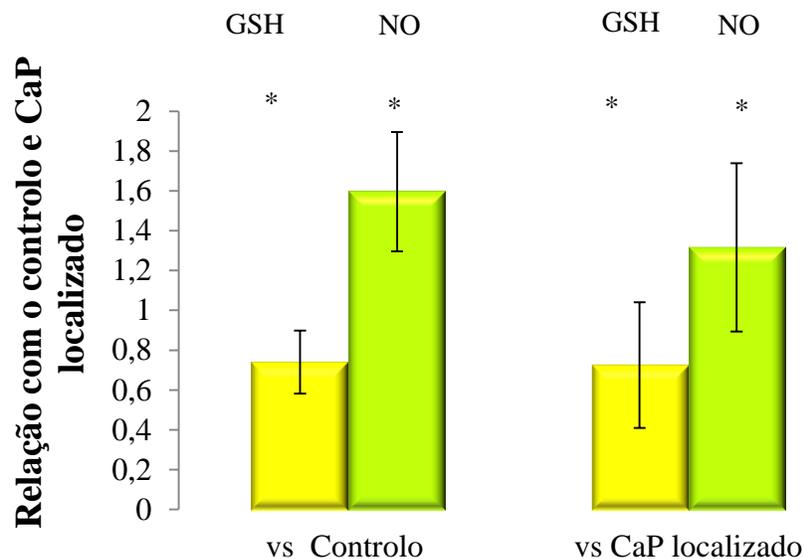


Figura 3.1.3 - Comparação de glutatião reduzido plasmático e óxido nítrico entre o grupo de doentes com doença avançada e os grupos controlo e de cancro localizado (CaP) para uma ingestão de álcool diária superior a 60g. Os resultados obtidos representam a média \pm desvio dos valores encontrados para o glutatião reduzido (GSH) e óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$). As diferenças significativas são consideradas para $*p<0,05$ relativamente ao grupo controlo (vs controlo) e grupo de cancro localizado (vs CaP localizado).

3.1.4 Relação de variantes polimórficas do fator de crescimento do endotélio dos vasos – VEGF e o stresse oxidativo

De modo a determinar se existe alguma associação entre as variantes polimórficas do gene que codifica o fator de crescimento do endotélio dos vasos – VEGF, envolvido na metastização, em particular a variante *VEGF*-634 G>C com o stresse oxidativo e o desenvolvimento e progressão do cancro da próstata, caracterizaram-se genotipicamente 61 doentes com cancro da próstata (CaP), dos quais 45 apresentavam doença clinicamente localizada e 16 tinham doença avançada. Foram também incluídos no estudo, 18 indivíduos sem neoplasia ou doença prostática conhecida (Controlos).

A figura 3.1.4 exemplifica um fragmento de 470bp obtido após reação de amplificação de sequência do gene do VEGF, de acordo com os procedimentos descritos na secção de materiais e métodos.

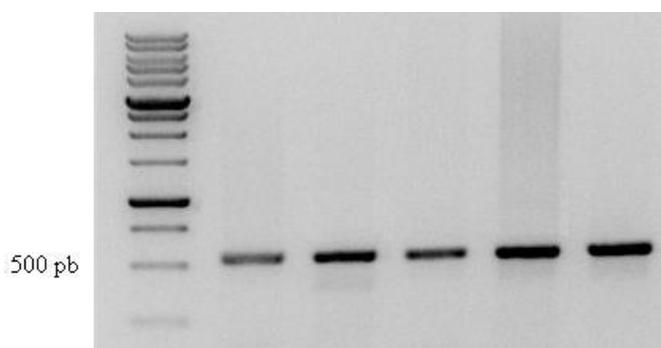


Figura 3.1.4 - Ilustração dos resultados de amplificação de ADN por PCR do gene do VEGF. A sequência de *VEGF* foi amplificada de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos e sujeita a eletroforese em gel de agarose (2%), corado com brometo de etídio. A primeira coluna representa o marcador de pesos moleculares. As colunas seguintes evidenciam bandas correspondentes às sequências de 470 pares de bases (pb) do *VEGF*.

A técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Position*) é utilizada na identificação de polimorfismos ou mutações, em função do padrão de clivagem obtido pela ação de enzimas de restrição, que identificam na molécula de ADN substituições pontuais de bases nucleotídeas.

Após sequenciação de amostras de ADN representativas dos diferentes genótipos (634GG, 634CC e 634GC) do *VEGF*, foi possível estabelecer o protocolo de genotipagem por PCR-RFLP. Posteriormente à digestão enzimática, o padrão de banda resultante nos diversos fragmentos de ADN permitiu a identificação dos respetivos genótipos. Para o genótipo *VEGF*-634 GG obtiveram-se os fragmentos de 196bp e 274bp, enquanto para o *VEGF*-634 CC, se obteve uma banda única de 470bp. O genótipo *VEGF*-634 GC, corresponde a três bandas de 470bp, 274bp e 196bp (Figura 3.1.5).

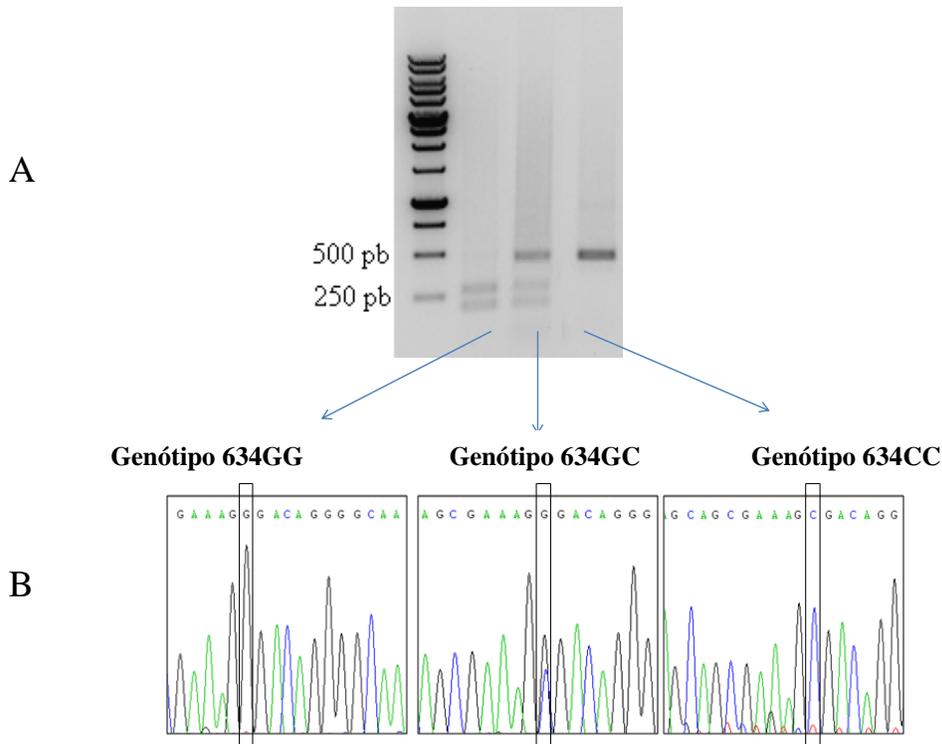


Figura 3.1.5 - Análise das variantes polimórficas do *VEGF* por PCR-RFLP após sequenciação. As bandas de ADN em (A) representam os genótipos do *VEGF* 634 GG, 634 GC, e 634 CC, previamente identificados por sequenciação (B).

A tabela III.1.13 descreve a distribuição alélica e genotípica do polimorfismo VEGF-634 G>C em controlos e doentes. O genótipo selvagem corresponde ao GG que apresenta uma frequência de distribuição superior (44% no grupo controlo e na população total de doentes com cancro da próstata, e de 50% no grupo com cancro da próstata em fase avançada).

Tabela III.1.13 - Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo VEGF-634 G> C em controlos e em doentes com cancro da próstata

VEGF-634 G>C	Controlo n=18		Doentes n=61		Doença avançada n=16	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Genótipos						
GG	8	44	27	44	8	50
CC	4	22	16	26	4	25
GC	6	33	18	29	4	25
Haplótipos						
634 G	14	58	45	57	12	60
634 C	10	42	34	43	8	40

aOR (IC95): *Odd's ratios* ajustados para a idade de diagnóstico e os respetivos intervalos de confiança de 95%.

Os resultados baseados na determinação do *Odd's ratios* (OR), apresentados na tabela III.1.14 não evidenciam qualquer associação de risco genético para desenvolver cancro da próstata ou cancro da próstata avançado, comparativamente aos portadores do génótipo selvagem (GG).

Tabela III.1.14 - Risco para cancro da próstata e para cancro da próstata avançado em função da Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo VEGF-634 G>C

	Controlos		Cancro da próstata (população total)		Cancro da próstata avançado	
	N	N	aOR (IC95)	N	aOR (IC95)	
Modelo aditivo						
GG	8	27	1	8	1	
GC	6	18	1,2 (0,3-4,8)	4	1,2 (0,2-6,7)	
CC	4	16	2,4 (0,5-13,1)	4	1,9 (0,2-14,5)	
Modelo dominante						
GG	8	27	1	8	1	
Portadores C	10	34	1,6 (0,5-5,4)	8	1,4 (0,3-6,4)	
Modelo recessivo						
Portadores G	14	45	1	12	1	
CC	4	16	2,3 (0,5-11,3)	4	1,8 (0,3-12,6)	

aOR (IC95): *Odd's ratios* ajustados para a idade de diagnóstico e os respectivos intervalos de confiança de 95%

Como referido, o stresse oxidativo, bem como o VEGF participam na progressão do cancro da próstata. Neste estudo quisemos avaliar se o polimorfismo encontrado no *VEGF* se poderia correlacionar com os níveis plasmáticos de GSH, TAS ou MDA.

As tabelas III.1.15 e III.1.16 apresentam a distribuição genotípica do polimorfismo do *VEGF*-634 G> C e respetiva associação com os parâmetros de stresse oxidativo no grupo controlo e no grupo de doentes, respetivamente.

Tabela III.1.15 - Parâmetros de stresse oxidativo e relação com o polimorfismo VEGF-634 G> C no grupo controlo

Restrito ao controlo (n=18)	Parâmetros de stress oxidativo plasmáticos			
	Genótipos do <i>VEGF</i>	GSH (μ M)	MDA (μ M)	TAS (mM)
Modelo aditivo				
GG	31,2 (29,5-40,0)	2,5 (1,7-3,7)	1,1 (0,9-1,5)	
GC	42,8 (33,7-43,4)	2,1 (1,3-3,6)	1,1 (0,9-1,5)	
CC	32,0 (30,7-38,7)	1,6 (1,0-3,0)	3,0 (1,1-10,5)	
	p *	0,325	0,508	0,234
Modelo dominante				
GG	31,2 (29,5-40,0)	2,5 (1,7-3,7)	1,1 (0,9-1,5)	
Portadores C	38,7 (30,7-42,9)	1,9 (1,3-2,9)	1,2 (1,0-2,6)	
	p **	0,277	0,336	0,494
Modelo recessivo				
Portadores G	35,6 (30,1-42,9)	2,3 (1,5-3,7)	1,1 (1,0-1,5)	
CC	32,0 (30,7-38,7)	1,6 (1,0-3,0)	3,0 (1,1-10,5)	
	P **	0,755	0,313	0,089

* Teste Kruskal Wallis; ** Teste Mann Whitney

Tabela III.1.16 - Parâmetros de stresse oxidativo e relação com o polimorfismo VEGF-634 G> C no grupo de doentes com cancro da próstata

Restrito a cancro da próstata (n=61)	Parâmetros de stress oxidativo plasmáticos		
	Genótipos VEGF	GSH (μM)	MDA (μM)
Modelo aditivo			
GG	28,7 (22,0-37,7)	2,1 (1,5-3,4)	1,1 (0,8-1,6)
GC	32,4 (28,0-38,0)	2,3 (1,5-2,6)	1,0 (0,8-1,5)
CC	36,0 (28,0-40,0)	1,9 (1,3-2,4)	1,2 (0,9-1,7)
p *	0,137	0,473	0,512
Modelo dominante			
GG	28,7 (22,0-37,7)	2,1 (1,5-3,4)	1,1 (0,8-1,6)
Portadores C	35,0 (28,0-38,8)	2,1 (1,4-2,6)	1,1 (0,9-1,6)
p **	0,083	0,452	0,515
Modelo recessivo			
Portadores G	29,4 (24,9-37,7)	2,3 (1,5-3,2)	1,1 (0,8-1,6)
CC	36,0 (28,0-40,0)	1,9 (1,3-2,4)	1,2 (0,9-1,7)
p **	0,755	0,313	0,089

* Teste Kruskal Wallis; ** Teste Mann Whitney

Apesar dos resultados não serem significativos, no grupo controlo, observa-se menor conteúdo em MDA e maior conteúdo em TAS, associado ao genótipo CC e ao haplótipo C (Tabela III.1.15). Nos doentes observa-se a mesma tendência relativamente ao genótipo CC em relação aos níveis de MDA e conteúdo em TAS. Neste grupo também se observa uma tendência para maior conteúdo em GSH, nos portadores do genótipo CC e no haplótipo C (Tabela III.1.16).

Desta forma apesar dos resultados não terem poder estatístico, sugerem que o genótipo CC e o haplótipo C do *VEGF*, se encontram associados a menor stresse oxidativo, caracterizado por maior conteúdo em GSH e TAS e menor peroxidação lipídica, representada pelo conteúdo em MDA.

3.2 Estudos em linhas celulares

3.2.1 Avaliação da resistência ao stresse oxidativo em linhas celulares

3.2.1.1 Efeito de peróxido de hidrogénio na proliferação e morte celular

Para melhor compreender a ação do stresse oxidativo na carcinogénese da próstata, o estudo foi realizado em linhas celulares representativas das diferentes fases da doença. Desta forma três linhas celulares, as células RWPE1, isoladas de epitélio prostático humano não neoplásico (Bello *et al.*, 1997), as células HPV10, isoladas de cancro localizado (Weijerman *et al.*, 1994), e as células PC3, isoladas de metástase óssea (Kaighn, *et al.*, 1979), servem de modelo para efetuar os estudos em epitélio prostático, não neoplásico, cancro da próstata localizado e cancro da próstata metastizado, respetivamente.

Nesta fase foi caracterizado o efeito do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) na proliferação e morte celular, bem como avaliadas a produção de ROS, defesas antioxidantes e lesão oxidativa de biomoléculas. Na figura 3.2.1 está representado o efeito do H_2O_2 (na gama de concentrações de 10nM a 500 μ M), na proliferação celular das células RWPE1, HPV10 e PC3, ao longo de 72 horas. Os resultados indicam que o H_2O_2 induz um efeito anti-proliferativo dependente do tipo de linha celular, da concentração e do tempo de exposição. De facto, ao longo do tempo, observa-se um efeito inibitório da proliferação mais acentuado nas células de epitélio normal (RWPE1) verificando-se uma redução de cerca de 75% da proliferação para concentrações superiores a 100 μ M, de peróxidos, após 72 horas de incubação (Figura 3.2.1). Nestas células o IC50

(concentração para a qual se observa 50% de inibição da proliferação celular) é atingido às 24 horas para a concentração 500 μ M, 48 horas para as concentrações de 10 e 100 μ M, e às 72 horas nas células incubadas com 100nM e 1 μ M de peróxido. Por oposição, nas células de metástase (PC3) a taxa de proliferação mantém-se sempre acima ou próxima de 50%, refletindo a sua capacidade de adaptação a concentrações elevadas de H₂O₂ (Figura 3.2.1).

Nas células de cancro localizado, HPV10, observa-se uma situação intermédia, ou seja, o IC50 é atingido aproximadamente às 24 e 48 horas para a concentração de 500 μ M e às 72 horas para as células tratadas com 100 μ M de peróxidos. Nestas células também se observa que baixas concentrações de H₂O₂ (10nM a 100nM), induzem aumento da proliferação celular.

Os estudos de morte celular efetuados por citometria de fluxo (Figura 3.2.2) revelam que apesar da diminuição da proliferação celular (Figura 3.2.1) nas células PC3, estas são resistentes à morte celular mediada pelo peróxido. É de referir que os valores basais de viabilidade celular são elevados neste tipo de células. Por outro lado, nestas condições, observa-se aumento da mortalidade celular, essencialmente por necrose, nas linhas celulares de epitélio normal (RWPE1) e de cancro localizado (HPV10). Em concordância com o referido anteriormente, as células de metástase evidenciam resistência à morte celular, nas mesmas condições (Figura 3.2.2), o que está de acordo com a sua resistência aos peróxidos.

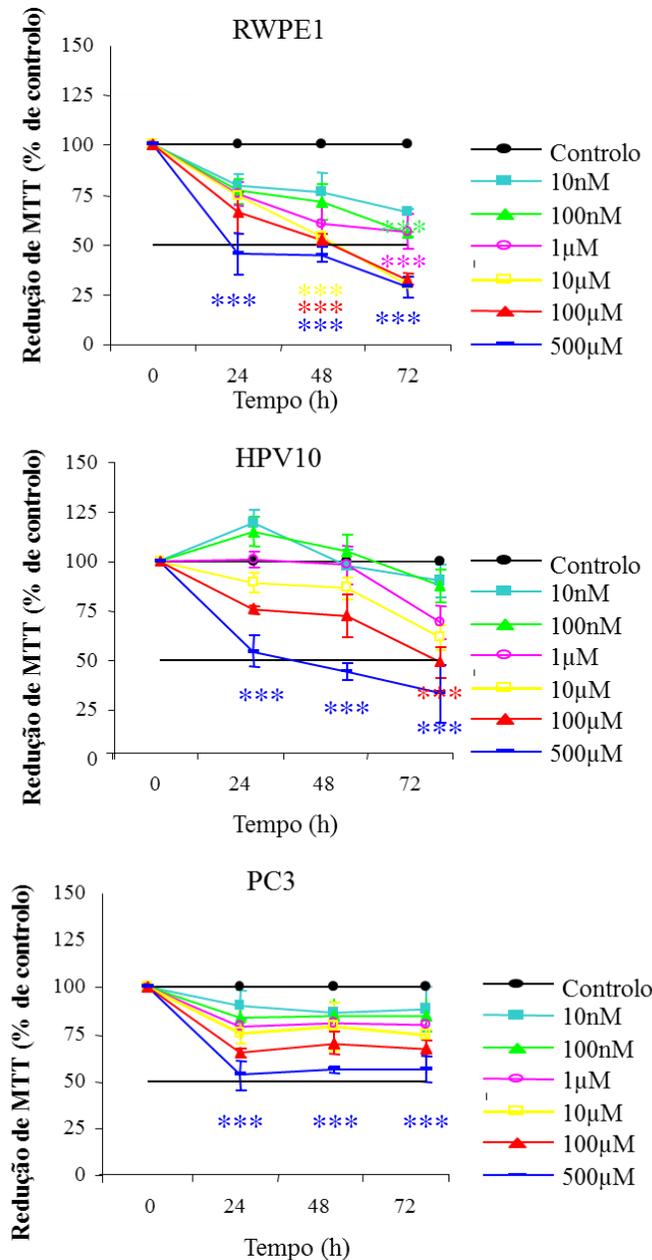


Figura 3.2.1 - Curva dose resposta do H₂O₂ nas células RWPE1, HPV10 e PC3. A figura representa o efeito do H₂O₂ (na gama de concentrações de 10nM a 500µM), na proliferação celular das células RWPE1, HPV10 e PC3 ao longo de 72 horas. A proliferação celular foi avaliada por espectrofotometria através do ensaio colorimétrico de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico), como descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em percentagem de redução de MTT por comparação com o controlo (células não tratadas) e representam a média ± desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para ***p<0,001 relativamente ao controlo.

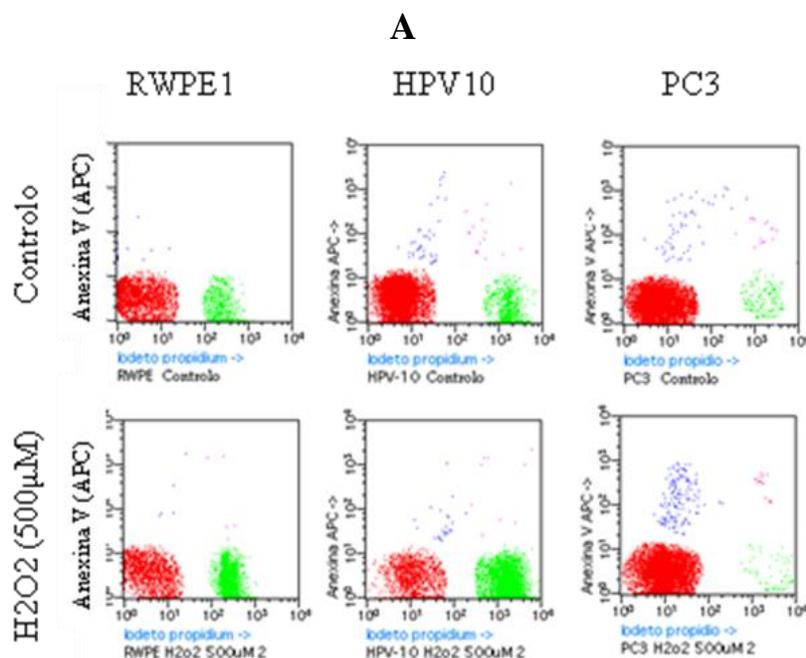
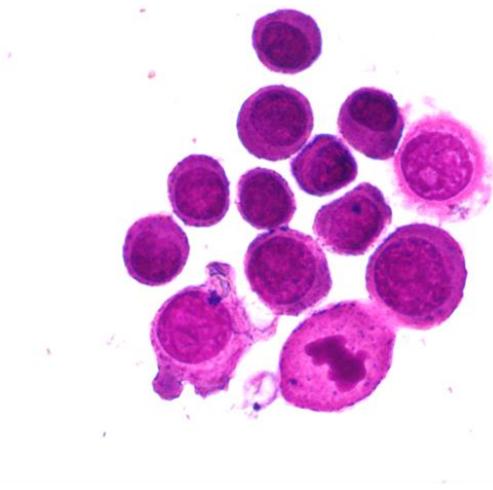


Figura 3.2.2 - Avaliação do efeito do H₂O₂ na viabilidade e morte das células RWPE1, HPV10 e PC3 por citometria de fluxo. Em (A) estão representados os *Dot-plots* relativos à viabilidade e morte celular induzida por H₂O₂. As células foram cultivadas na ausência (controlo) e presença de 500µM de H₂O₂, durante 24 horas. A viabilidade celular foi analisada por citometria de fluxo através da marcação das células com Anexina V em combinação como iodeto de propídio, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Legenda de cores: azul-escuro - células viáveis, amarelo - células em necrose, azul claro - células em apoptose e rosa - células em apoptose tardia vs necrose. Em (B), os resultados expressos em percentagem (%) representam a média ± desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para ***p<0,001 relativamente ao controlo, ### p<0,001 para PC3 e HPV10 relativamente a RWPE1 e +++ p<0,001 para PC3 relativamente a HPV10.

Para confirmar o tipo de morte induzido pelo H_2O_2 nas células RWPE1, HPV10 e PC3, recorreu-se à análise morfológica por microscopia ótica. Após destacamento por tripsinização, é possível observar a existência de agregados celulares em todas as células não tratadas (controles). No entanto, quando tratadas com peróxido observa-se uma tendência para a desagregação celular. Além disso, nas células RWPE1 e HPV10, observam-se características morfológicas de morte celular por necrose (Figura 3.2.3-B e Figura 3.2.4-B) o que está de acordo com os estudos por citometria de fluxo. De facto como podemos observar nas figuras 3.2.3-B e 3.2.4-B as células RWPE1 e HPV10 evidenciam edema celular e rutura da membrana citoplasmática (Figura 3.2.3-B e 3.2.4-B), o que não se visualiza nas células PC3 (Figura 3.2.5-B), e está de acordo com a resistência destas últimas ao stresse oxidativo.

A



B

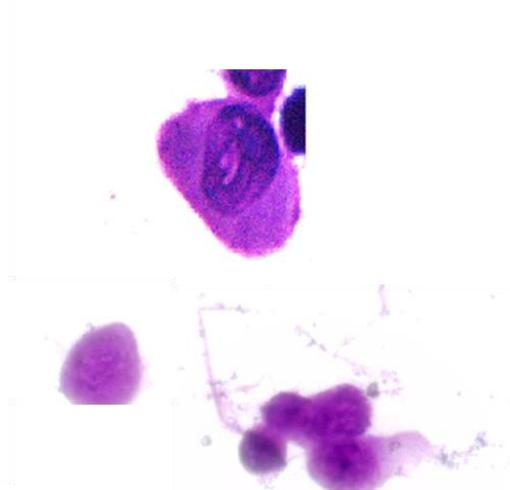


Figura 3.2.3 - Aspectos morfológicos da linha celular RWPE1 na ausência e após tratamento com peróxido de hidrogénio. As células foram cultivadas na ausência (controlo) (A) e presença de $500\mu M$ de H_2O_2 (B), ao longo de 24 horas. Após o período de incubação, foram efetuados esfregaços celulares e respetiva coloração com solução de May-Grünwald-Giemsa, de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. As células foram observadas ao microscópio com uma ampliação de 1000x.

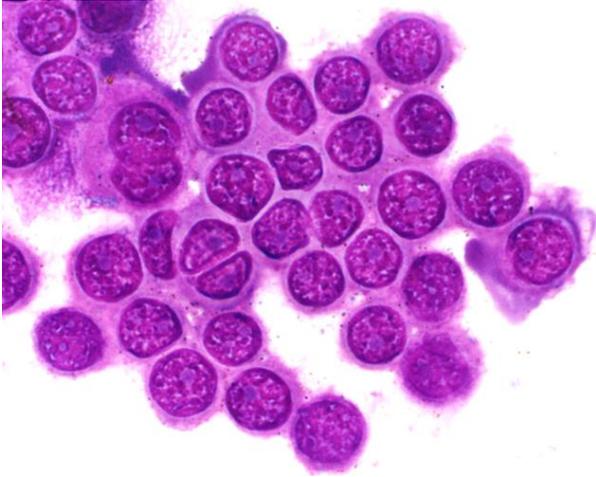
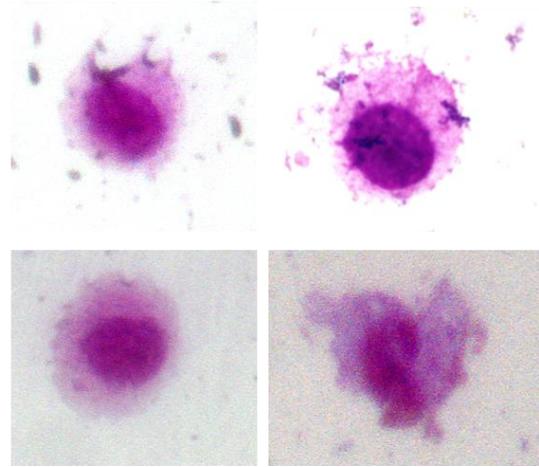
A**B**

Figura 3.2.4 - Aspectos morfológicos da linha celular HPV10 na ausência e após tratamento com peróxido de hidrogénio. As células foram cultivadas na ausência (controlo) (A) e presença de 500μM de H₂O₂ (B), ao longo de 24 horas. Após o período de incubação procedeu-se à preparação dos esfregaços de células e respetiva coloração com solução de May-Grünwald-Giemsa, de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. As células foram observadas ao microscópio com uma ampliação de 1000x.

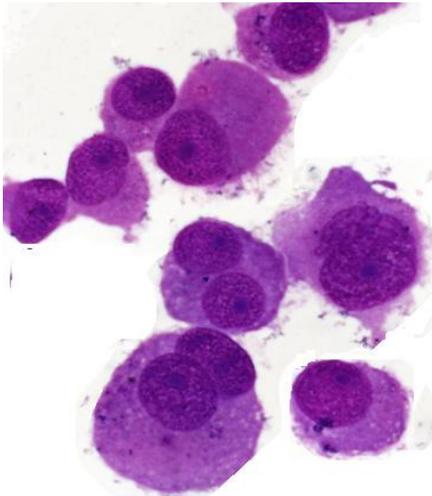
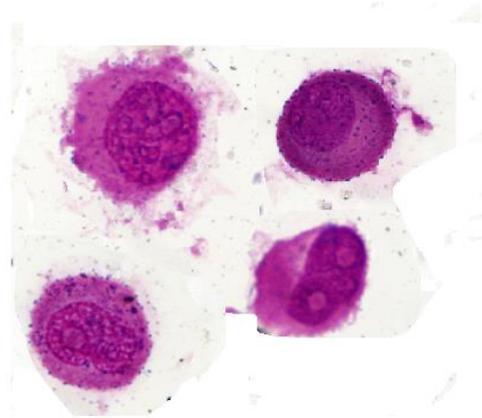
A**B**

Figura 3.2.5 - Aspectos morfológicos da linha celular PC3 na ausência e após tratamento com peróxido de hidrogénio. As células foram cultivadas na ausência (controlo) (A) e presença de 500μM de H₂O₂ (B), ao longo de 24 horas. Após o período de incubação procedeu-se à preparação dos esfregaços de células e respetiva coloração com solução de May-Grünwald-Giemsa, de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. As células foram observadas ao microscópio com uma ampliação de 1000x.

3.2.1.2 Efeito de peróxido de hidrogénio no potencial de membrana mitocondrial

Uma vez que a variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{mit}$) pode traduzir possíveis alterações na função mitocondrial, procedeu-se à sua avaliação por citometria de fluxo, através da utilização da sonda fluorescente 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol carbocianina iodada (JC1), de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Esta sonda entra seletivamente na mitocôndria e dependendo do potencial $\Delta\psi_{mit}$, exibe a forma monomérica (M) ou a agregada (A). Quando há diminuição do $\Delta\psi_{mit}$, ou seja, despolarização da membrana mitocondrial, a sonda predomina na forma monomérica, verificando-se aumento da razão monómeros/agregados (M/A) de JC1. A situação inversa verifica-se quando a membrana polariza, isto é, quando ocorre aumento do $\Delta\psi_{mit}$.

As diferenças na captação de sinal das diferentes formas da sonda estão representadas na figura 3.2.6 (A). Em condições basais, a linha celular RWPE1 é a que apresenta um $\Delta\psi_{mit}$ mais reduzido. Por oposição a linha celular PC3 é a que apresenta maior $\Delta\psi_{mit}$ o que poderá estar relacionado com a maior agressividade destas células e/ou com a resistência ao H_2O_2 . Contudo, após tratamento observa-se aumento da razão de M/A, traduzindo uma acentuada diminuição do $\Delta\psi_{mit}$, na presença de H_2O_2 , comparativamente às células não tratadas. Este efeito foi mais acentuado na linha celular RWPE1 (Figura 3.2.6 (B)) como publicados por Freitas e colaboradores (2012b).

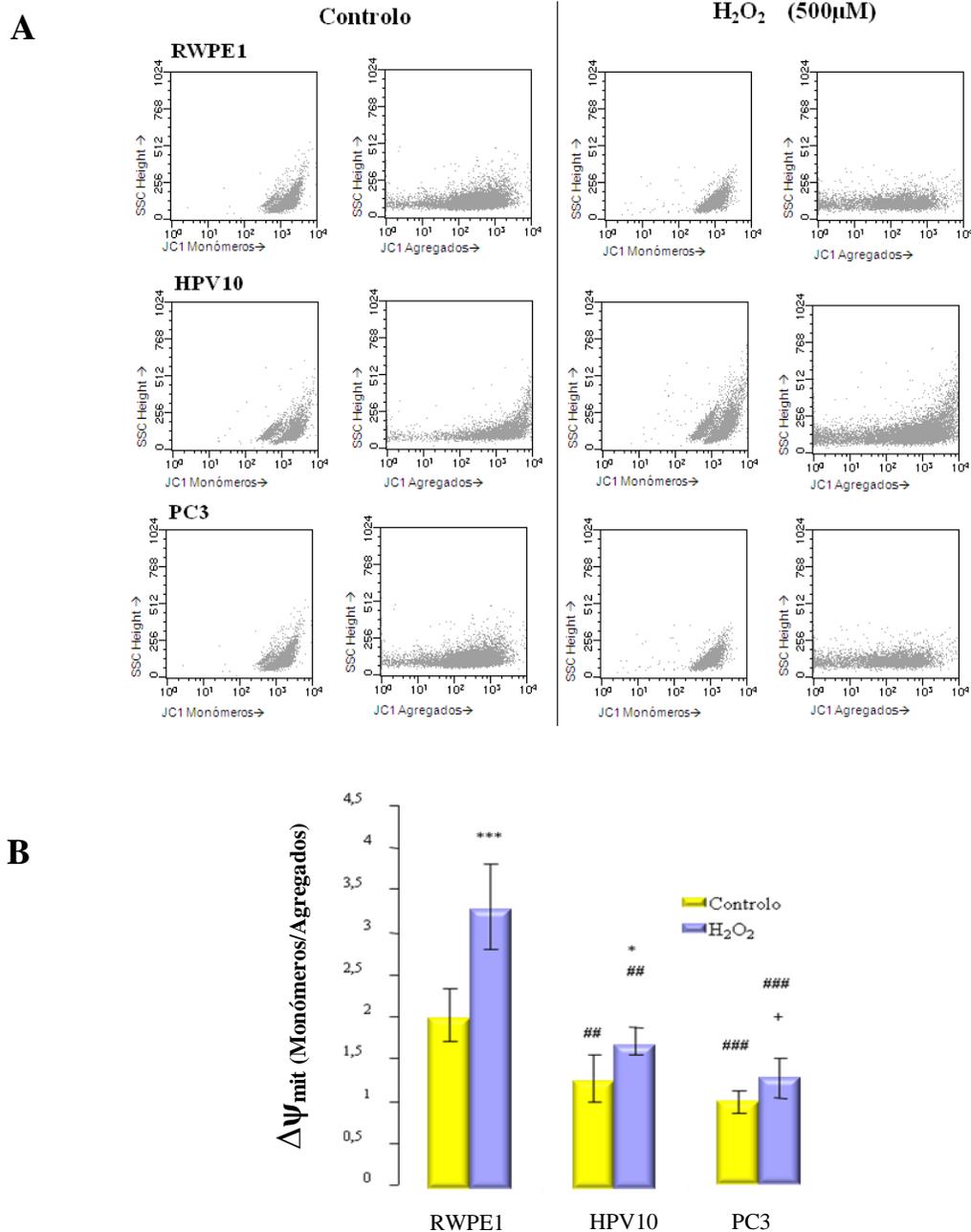


Figura 3.2.6 - Avaliação do efeito de H₂O₂ no $\Delta\Psi_{mit}$ nas linhas celulares RWPE1, HPV10 e PC3. Os *Dot-plots* em (A) representam os resultados de citometria após a aquisição de 10 000 eventos. As células foram cultivadas ao longo de 24 horas, na ausência (controlo) e presença de 500 μ M de H₂O₂. O $\Delta\Psi_{mit}$ foi analisado após marcação das células com 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol carbocianina iodada (JC1). Os resultados apresentados em (B) representam, a média \pm desvio padrão da razão Monómeros/Agregados (M/A) de, um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas no $\Delta\Psi_{mit}$ são consideradas para ***p<0,001 e *p<0,05 relativamente ao controlo (células não tratadas), ### p<0,001 e ##p<0,01 para PC3 e HPV10 relativamente a RWPE1, respetivamente e +p<0,05 para PC3 relativamente a HPV10.

3.2.1.3 Efeito de peróxido de hidrogénio no stresse oxidativo

3.2.1.3.1 Avaliação da produção de peróxidos

Para avaliar o efeito do peróxido de hidrogénio no stresse oxidativo, determinou-se a produção de peróxidos intracelulares por citometria de fluxo recorrendo à sonda 2',7' - diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF), resultante das duas subpopulações geradas no diagrama de pontos (*Dot Plot*) (Figura 3.2.7A).

Como podemos observar na Figura 3.2.7B, as células PC3 apresentam níveis de peróxidos significativamente superiores relativamente às células RWPE1 e HPV10. Além disso, verifica-se aumento da produção de peróxidos em todas as linhas celulares tratadas com 500 μ M de H₂O₂. Nas células RWPE1 e HPV10 essa variação é significativa, correspondendo a um aumento para o dobro de intensidade média de fluorescência (MIF) (Figura 3.2.7B).

3.2.1.3.2 Avaliação da peroxidação lipídica e do estado de antioxidação total

Para além da presença de 500 μ M de H₂O₂ se encontrar associada a aumento de peróxidos com indução de morte celular (aumento de cerca de 30%) e diminuição de $\Delta\psi_{mit}$ nas células de epitélio normal e de cancro localizado (RWPE1 e HPV10, respetivamente), relaciona-se também com um aumento significativo da peroxidação lipídica nas células HPV10 (de 0,7 para 0,9

μmol/g proteína) e diminuição de TAS nas RWPE1 (de 0,8 para 0,6 μmol/g proteína) e nas HPV10 (de 0,8 para 0,7 μmol/g proteína) (Figura 3.2.8).

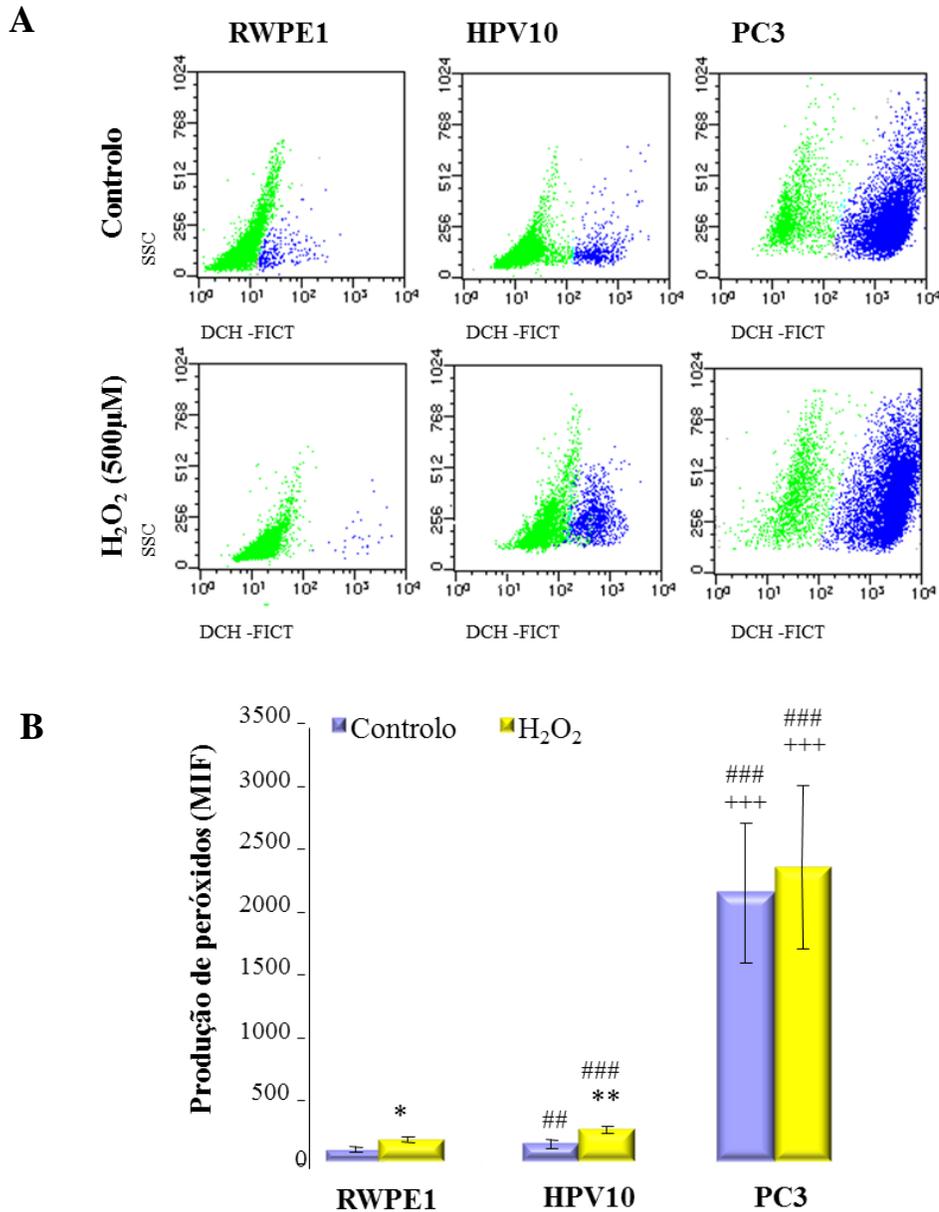


Figura 3.2.7 - Efeito de H₂O₂ na produção de peróxidos nas linhas celulares RWPE1, HPV10 e PC3. Os diagramas de pontos em (A) representam os resultados de citometria após a aquisição de 10 000 eventos. As células foram cultivadas ao longo de 24 horas, na ausência (controlo) e presença de 500μM de H₂O₂. A produção de peróxidos foi analisada após marcação das células com 5μM de 2',7' - diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Os resultados observados em (B), representam a média de intensidade de fluorescência (MIF) ± desvio padrão de, um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas na produção de peróxidos são consideradas para **p<0,01 e *p<0,05 relativamente ao controlo, ### p<0,001 e ##p<0,01 para PC3 e HPV10 relativamente a RWPE1, +++ p<0,001 para PC3 relativamente a HPV10.

Estes resultados confirmam a participação do stresse oxidativo na citotoxicidade induzida por H_2O_2 .

Embora a concentração de TAS diminua nas células PC3 (de 1,6 para cerca de 1,3 $\mu\text{mol/g}$ proteína), na presença de H_2O_2 , mantém-se mais elevado que nas outras linhas celulares. Estes resultados são acompanhados de valores basais de MDA mais reduzidos (0,5 $\mu\text{mol/g}$ proteína) que não aumentam significativamente na presença de H_2O_2 . Pelo exposto o estado de antioxição total e a peroxidação lipídica estão em concordância com a resistência destas células aos peróxidos. Além disso, esta característica poderá estar associada com a maior agressividade das células de metástase, necessária à progressão do cancro.

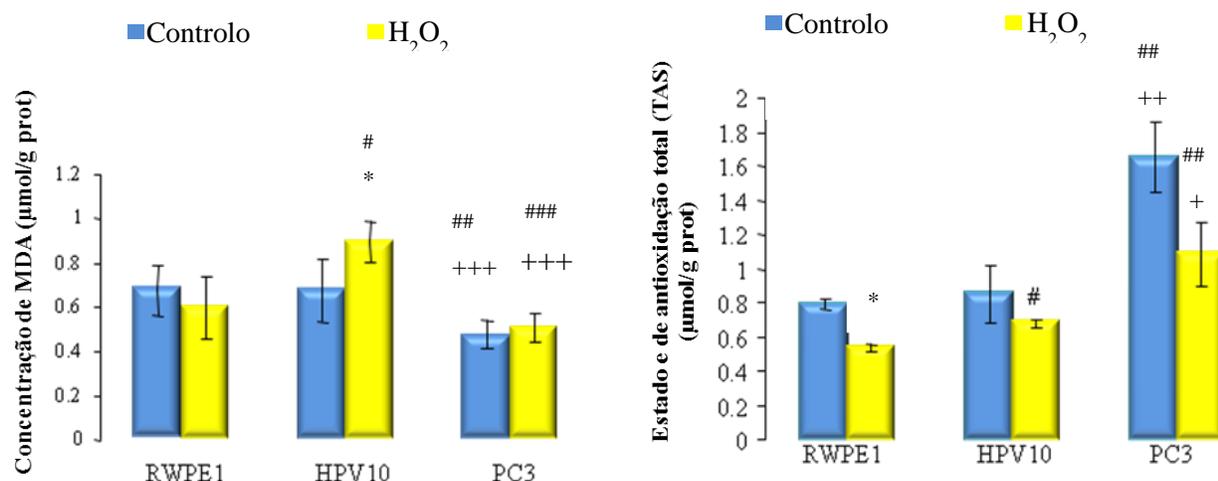


Figura 3.2.8 - Efeito do H_2O_2 na peroxidação lipídica e no estado de antioxição total das linhas celulares RWPE1, HPV10 e PC3. As células foram cultivadas ao longo de 24 horas, na ausência (controlo) e presença de $500\mu\text{M}$ de H_2O_2 . A peroxidação lipídica (A) foi avaliada pela determinação da produção de manonilaldeído (MDA). A quantificação de MDA e do estado de antioxição total (TAS) foi efetuada de acordo com o descrito na secção de materias e métodos. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas são consideradas para * $p < 0,05$ relativamente ao controlo; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ para HPV10 e PC3 relativamente a RWPE1; + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ para PC3 relativamente a HPV10.

3.2.1.3.3 Análise das defesas antioxidantes

No sentido de avaliar a contribuição das defesas antioxidantes na resposta ao aumento de ROS, foi determinado o conteúdo em glutatíon reduzido (GSH) e glutatona-S-transferase (GST) bem como a atividade da redutase do glutatíon (Gl-Red) e peroxidase do glutatíon (Gl-Px), em simultâneo, nas três linhas celulares (Figura 3.2.9).

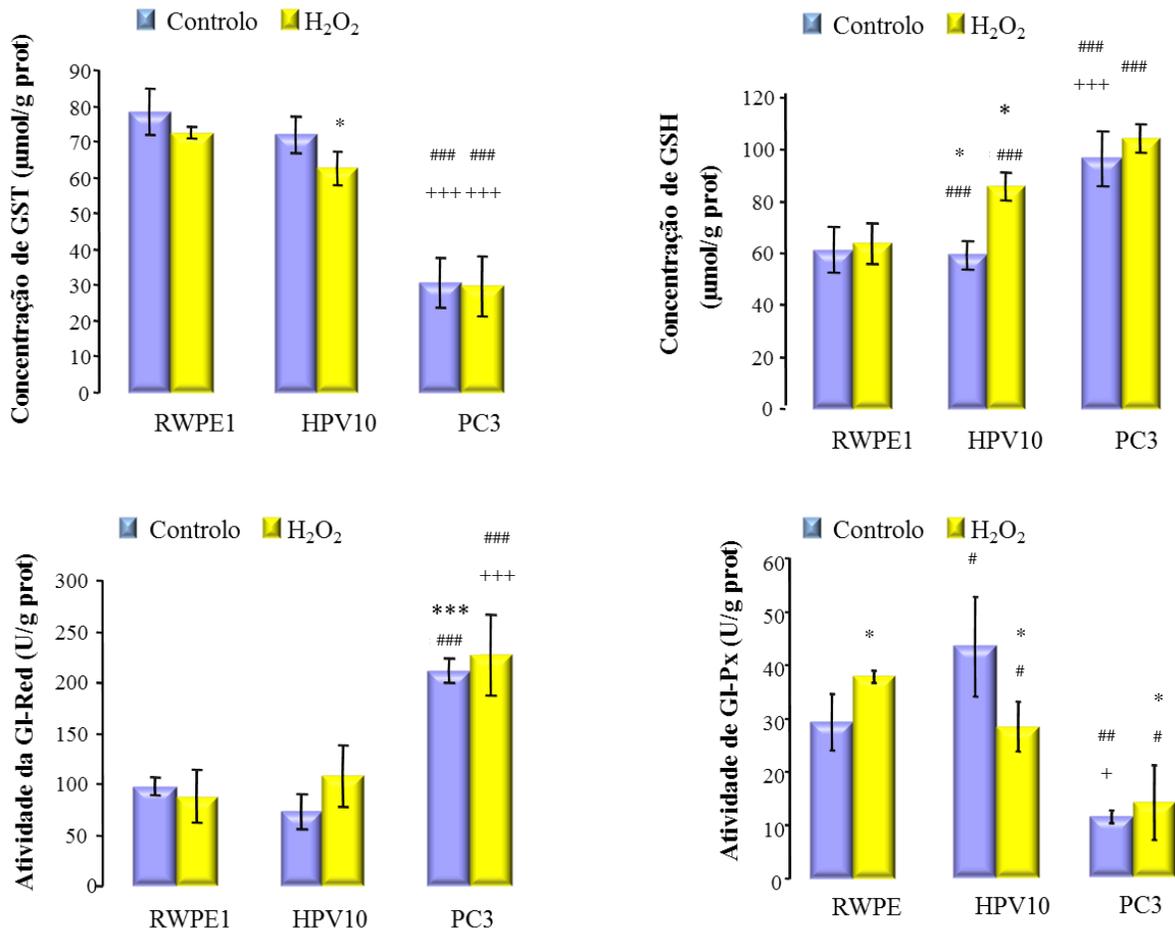


Figura 3.2.9 - Avaliação das defesas antioxidantes nas linhas celulares RWPE1, HPV10 e PC3. As células foram cultivadas ao longo de 24 horas, na ausência (controlo) e presença de 500µM de H₂O₂. A determinação de GST e de GSH e das atividades da Gl-Red e Gl-Px, foi efetuada de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados representam a média ± desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas são consideradas para *p<0,05 relativamente ao controlo, #p<0,05, ##p<0,01, e ###p<0,001 para HPV10 e PC3 relativamente a RWPE1 e +p<0,05 e +++p<0,001 para PC3 relativamente a HPV10.

Os resultados apresentados na figura 3.2.9, evidenciam nas células PC3, valores basais de GSH significativamente aumentados (95 $\mu\text{mol/g}$ proteína *vs* aproximadamente 60 $\mu\text{mol/g}$ proteína nas células RWPE1 e HPV10) bem como de atividade da Gl-Red (210 U/g proteína *vs* 100 e 75 U/mg proteína nas células RWPE1 e HPV10, respetivamente). Porém as células PC3 evidenciam valores basais de GST significativamente mais reduzidos (30 $\mu\text{mol/g}$ proteína *vs* 79 e 71 $\mu\text{mol/g}$ proteína nas células RWPE1 e HPV10, respetivamente) e atividade da Gl-Px significativamente menor (15 U/mg proteína *vs* 29 e 45 U/g proteína nas células RWPE1 e HPV10, respetivamente). Desta forma, o aumento da concentração de GSH e da atividade da Gl-Red, nas células PC3, deverão desempenhar um papel importante na manutenção do TAS elevado, bem como na proteção destas células contra a lesão oxidativa de biomoléculas, nomeadamente, de lípidos (Figura 3.2.8), contribuindo para a resistência ao stresse oxidativo. Por outro lado, a diminuição de Gl-Px está de acordo com o aumento de peróxidos verificados nestas células (Figura 3.2.7).

Na presença de 500 μM de H_2O_2 observa-se uma tendência para o aumento de GSH em todas as linhas celulares e da atividade da Gl-Red apenas nas células neoplásicas. O aumento destas defesas reforça a sua participação na proteção contra a ação das ROS nomeadamente, peróxidos, quer de origem exógena quer de origem endógena, as quais se encontram aumentadas ao longo da progressão da doença, de acordo com o presente modelo de estudo (Freitas *et al.*, 2012b).

3.2.2 Modulação do stresse oxidativo como estratégia terapêutica

3.2.2.1 Ação do dietil maleato

Para confirmar o papel do GSH e da atividade da Gl-Red na resistência ao stresse oxidativo nas células de metástase (PC3), induzimos diminuição das referidas defesas antioxidantes, através da utilização de dietil maleato (DEM), seguido do tratamento das células com 500 μ M de H₂O₂ e posterior avaliação da proliferação e morte celular. O composto DEM é um indutor da depleção de grupos tiol, que entram na constituição de GSH e Gl-Red (Freitas *et al.*, 2011b).

Por outro lado, pretendemos avaliar se a diminuição destas defesas poderá constituir uma potencial estratégia terapêutica em cancro da próstata.

A figura 3.2.10 (A) revela que o DEM induz um efeito inibitório na proliferação das células PC3, de forma dependente da concentração e do tempo de exposição. De facto, após 24 horas de tratamento com DEM, na concentração de 500 μ M, observa-se 50% de inibição da proliferação.

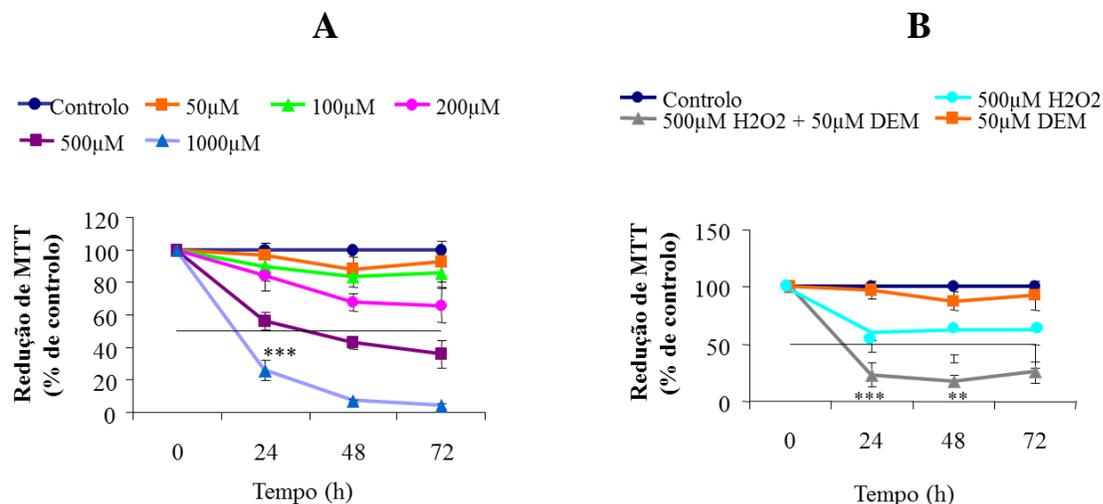


Figura 3.2.10 - Curva dose resposta do DEM nas células PC3. Os gráficos representam o efeito isolado do dietilmaleato (DEM) (na gama de concentrações de 50 a 1000μM) (A) e do DEM (50μM) combinado com 500μM de H₂O₂ (B), na proliferação celular das células PC3, ao longo de 72 horas. A proliferação celular foi avaliada por espectrofotometria através do ensaio colorimétrico de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico), como referido nos materiais e métodos. Os resultados são expressos em percentagem (%) de redução de MMT por comparação com o controlo (células não tratadas) e representam a média ± desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas são consideradas para **p<0,01 e ***p<0,001 relativamente ao controlo.

Contudo, quando se associou 50μM de DEM com 500μM de H₂O₂ observou-se um efeito sinérgico, uma vez que se verificou acentuada diminuição da proliferação celular, comparativamente ao efeito isolado dos compostos, atingindo-se às 24 horas uma redução de cerca de 80% (Figura 3.2.10B).

Além do efeito anti-proliferativo, foi avaliado nestas condições, e após 24 horas de incubação, o tipo de morte celular, por citometria de fluxo, recorrendo à marcação das células com Anexina V/Iodeto de propídio, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Como podemos

verificar na figura 3.2.11, nas células tratadas com 500 μ M de H₂O₂ em combinação com DEM, observa-se um aumento significativo, para o dobro, da morte celular mediada maioritariamente por apoptose tardia vs necrose em comparação com as células tratadas com apenas 500 μ M de H₂O₂ (Freitas *et al.*, 2012). Pelo exposto os resultados confirmam o efeito do DEM na ressensibilização das células aos peróxidos.

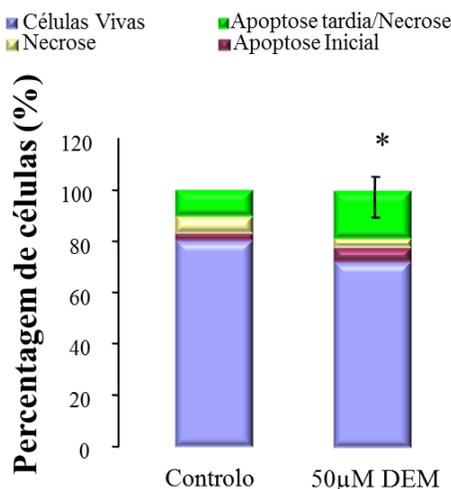


Figura 3.2.11 - Avaliação por citometria de fluxo do efeito de combinado de 50 μ M de DEM com 500 μ M de H₂O₂ no tipo de morte celular. As células foram cultivadas na presença de 500 μ M de H₂O₂ de forma isolada (controlo) e combinada com 50 μ M de DEM durante 24 horas. A viabilidade e morte celular foram analisadas por citometria de fluxo através da marcação das células com Anexina V em combinação com o iodeto de propídio, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Os resultados de citometria expressos em percentagem (%) foram obtidos após a aquisição de 10 000 eventos e representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas na morte celular por apoptose tardia vs necrose são consideradas para * $p < 0,05$ relativamente ao controlo.

Por outro lado, para confirmar alguns dos mecanismos envolvidos na ação do DEM sobre a ressensibilização das células PC3 aos peróxidos (500 μ M de H₂O₂), avaliaram-se os níveis de GSH e a atividade da Gl-Red, após tratamento das células com o respetivo composto (Figura 3.2.12). Nestas condições, observa-se uma diminuição significativa da concentração de GSH (A)

e depleção da atividade da enzima Gl-Red (B) o que pode contribuir para a sensibilidade das células aos peróxidos. Estes resultados reforçam a importância das defesas supracitadas na resistência ao stresse oxidativo e evidenciam a relevância da modulação do stresse oxidativo com indução da diminuição de GSH e da atividade da Gl-Red, como eventual estratégia terapêutica no cancro da próstata.

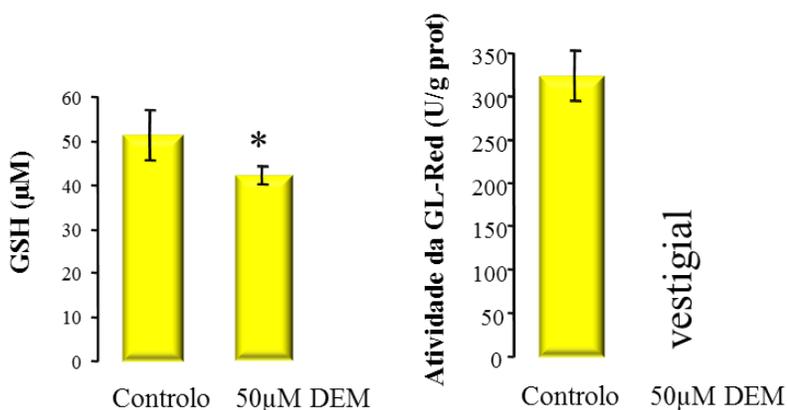


Figura 3.2.12 - Efeito do DEM na concentração de GSH e na atividade da Gl-Red nas células PC3. Para a determinação de GSH (µM) e da atividade da Gl-Red (U/g prot), as células foram cultivadas na ausência (controlo) e presença de 50µM de DEM ao longo de 24 horas, de acordo com o descrito na secção de materiais métodos. Os resultados obtidos representam a média ± desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas são consideradas para *p<0,05 relativamente ao controlo.

3.2.2.2 Avaliação do efeito terapêutico do selenito de sódio em combinação com docetaxel nas células PC3

O selénio tem sido associado à prevenção do cancro da próstata. No entanto, concentrações elevadas deste composto relacionam-se com a indução de apoptose (Menter *et al.*, 2000; Husbeck e Peehl, 2005; Li *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2009) em parte resultante do aumento de anião superóxido e diminuição de defesas antioxidantes, nomeadamente, da razão GSH/GSSG

(Husbeck e Peehl, 2005, Xiang *et al.*, 2009). Desta forma, tendo em conta a capacidade de modulação do stresse oxidativo, o selenito de sódio apresenta-se como um potencial agente terapêutico do cancro da próstata.

Para confirmar o pressuposto e avaliar a sua relevância como adjuvante da terapêutica convencional, a linha celular de metástase (células PC3) foi tratada ao longo de 72 horas com selenito de sódio, de forma isolada, e combinada com docetaxel, o fármaco de eleição na quimioterapia do cancro da próstata. Este composto atua através da sua ligação à subunidade β da tubulina IV, com consequente estabilização de microtúbulos (Para revisão ver Freitas *et al.*, 2012a).

3.2.2.2.1. Efeito de selenito de sódio e do docetaxel na proliferação celular

As células foram tratadas com docetaxel (na concentração de 5 a 500nM) (A) e selenito de sódio (B) (na concentração de 10nM a 10 μ M) de forma isolada e combinada (100nM de docetaxel e 2,5 μ M de selenito de sódio) ao longo de 72 horas, de acordo com o descrito nos materiais e métodos.

Como se pode observar na figura 3.2.13 cada um dos compostos induz diminuição da proliferação celular de modo dependente da concentração e do tempo de exposição. As concentrações de docetaxel e selenito de sódio para as quais se observa 50% de inibição da proliferação celular (IC50), após 24h de incubação correspondem aproximadamente a 500nM (Figura 3.2.13 A) e 10 μ M (Figura 3.2.13B), respetivamente. Da mesma forma, o IC25 (concentração para a qual se observa 25% de inibição da proliferação) é atingido para a concentração de 100nM de docetaxel e 2,5 μ M de selenito de sódio. A combinação dos

compostos, nestas concentrações, resultou num efeito de potenciação na inibição da proliferação celular, isto é, superior ao efeito somado de cada um dos compostos, individualmente (Figura 3.2.13 B). Assim, nestas condições, a inibição da proliferação celular corresponde a 67% enquanto nas células tratadas com os compostos em monoterapia com docetaxel esta foi apenas de 22% e com selenito de sódio foi de 24% (Freitas *et al.*, 2011).

Os estudos de proliferação celular foram complementados com a análise do ciclo celular representado pelos histogramas da figura 3.2.14 e cujos resultados estão evidenciados na tabela III.2.1.

Como se pode verificar na referida tabela, o selenito de sódio e o docetaxel inibem o ciclo celular na fase de síntese (S) (44,6% vs 20,5%) e G2M (63,5% vs 14,6%) respetivamente, enquanto a combinação dos dois compostos resulta no aumento da percentagem das células nas fases S (43,0% vs 20,5%) e G2M (33,9% vs 14,6%) , refletindo o efeito sinérgico, observado nos estudos de proliferação celular.

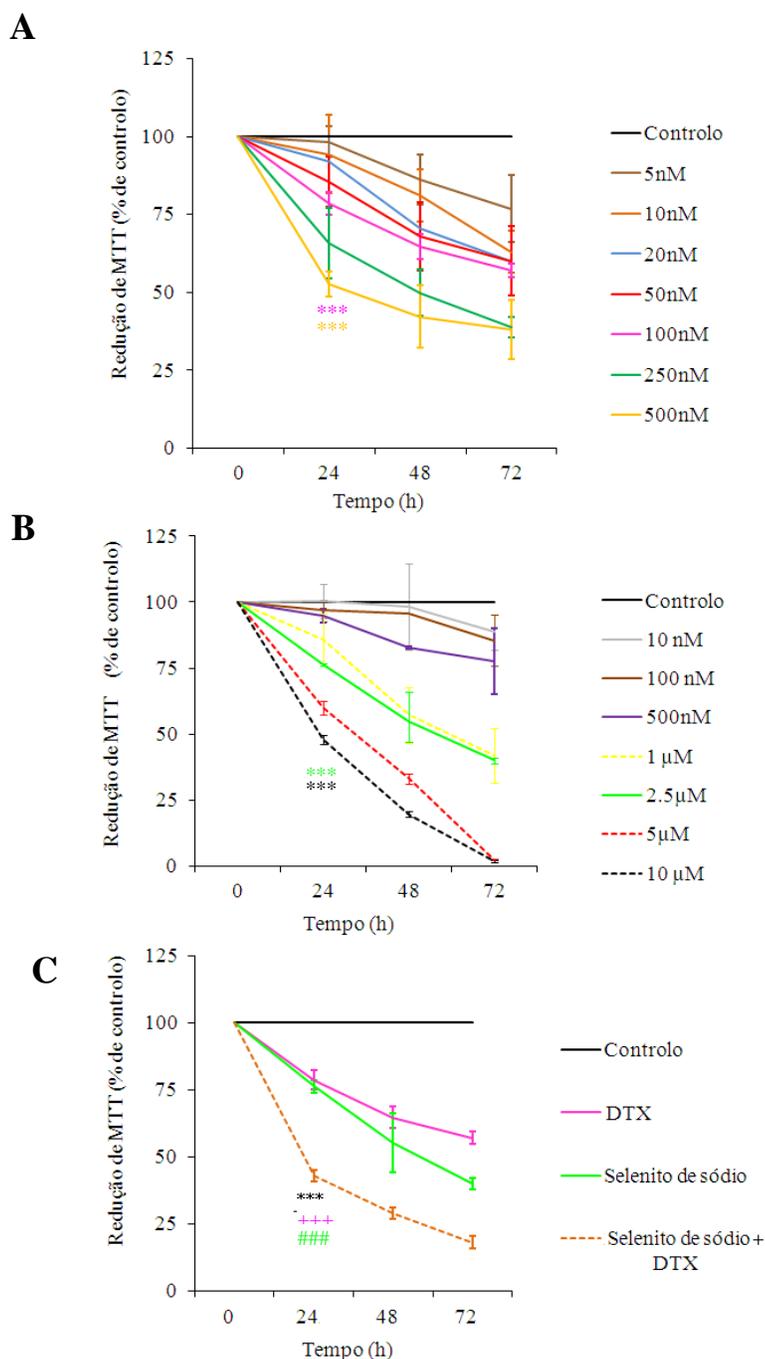


Figura 3.2.13 - Curva dose resposta do docetaxel e selenito de sódio em monoterapia e em associação nas células PC3. A figura representa o efeito isolado de docetaxel (DTX) na gama de concentrações de 5 a 500nM (A), do selenito de sódio (B) em concentrações de 10nM a 10µM e da combinação de 100nM de docetaxel com 2,5µM de selenito de sódio (C), na proliferação celular das células PC3, ao longo de 72 horas. A proliferação celular foi avaliada por espectrofotometria através do ensaio colorimétrico de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico). Os resultados são expressos em percentagem (%) de redução de MTT por comparação com o controlo (células não tratadas) e representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas na proliferação são consideradas para $***p < 0,001$, relativamente ao controlo, $+++p < 0,001$ relativamente ao efeito isolado de docetaxel (100nM) e $###p < 0,001$ relativamente ao efeito isolado de selenito de sódio (2,5µM).

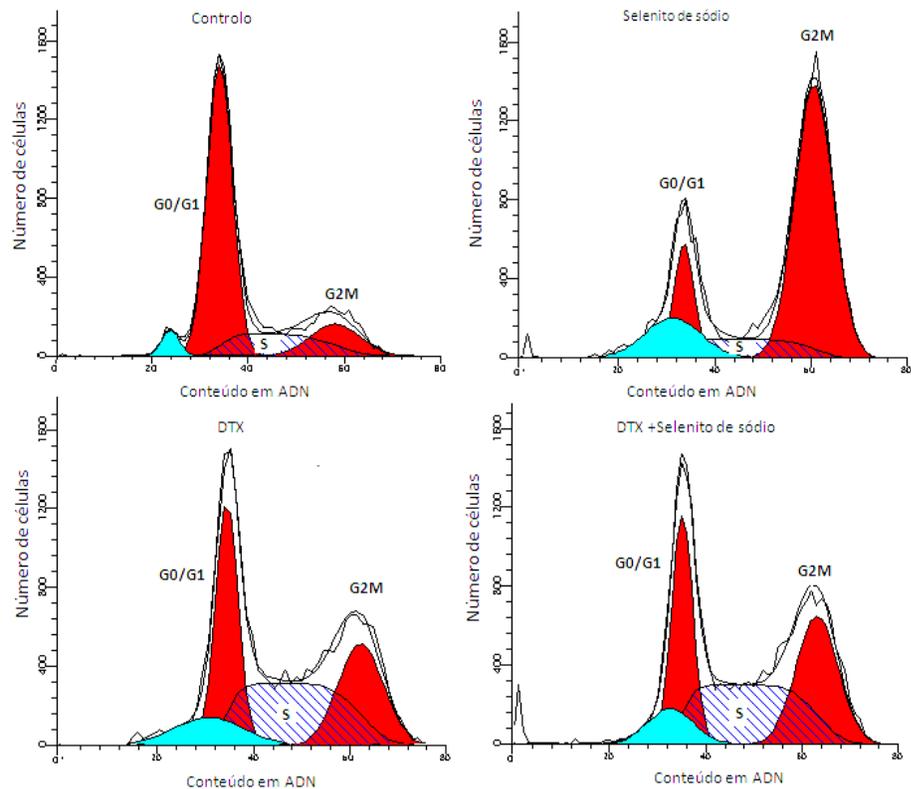


Figura 3.2.14 - Histograma representativo da distribuição das células PC3 pelas diferentes fases do ciclo celular. Estão representados o controlo (células não tratadas), bem como as células tratadas com docetaxel (DTX) e selenito de sódio de forma isolada e em associação (DTX + selenito de sódio).

Tabela III.2.1 - Efeito do selenito de sódio e do docetaxel em monoterapia e em associação no ciclo celular da linha PC3

Ciclo celular (%)	G0/G1	G2M	S
Controlo	64,9	14,6	20,5
100 nM de docetaxel	*17,2	*63,5	19,3
2,5µM de selenito de sódio	*29,3	26,1	*44,6
100 nM de docetaxel + 2,5µM de selenito de sódio	*23,1	*33,9	*43,0

*Alterações significativas relativamente ao controlo (células não tratadas) para *p<0,05.

3.2.2.2.2 Efeito de selenito de sódio e do docetaxel na viabilidade e morte celular

Para avaliar se o efeito anti-proliferativo resultante da combinação dos dois compostos é acompanhado de indução de citotoxicidade, isto é, de morte celular, as células foram incubadas ao longo de 24 horas, com os dois compostos, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo, recorrendo à marcação das células com Anexina V em combinação como iodeto de propídio, como previamente descrito.

Os resultados evidenciados na figura 3.2.15 confirmam que as células PC3, em condições basais, têm uma viabilidade elevada (cerca de 90%), o que está de acordo com os resultados anteriores. Na presença de 100nM de docetaxel não se observou morte celular (Figura 3.2.15) apesar de esta concentração inibir a proliferação celular (Figura 3.2.13). No entanto, a inibição da proliferação celular pelo selenito de sódio (Figura 3.2.13), foi acompanhada de um aumento significativo de morte, maioritariamente por apoptose tardia *vs* necrose (26,3% *vs* 1,4%) (Figura 3.2.15). Para além da combinação dos compostos apresentar um efeito de potenciação na inibição da proliferação celular, induziu morte celular, a qual aumentou de 30 para 50% relativamente ao selenito de sódio e de 10 para 50% relativamente ao docetaxel. A morte celular resultante ocorreu maioritariamente por apoptose e apoptose tardia *vs* necrose (Figura 3.2.15).

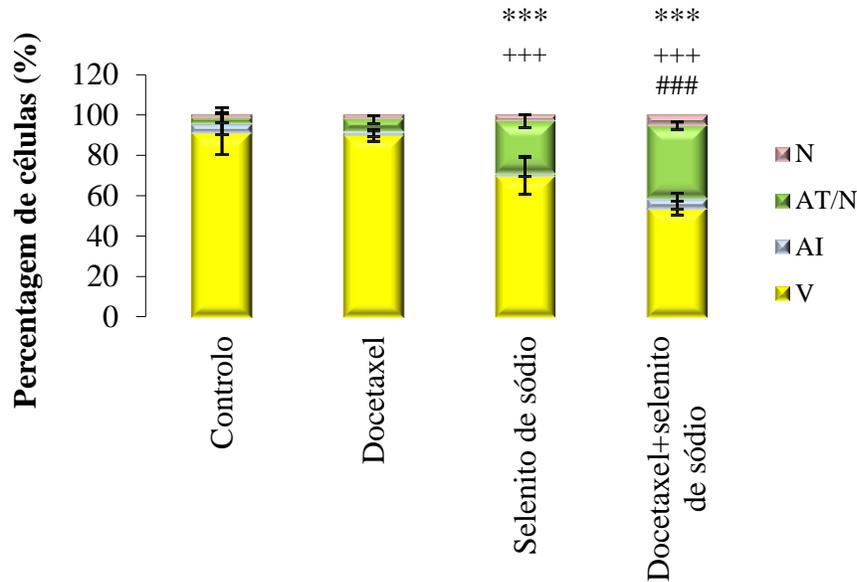


Figura 3.2.15 - Efeito do docetaxel e do selenito de sódio na viabilidade e morte das células PC3. Os estudos de morte celular foram realizados para as células tratadas com docetaxel (100nM), selenito de sódio (2,5 μ M), de forma isolada e combinada e para células não tratadas (controle), após 24 horas de incubação com os compostos. A viabilidade celular foi analisada por citometria de fluxo através da marcação das células com Anexina V em combinação como iodeto de propídio, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Legenda de cores: amarelo - células viáveis, azul - células em apoptose inicial, verde - células em apoptose tardia vs necrose e rosa - células em necrose. Os resultados são expressos em porcentagem (%) e representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas na apoptose tardia vs necrose são consideradas para *** $p < 0,001$ relativamente ao controle, +++ $p < 0,001$ relativamente ao docetaxel e ### $p < 0,001$ relativamente ao selenito de sódio.

Por outro lado nas células tratadas com selenito de sódio isolado e em associação com docetaxel, observou-se diminuição acentuada do $\Delta\psi_m$ como evidenciado na figura 3.2.16. Estas alterações são traduzidas pelo aumento significativo da relação monómeros/agregados (M/A). Na presença de selenito de sódio observou-se um aumento de 5 vezes relativamente ao controle. O efeito combinado dos fármacos induziu um aumento de 4 vezes relativamente ao selenito de sódio e de 30 vezes relativamente ao docetaxel. Desta forma, estes resultados são concordantes com os estudos de proliferação e de morte celular. Também de acordo com os resultados anteriores, e apesar do docetaxel (100 nM) induzir aproximadamente 25% de inibição da proliferação celular, não se observa diminuição do $\Delta\psi_m$ nas células tratadas com este composto isoladamente.

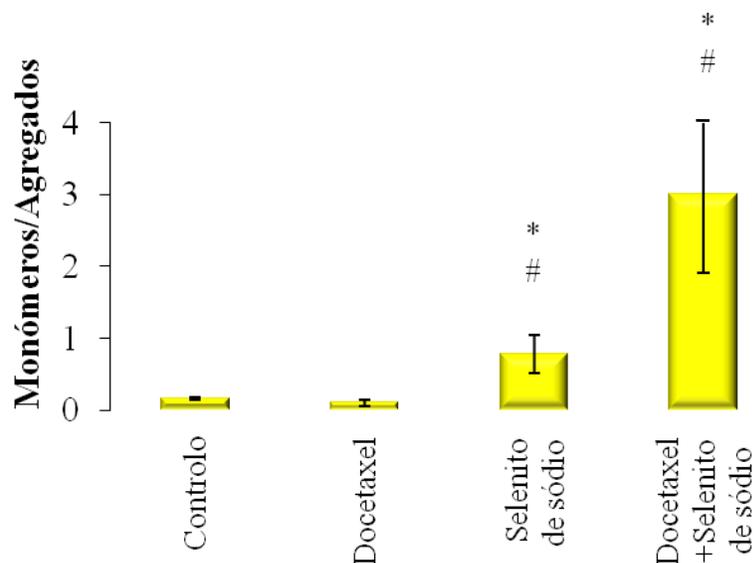


Figura 3.2.16 - Efeito do docetaxel e do selenito de sódio no $\Delta\Psi_{mit}$ das células PC3. Os estudos da $\Delta\Psi_{mit}$ foram realizados nas células, na ausência (controlo) e após 24 horas de incubação de tratamento com docetaxel (100nM) e selenito de sódio (2,5 μ M), de forma isolada e combinada (docetaxel + selenito de sódio). O $\Delta\Psi_{mit}$ foi analisada por citometria de fluxo através da marcação das células com a sonda JC1, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Os resultados representam a média da razão Monómeros/Aggregados \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para * p <0,05 relativamente ao controlo, e # p <0,05 relativamente ao docetaxel e selenito de sódio.

3.2.2.2.3 Efeito de selenito de sódio e do docetaxel na expressão de moléculas envolvidas na apoptose

O mecanismo de morte celular por apoptose, envolve a participação de diversas proteínas como o Citocromo C, a Caspase 3, a BAX ou a BCL2. As proteínas BCL2 e BAX pertencem à família das proteínas BCL2 e desempenham uma função anti e pró-apoptótico respetivamente (Cory, e Adams, 1998). Para analisar a participação das referidas proteínas na morte celular induzida pelo selenito de sódio e deste em associação com docetaxel, procedeu-se ao tratamento das células com os compostos, ao longo de 24 horas, nas condições descritas. Posteriormente marcaram-se

as células PC3 com anticorpos monoclonais, para análise por citometria de fluxo. A figura 3.2.17 demonstra que, na presença de docetaxel isoladamente, não existe aumento significativo da expressão destas moléculas, comparativamente ao controlo, o que está de acordo com os resultados de viabilidade celular. No entanto, nas células tratadas com 2,5µM de selenito de sódio e deste em combinação com docetaxel, comparativamente às células não tratadas (controlo), observa-se aumento da expressão de Citocromo C (536 e 556 vs 416 MIF, respetivamente), de Caspase 3 (189 e 145 vs 93 MIF, respetivamente) e da razão BAX/BCL2 (1,5 e 1,7 vezes, respetivamente). O efeito combinado destes compostos não induz aumento significativo nestes parâmetros por comparação com o verificado nas células tratadas com selenito de sódio isoladamente.

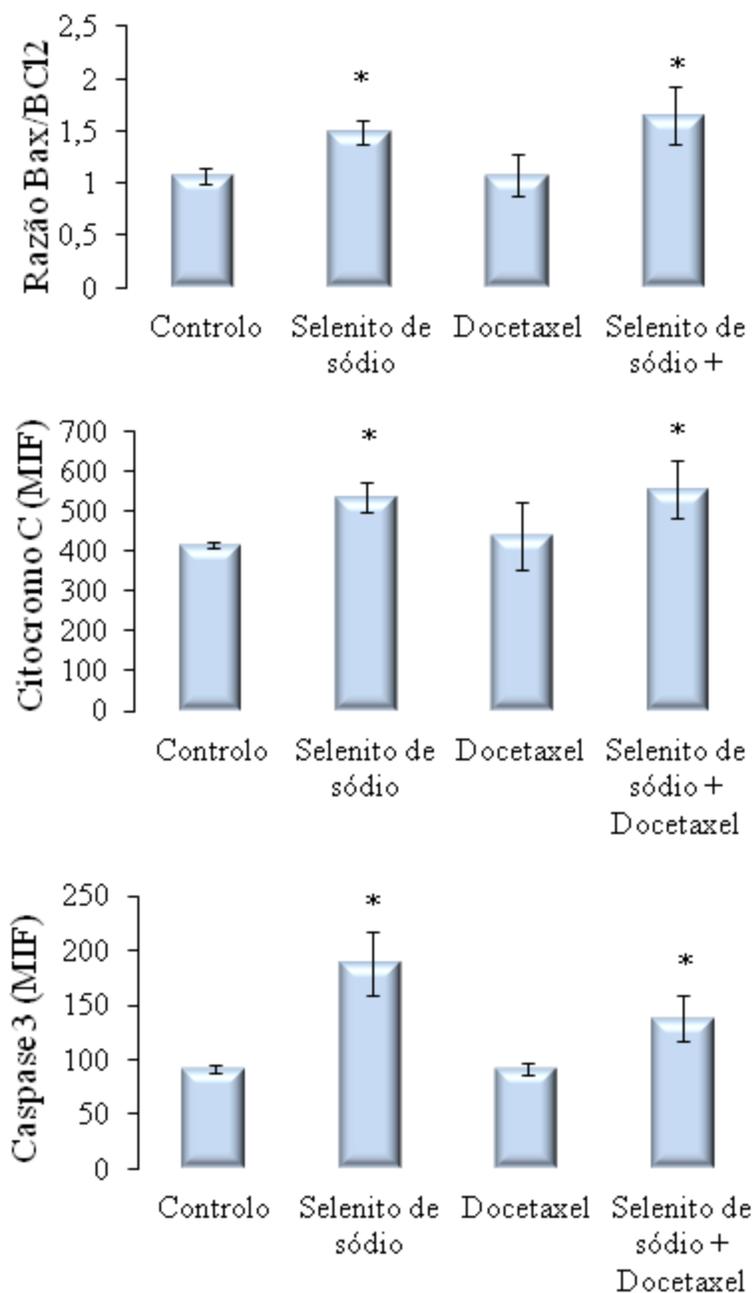


Figura 3.2.17 - Efeito do selenito de sódio e do docetaxel na razão BAX/BCL2 e na expressão de citocromo C e de caspase 3 nas células PC3. Os estudos foram realizados nas células tratadas com docetaxel (100nM), selenito de sódio (2,5 μ M), de forma isolada e em associação (docetaxel + selenito de sódio) e nas células não tratadas (controlo), após 24 horas de incubação. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais marcados com sondas fluorescentes, como descrito nos materiais e métodos, para posterior análise por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para * $p < 0,05$ vs controlo.

3.2.2.2.4 Efeito de selenito de sódio e do docetaxel no stresse oxidativo

A apoptose, induzida pelo selenito de sódio, tem sido atribuída, em parte ao efeito pró-oxidante deste composto, associado ao aumento de anião superóxido (Xiang *et al.*, 2009).

Assim, começámos por estudar a concentração basal de anião superóxido nas diferentes linhas celulares (figura 3.2.18). Para o efeito, as células foram marcadas com a sonda DHE, de acordo com o descrito nos materiais e métodos, e analisadas por citometria de fluxo. Como se pode observar, este anião está significativamente aumentado nas células de PC3 (70 vs 40 MIF nas RWPE1 e nas HPV10), o que poderá estar relacionado com o aumento da produção intracelular de peróxidos, referido anteriormente (figura 3.2.7), uma vez que o anião superóxido é convertido em peróxido de hidrogénio por ação da enzima Mn-SOD (Grek e Tew, 2010).

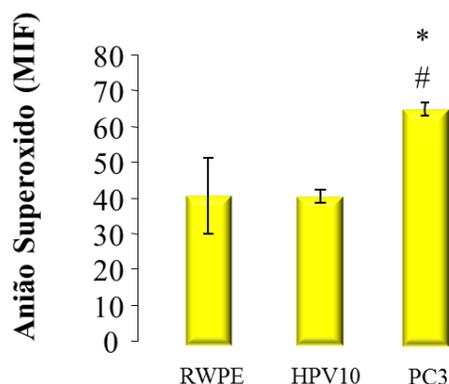


Figura 3.2.18 - Análise da expressão intracelular de anião superóxido nas linhas celulares RWPE1, HPV10 e PC3. A expressão de anião superóxido foi analisada por citometria de fluxo, após marcação das células com a sonda DHE. Os resultados observados na figura representam a média de intensidade de fluorescência (MIF) \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas na produção de anião superóxido das células PC3 relativamente às das outras células são consideradas para * $p < 0,05$ e # $p < 0,05$ vs HPV10 e RWPE1, respetivamente.

Posteriormente fomos analisar o efeito do selenito de sódio na produção de anião superóxido. Os nossos resultados corroboram as observações de Xiang e colaboradores (2009), como podemos verificar na figura 3.2.19. De facto, nas células tratadas com selenito de sódio observa-se um aumento significativo (10%) de anião superóxido.

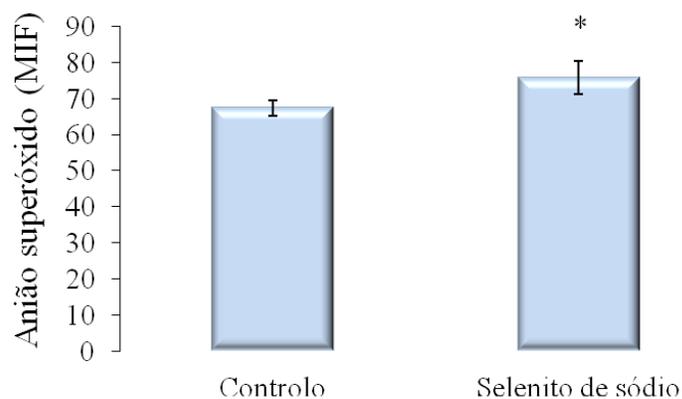


Figura 3.2.19 - Avaliação da produção de anião superóxido na linha celular PC3. As células foram tratadas ao longo de 24 horas com 2,5 μM de selenito de sódio nas condições descritas. A produção de peróxidos foi analisada por citometria de fluxo, após marcação com a sonda DHE e após a aquisição de 10 000 eventos. Os resultados expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF), representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para $*p < 0,05$ vs controlo.

Para avaliar a relação da morte celular induzida por selenito de sódio e docetaxel com a produção de peróxidos as células tratadas e não tratadas foram marcadas com a sonda fluorescente 2,7-DCFH-DA. A figura 3.2.20 evidencia uma diminuição significativa da produção de peróxidos na presença de 2,5 μM de selenito de sódio isoladamente (800 vs 1400 MIF) e em combinação com 100 nM de docetaxel (400 vs 1400 MIF), relativamente ao controlo.

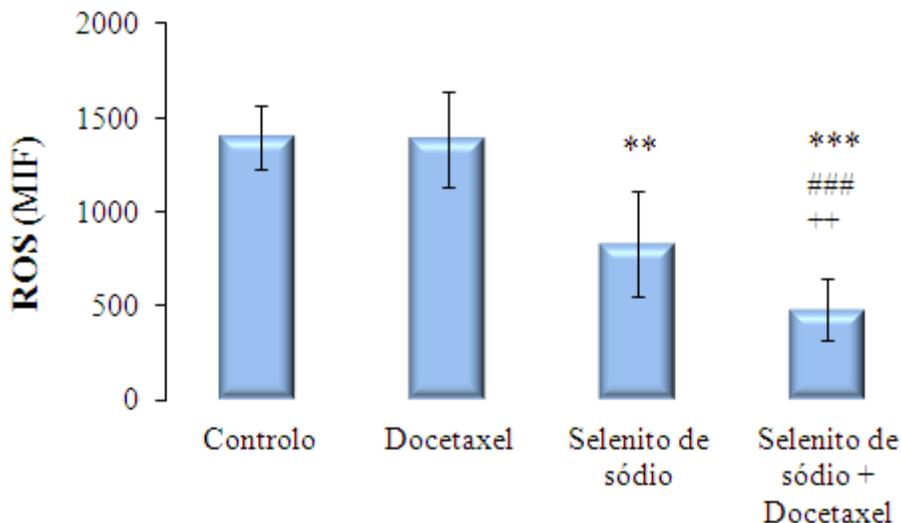


Fig. 3.2.20 - Efeito do selenito de sódio e do docetaxel na produção de peróxidos nas células de PC3. As células foram tratadas ao longo de 24 horas com docetaxel (100nM) e selenito de sódio (2,5 μ M), de forma isolada e combinada, após 24 horas de incubação. O controlo é representado por células não tratadas. A avaliação de peróxidos foi analisada por citometria de fluxo, após marcação das células com a sonda DCFH-DA e após a aquisição de 10 000 eventos. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ relativamente ao controlo; para ++ $p < 0,01$ relativamente ao selenito de sódio e para ### $p < 0,001$ relativamente ao docetaxel.

3.2.3 Contribuição da função mitocondrial na progressão do cancro da próstata

A mitocôndria é considerada organelo intracelular maioritariamente responsável pela produção de ROS (Freeman *et al.*, 1986). Tendo por base o aumento da produção de peróxidos intracelulares ao longo da progressão da doença, particularmente, na fase de metastização e de acordo com os resultados obtidos no presente modelo de estudo, bem como o aumento de $\Delta\Psi_{mit}$, pretendeu-se avaliar o envolvimento da mitocôndria, na progressão do cancro da próstata. Para

além da determinação dos valores basais de peróxidos e de anião superóxido já apresentados, analisámos a atividade dos complexos I, II+III (redutase do succinato-citocromo C, SCCR) e da sintase do citrato.

3.2.3.1 Atividade dos complexos da cadeia respiratória e da sintase do citrato

Os resultados da figura 3.2.21 (A) evidenciam um aumento significativo da sintase do citrato na linha celular de metástase PC3, aproximadamente 3 vezes superior ao das outras linhas celulares, traduzindo um maior número de mitocôndrias. Assim, os resultados sugerem que uma maior quantidade de mitocôndrias poderá estar relacionada com a progressão da doença. Além disso, os resultados são concordantes com o $\Delta\psi_{mit}$ mais elevado e o aumento da produção de ROS nesta linha celular. Nas células PC3 também se observa aumento da atividade do complexo I, da cadeia respiratória, como representado na figura 3.2.21 B.

Por outro lado, verifica-se diminuição da atividade dos complexos II/III (Figura 3.2.21 C) em função da sintase do citrato, isto é, em função do número de mitocôndrias, em ambas as linhas celulares de cancro da próstata, sendo esta diferença mais acentuada nas células de metástase PC3.

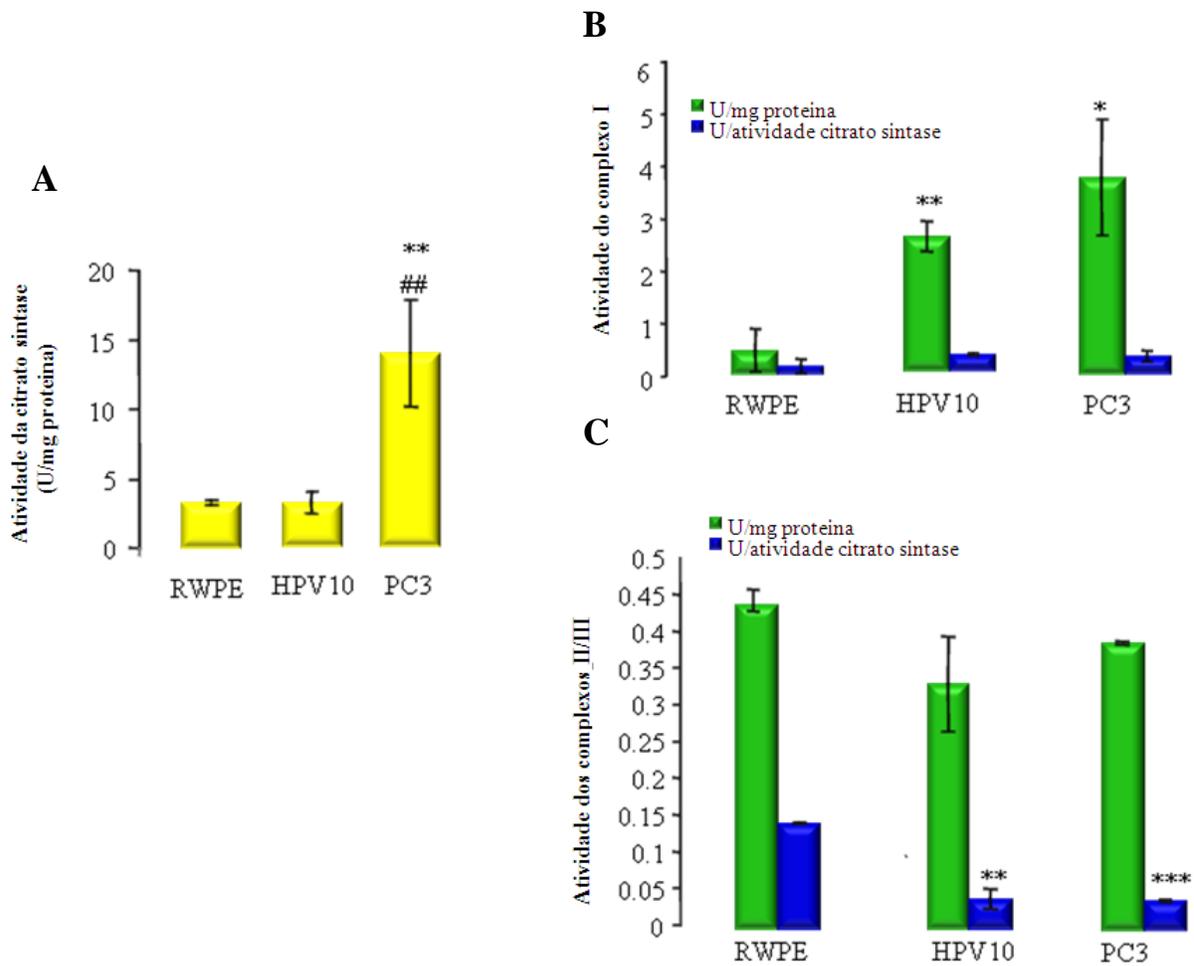


Figura 3.2.21 - Avaliação da função mitocondrial nas linhas celulares RWPE1, HPV10 e PC3. A atividade da sintase do citrato (A) e dos complexos I e II/III da cadeia respiratória mitocondrial foram avaliados nas condições basais, nas 3 linhas celulares, nas condições ótimas de crescimento. Os resultados observados representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para PC3 ou HPV10 relativamente a RWPE1 e # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ para PC3 relativamente a HPV10.

3.2.4 Ação dos compostos presentes no fumo do tabaco nas células de cancro da próstata

3.2.4.1 Efeito de hidrocarbonetos poliaromáticos cíclicos na proliferação celular

Como referido na introdução deste trabalho, o fumo do tabaco inclui na sua composição hidrocarbonetos poliaromáticos cíclicos (PAHs), muitos dos quais com potencial efeito carcinogénico. Além disso, a exposição ao fumo do tabaco induz aumento de ROS envolvidas na carcinogénese da próstata (Valavanidis *et al.*, 2009; Biswas e Rahman, 2009). No entanto, a relação entre os hábitos tabágicos e o desenvolvimento e progressão desta neoplasia não está totalmente esclarecida.

Para estudar o efeito da exposição ao fumo do tabaco na progressão do cancro da próstata, as linhas celulares RWPE1, HPV10 e PC3 foram tratadas com PAHs, nomeadamente benzo(a)pireno, pireno, criseno e benzo(K)fluoranteno, em concentrações de 10nM, 100nM e 1µM ao longo de 72 horas, nas condições ótimas de crescimento, de acordo com a metodologia previamente referida.

Os resultados evidenciados na figura 3.2.22 permitiram concluir que o efeito dos compostos na proliferação celular é dependente da concentração, do tipo de composto, do tipo de linha celular e do tempo de exposição. De uma forma geral, estes compostos possuem a capacidade de induzir proliferação celular, durante as primeiras 48 horas de incubação, nas concentrações testadas. No entanto, na linha celular de epitélio normal, RWPE1, este efeito não ultrapassa as 24 horas. Por

outro lado, nas células HPV10 incubadas com benzo(a)pireno e benzo(K)fluoranteno, é onde o efeito proliferativo é mais acentuado ao longo do tempo.

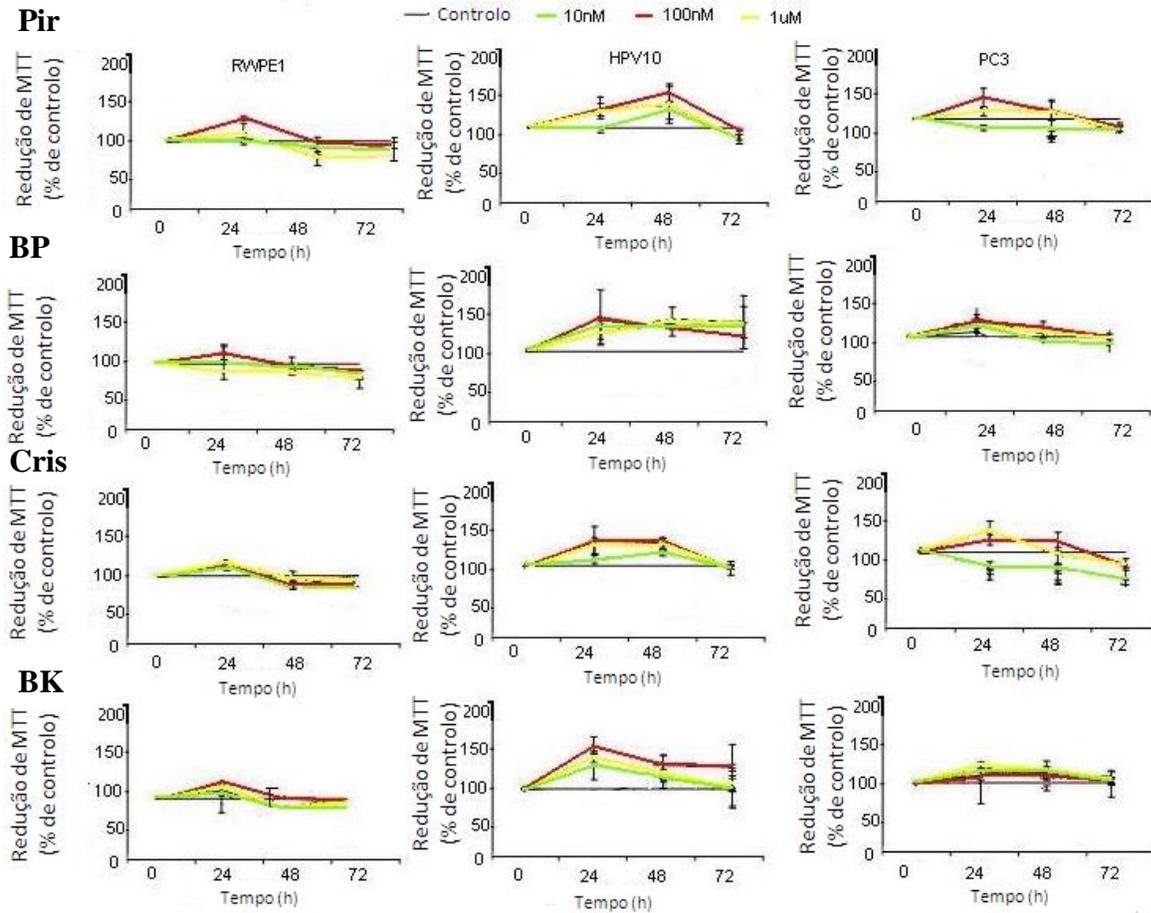


Figura 3.2.22 - Curva dose resposta dos PAHs nas linhas celulares RWPE1, HPV10 e PC3. As células foram incubadas com os (PAHs), pireno (Pir), benzo(a)pireno (BP), criseno (Cris) e benzo(k)fluoranteno (BK) nas concentrações de 10nM, 100nM e 1µM) ao longo de 72 horas. A proliferação celular foi avaliada por espectrofotometria através do ensaio colorimétrico de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico). Os resultados são expressos em percentagem de redução de MTT por comparação com as respetivas células controlo (células tratadas com 1%(v/v) de DMSO) e representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

Nestas células, o efeito máximo é atingido ao fim de 48 horas de incubação, na presença de pireno. O efeito dos compostos na proliferação celular foi mais discreto nas células de epitélio normal, RWPE1.

3.2.4.2 Efeito de hidrocarbonetos poliaromáticos cíclicos na expressão de HIF e VEGF

Apesar do efeito dos PAHs no desenvolvimento do cancro da próstata se encontrar estabelecido, não se conhece a sua ação na progressão da doença. Tendo em conta o efeito proliferativo nas diferentes linhas celulares, e o facto de este ser mais acentuado nas células de cancro localizado, HPV10, considerámos importante investigar o seu efeito na progressão/metastização da doença. Desta forma avaliámos alguns parâmetros bioquímicos envolvidos na metastização, nomeadamente, a expressão de VEGF e HIF, em células tratadas com PAHs (figura 3.2.23). Os estudos foram efetuados nas linhas celulares em condições de normóxia e de hipóxia, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. A figura 3.2.23 permite comparar a expressão de HIF e de VEGF nas células PC3 e HPV10 relativamente a RWPE1. As células de cancro da próstata, particularmente, a linha de metástase, PC3, evidenciam aumento significativo dos valores basais de HIF (cerca de 2 vezes) e de VEGF (cerca de 1,5 vezes), quer em condições de hipóxia, quer em condições de normóxia, relativamente à linha celular RWPE1.

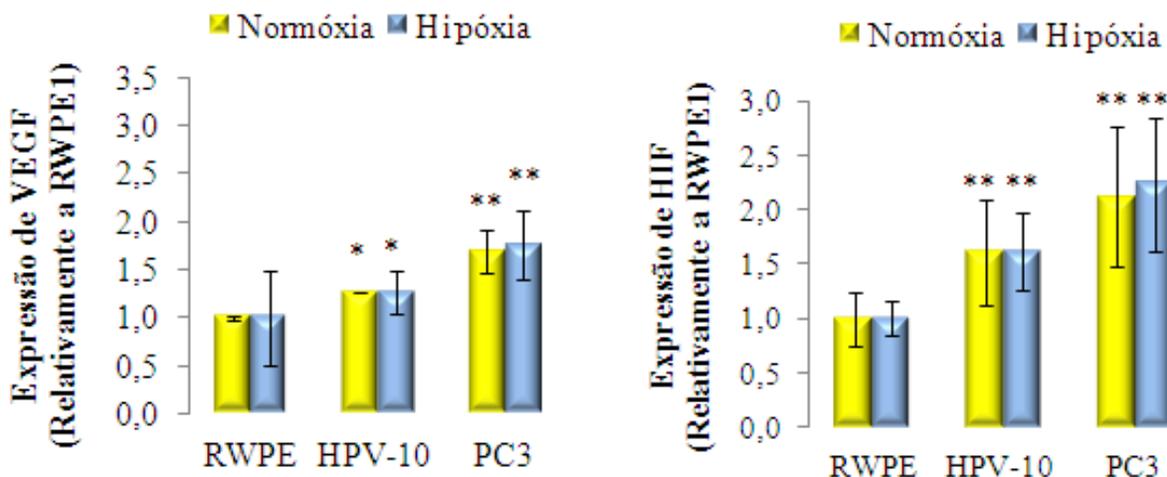


Figura 3.2.23 - Análise da expressão basal de HIF e de VEGF nas linhas celulares RWPE1, HPV-10 e PC3. A expressão de VEGF e de HIF foi determinada em condições de normóxia e hipóxia e analisada por citometria de fluxo, após marcação das células com anticorpos monoclonais em associação com sondas fluorescentes. Os resultados são expressos por comparação com as células RWPE1, e representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para PC3 ou HPV10 relativamente a RWPE1.

Por outro lado, após 24 horas de incubação com os PAHs, observa-se aumento da expressão de HIF e VEGF, o qual é mais acentuado na linha celular HPV10 (células isoladas de cancro localizado), em condições de hipóxia e na presença de benzo(a)pireno (cerca de 3,5 vezes). Em condições de normóxia o efeito também é geralmente mais pronunciado nestas células (Figura 3.2.24).

De acordo com o estudo, o benzo(a)pireno foi o composto que induziu um efeito mais acentuado nas células HPV10. Contudo, em condições de hipóxia, este composto induz diminuição da expressão de HIF e VEGF nas células isoladas de epitélio normal (RWPE1).

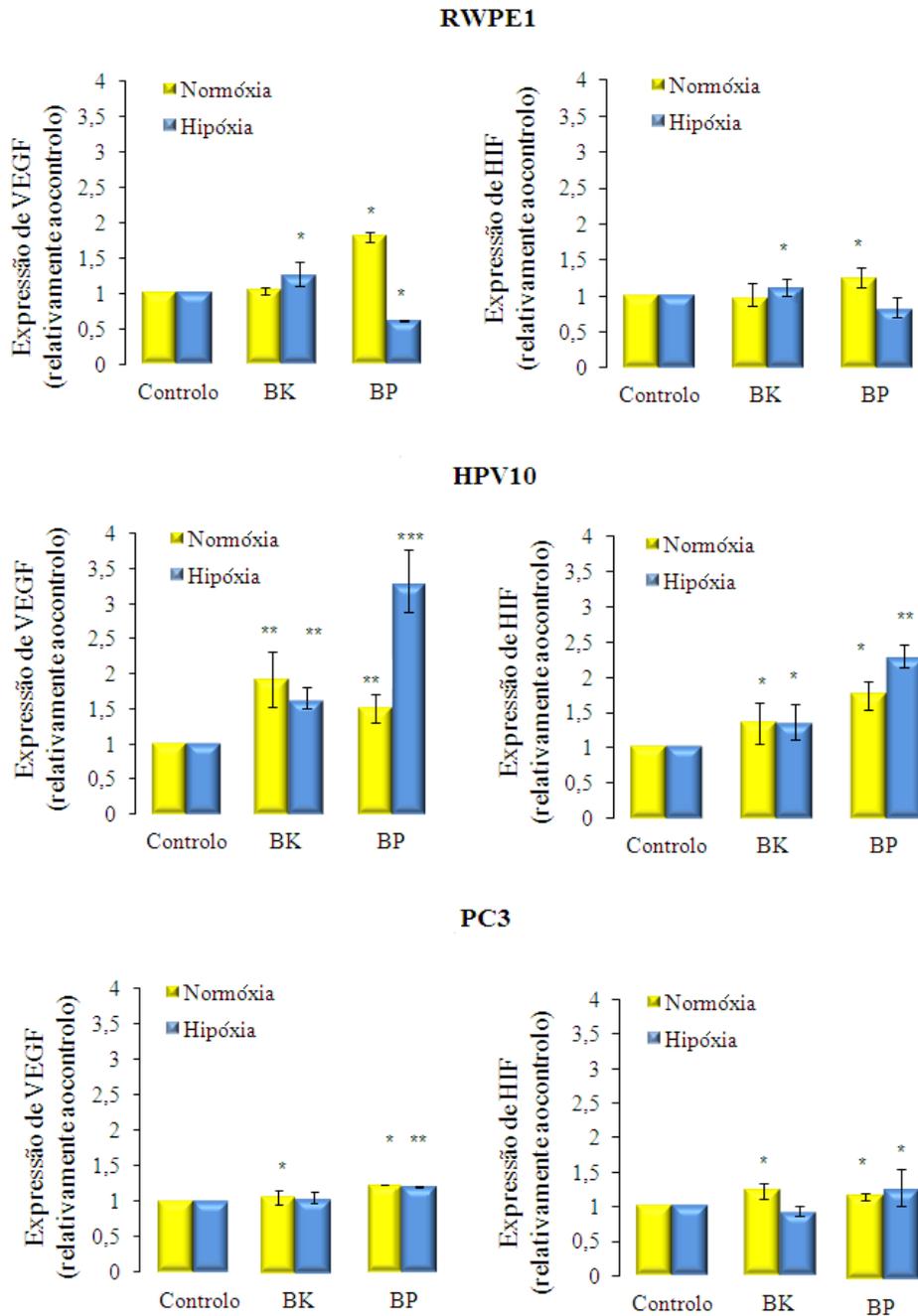


Figura 3.2.24 - Efeito dos PAHs na expressão de VEGF e HIF. A expressão de VEGF e HIF foi determinada em condições de normóxia e hipóxia e analisada por citometria de fluxo, após marcação das células com anticorpos monoclonais. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,005$ relativamente ao controlo (células tratadas com 1% (v/v) de DMSO).

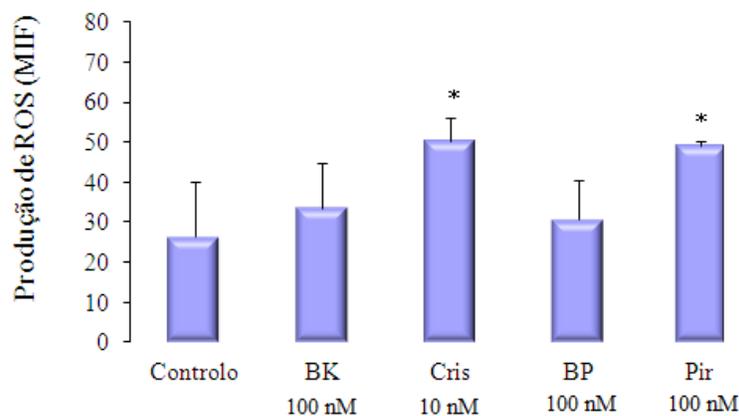
3.2.4.3 Efeito de hidrocarbonetos poliaromáticos cíclicos no stresse oxidativo

Para avaliar de que forma o efeito dos PAHs na indução da proliferação e aumento da expressão de moléculas envolvidas na metastização, se poderão relacionar com um aumento de ROS, avaliámos a produção de peróxidos e a defesa antioxidante GSH.

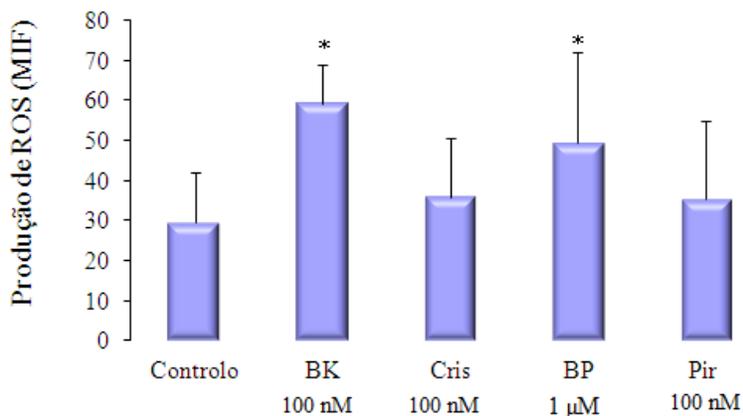
Neste estudo verificámos que o tratamento das células HPV10 e RWPE1 com PAHs induziu um incremento na produção de ROS que variou entre 5 a 30 MIF. Esta variação assumiu valores significativos nas células RWPE1 na presença de criseno (50 vs 28 MIF) e pireno (50 vs 28 MIF) e nas células HPV10 na presença de benzo(K)fluoranteno (60 vs 30 MIF) e benzo(a)pireno (50 vs 30 MIF). É de notar que estes compostos induziram aumento acentuado na proliferação celular, sugerindo a participação de ROS mediada por PAHs no efeito referido.

Nas células PC3 não foi detetado aumento de ROS, o que poderá estar relacionado com os seus níveis basais elevados, impossibilitando a deteção de uma variação nesta ordem de grandeza (5 a 30 MIF). Assim, os resultados representados na figura 3.2.25 confirmam que os valores de ROS se encontram muito aumentados nas células PC3 (na ordem de grandeza do milhar), comparativamente às outras células. Além disso não observámos em qualquer das linhas tratadas com PAHs, alteração do conteúdo em GSH (Figura 3.2.26), sugerindo que o aumento de ROS encontrado não interferiu no recrutamento desta defesa antioxidante. Adicionalmente, os resultados confirmam a presença de valores basais nas células de metástase, PC3, superiores aos encontrados para as linhas celulares de cancro localizado, HPV10 e para a linha celular de epitélio normal, RWPE1.

RWPE1



HPV10



PC3

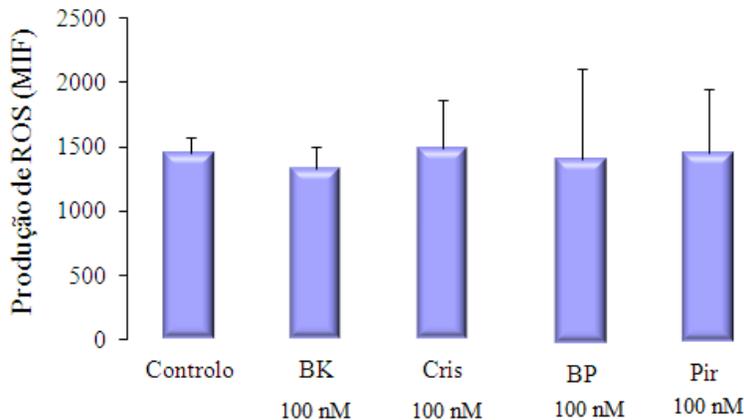


Figura 3.2.25 - Efeito dos PAHs na expressão de ROS nas células RWPE1, HPV10 e PC3. As células foram tratadas ao longo de 24 horas com os PAHs, pireno (Pir), benzo(a)pireno (BP), criseno (Cris) e benzo(k)fluoranteno (BK) nas concentrações (10nM, 100nM and 1μM). O controlo é representado por células tratadas com 1% (V/V) de DMSO. A avaliação de peróxidos foi analisada por citometria de fluxo, após marcação das células com a sonda DCFH-DA e após a aquisição de 10 000 eventos. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média ± desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas relativamente ao controlo, são consideradas para * $p < 0,05$.

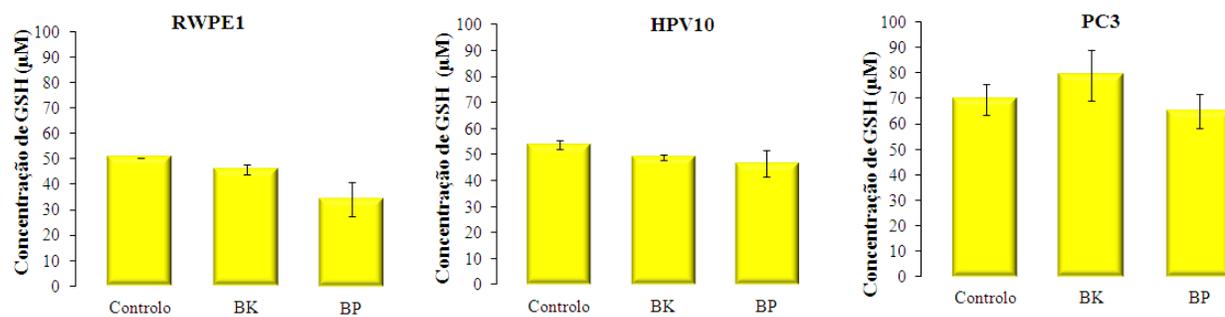


Figura 3.2.26 - Efeito dos PAHs na concentração de GSH nas células RWPE1, HPV10 e PC3. As células foram tratadas ao longo de 24 horas com BK e BP. O controlo é representado por células tratadas com 1% (V/V) de DMSO. Os resultados são expressos em μM e representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

4.1 Estudos em sangue periférico de doentes e controlos

4.1.1 Avaliação do stresse oxidativo ao longo da progressão do cancro da próstata

A exposição a fatores ambientais como os agentes infecciosos, e os vários carcinogéneos presentes na dieta alimentar, as alterações no equilíbrio hormonal, e o próprio envelhecimento, têm sido associados à lesão do tecido prostático que conduz a uma inflamação crónica, caracterizada pelo aumento do stresse oxidativo (Nelson *et al.*, 2003). O excesso de ROS, relaciona-se com a lesão do ADN, por sua vez, implicado na carcinogénese (Klein *et al.*, 2006). A tentativa de regeneração do tecido prostático mediante estas agressões, associa-se frequentemente a lesão epitelial, designada por atrofia inflamatória proliferativa (PIA) (De Marzo *et al.*, 1999), precursora da neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e do cancro da próstata (Brooks *et al.*, 1998; Putzi *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001).

Vários estudos evidenciam a participação do stresse oxidativo na carcinogénese da próstata, no entanto, os dados da literatura revelam discrepâncias (Aydin *et al.*, 2005; Yossepovitch *et al.*, 2007; Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2009), em grande parte dependentes do tipo de parâmetros de stresse oxidativo analisados e do estadiamento da doença. Neste estudo avaliou-se a participação do stresse oxidativo na etiopatogenia e progressão do cancro da próstata. Para o efeito, participaram indivíduos sem neoplasia maligna ou outra patologia prostática conhecida (controlos), indivíduos com prostatite crónica e com hiperplasia benigna da próstata (BPH), e doentes com cancro da próstata localizado e com doença avançada.

Para a avaliação do stresse oxidativo analisaram-se defesas antioxidantes, estado de antioxição total, lesão oxidativa de biomoléculas como a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas e ainda os níveis de NO·.

O plasma e o eritrócito têm sido referidos como bons modelos de avaliação do stresse oxidativo (Sarmiento-Ribeiro, 2000). O primeiro por permitir avaliar o estado de stresse oxidativo circulante (Aydin *et al.*, 2005), e o eritrócito por possuir uma semivida curta, não sintetizar proteínas, ter baixa atividade proteolítica e apresentar elevada sensibilidade ao stresse oxidativo (Glass *et al.*, 1984).

Os nossos resultados demonstram no grupo de indivíduos com doença avançada um aumento de stresse oxidativo, evidenciado pela diminuição significativa do TAS, possivelmente em resultado da diminuição de defesas antioxidantes que participam diretamente no ciclo de oxidação/redução do GSH, como o próprio GSH e atividade da Gl-Px, bem como em resultado da diminuição de VIT A ou tendência para a diminuição de GST e aumento de NO·.

É também de referir que a análise da correlação *Spearman's rho* entre todos os indivíduos evidenciou uma associação positiva entre GSH vs TAS sugerindo que a quantificação simultânea destes dois parâmetros poderá constituir um marcador importante de stresse oxidativo no cancro da próstata. Além disso, poderá constituir um parâmetro importante para a monitorização da evolução da doença, adicionalmente à avaliação do antigénio específico da próstata (PSA). Apesar dos resultados não serem significativos, o que poderá estar relacionado com o tamanho da amostra, foi visível uma diminuição de GSH plasmático para valores de PSA superiores a 10ng/ml nos indivíduos com doença avançada (resultados não apresentados). É importante referir que o GSH desempenha um papel fundamental na remoção de peróxidos de hidrogénio e lipídicos prevenindo a formação de espécies mais lesivas como o radical hidroxilo, na

detoxificação de xenobióticos e na manutenção da forma reduzida, das vitaminas C e E (Fujii *et al.*, 2011).

Um estudo de Yossepovitch e colaboradores (2007) refere o aumento do stresse oxidativo no cancro da próstata em fase avançada, no entanto, não avalia os níveis de TAS, GSH e VITA. Estes autores observaram aumento de MDA e diminuição de AU nos indivíduos com cancro da próstata metastizado. Os nossos resultados revelam um aumento de MDA plasmático na população de doentes com cancro da próstata. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Aydin e colaboradores (2005) e Arsova-Sarafinovska (2009). No entanto, diferem de Yossepovitch e colaboradores (2007), uma vez que não encontramos um aumento significativo da peroxidação lipídica na doença avançada, comparativamente ao grupo com cancro localizado. O aumento da lesão oxidativa de biomoléculas no cancro da próstata avançado, evidenciado pelo aumento de MDA, já referido, e de GC mencionado por outros autores (Yossepovitch *et al.*, 2007), é concordante com a diminuição das defesas antioxidantes encontradas nestes doentes, e poderá estar relacionado com o aumento da produção de ROS intracelulares das células de metástase (Freitas *et al.*, 2012b).

A diminuição da atividade da Gl-Px nos doentes, corroboram os resultados de Aydin e colaboradores (2005) e Arsova-Sarafinovska (2009). No entanto, estes autores não fazem a distinção entre cancro da próstata localizado e a doença avançada. O nosso estudo sugere inclusivamente a diminuição desta enzima na doença avançada, relativamente ao grupo com cancro localizado. Desta forma os nossos resultados revelam que a determinação da atividade da Gl-Px poderá ter interesse como biomarcador na monitorização da doença. Diversas possibilidades poderão ser admitidas para justificar a diminuição da atividade das defesas antioxidantes enzimáticas. Segundo Aydin e colaboradores (2006) estas enzimas poderão estar a

ser recrutadas para desempenharem a sua função comprometendo a deteção da sua atividade. De acordo com outros autores, a Gl-Px torna-se vulnerável à oxidação mediada pelo seu próprio substrato (Gate *et al.*, 1990; Blum *et al.*, 1985), e por ligandos tóxicos como o MDA (Archad *et al.*, 1991). Como referido, este trabalho demonstra que os doentes com cancro da próstata metastizado apresentam níveis superiores de stresse oxidativo, evidenciados por diminuição do conteúdo em VIT A, de GSH, do TAS, e da atividade da Gl-Px e aumento de NO \cdot . Pelo exposto, revela-se de todo interesse a monitorização destes parâmetros de stresse oxidativo durante o “follow up” dos doentes a fim de avaliar a sua potencialidade como novos biomarcadores preditivos do prognóstico e da evolução da doença. Apesar do PSA constituir um marcador sanguíneo de referência na monitorização do cancro da próstata, a sua utilização, apresenta algumas limitações relativas à sensibilidade e especificidade, resultando quer em falhas de deteção da doença quer na realização desnecessária de biópsias (Hori *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2012). Os valores de PSA não permitem também uma distinção rigorosa entre doentes sem e com cancro da próstata, e em relação a estes últimos a destringa com a doença avançada (Hori *et al.*, 2012). Por outro lado, as células de cancro da próstata podem perder a capacidade de expressar o PSA. Esta característica observa-se nas células PC3, isoladas de metástase óssea (Kaighn *et al.*, 1979; Tai *et al.*, 2011). É por estes motivos, importante a introdução de novos marcadores sanguíneos que possam ultrapassar essas limitações.

Martin e colaboradores (2012) referem a utilização de vários marcadores em simultâneo, como forma de melhorar a caracterização da doença. Os nossos resultados sugerem que a determinação dos parâmetros de stresse oxidativo referidos, conjuntamente com a análise do PSA, poderia acrescentar informação útil sobre o estadiamento do cancro da próstata, sobretudo na doença

avançada, onde as diferenças assumiram maior relevância. No entanto, os resultados não nos permitem inferir sobre a distinção entre a fase hormono-dependente e a de escape hormonal.

O stresse oxidativo interfere não só na carcinogénese da próstata, como também noutras patologias prostáticas. Aydin e colaboradores (2005) e Arsova-Sarafinavska (2009) encontraram um aumento da peroxidação lipídica eritrocitária e diminuição da atividade da Gl-Px nos indivíduos com BPH e com cancro da próstata, relativamente aos indivíduos sem neoplasia, e nos indivíduos com cancro da próstata em relação aos indivíduos com BPH. Os nossos resultados confirmam o aumento significativo de MDA eritrocitário e diminuição significativa da atividade da Gl-Px, no grupo com BPH, relativamente aos grupos de indivíduos sem neoplasia. No entanto, esta relação também se verifica nos indivíduos com BPH relativamente aos diversos grupos de doentes. A nível plasmático, observámos ainda um aumento significativo do GSH e, concomitantemente, diminuição da peroxidação lipídica (MDA) no grupo com BPH, relativamente a todos os grupos estudados. Estes resultados reforçam não só alterações de stresse oxidativo na BPH como evidenciam a ação antioxidante do GSH.

Neste estudo pretendeu-se ainda avaliar o estado de stresse oxidativo na prostatite crónica. Este processo inflamatório, além de ser um fator de risco para o cancro da próstata, é caracterizado por um aumento de ROS. Os nossos resultados mostram que os doentes com prostatite apresentam diminuição significativa de GSH plasmática relativamente a todos os grupos exceto em relação aos doentes metastizados. No entanto, na prostatite observa-se, um conteúdo em TAS elevado, sendo significativamente superior ao encontrado para a doença avançada. Desta forma os nossos resultados sugerem que outras defesas antioxidantes não testadas poderão ter um papel protetor importante, para compensar a diminuição de GSH.

Para além da GI-Px, a superóxido dismutase (SOD) e a catalase, que não avaliámos, são consideradas defesas antioxidantes enzimáticas de primeira linha na eliminação direta de ROS (Arsova-Sarafinavska *et al.*, 2009) e poderão estar relacionadas com os valores de TAS encontrados.

Além do mencionado, a gordura individual, avaliada pelo índice de massa corporal, constitui uma variável que influencia o estado de stresse oxidativo (Fernández-Sánchez, 2011). De acordo com os mesmos autores, o aumento de massa gorda induz aumento de stresse oxidativo. Neste estudo o reduzido número de casos comprometeu a avaliação da relação entre o IMC, o stresse oxidativo e a progressão do cancro da próstata. No entanto, existem algumas variações nos parâmetros de stresse oxidativo que merecem abordagem.

Nos grupos de doentes formados por indivíduos com excesso de peso e obesos, é de notar uma tendência para o aumento de MDA bem como aumento de $\text{NO}\cdot$ comparativamente aos controlos saudáveis com IMC correspondente. No grupo com cancro da próstata localizado, observa-se uma tendência para o aumento de $\text{NO}\cdot$ nos indivíduos com excesso de peso por comparação com os de menor IMC. Assim, os resultados sugerem que o excesso de peso nos doentes com cancro localizado aumenta a produção de $\text{NO}\cdot$, o qual participa na angiogénese necessária à metastização (Bergers e Benjamin, 2003; Ridnour *et al.*, 2007).

Paralelamente, observa-se diminuição significativa da VIT E eritrocitária também evidenciado na população total de doentes sugerindo aumento de stresse oxidativo nos doentes com excesso de peso e obesos.

Porém, importa referir que a relação entre a obesidade e o stresse oxidativo poderá estar relacionada com a produção de citocinas no tecido adiposo, as quais não foram avaliadas e

poderiam permitir explicar melhor a relação entre a gordura e o stresse oxidativo no cancro da próstata.

A progressão do cancro da próstata é em grande parte monitorizada pelo doseamento sérico do PSA (Hori *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2012). Os nossos resultados, de acordo com o esperado, indicam que o PSA é significativamente superior no grupo de doentes com cancro da próstata. Além disso, os indivíduos com cancro avançado apresentam valores de PSA significativamente superiores comparativamente ao grupo com cancro localizado.

Neste estudo, observa-se uma tendência para a diminuição de GSH eritrocitário, quer em doentes, quer em controlos, de acordo com o aumento do PSA. No grupo de doentes com PSA mais elevado ($4 < \text{PSA} < 10$), esta diminuição é acompanhada de uma redução significativa da atividade da Gl-Red, comparativamente aos controlos o que poderá justificar a diminuição de GSH nos doentes. Também é de notar uma diminuição progressiva da atividade da Gl-Red em função do aumento de PSA, nos doentes com cancro localizado.

No que respeita à lesão oxidativa observa-se tendência para o aumento de GC em doentes e em controlos, com o aumento do PSA em concordância com o observado para o teor em GSH. Relativamente ao $\text{NO}\cdot$ nesta amostragem importa referir uma tendência para o aumento nos doentes relativamente ao controlo e que o aumento de $\text{NO}\cdot$ acompanha de forma significativa o aumento de PSA no grupo de doentes com cancro da próstata localizado. Pelo exposto o aumento de PSA parece estar relacionado com o aumento de stresse oxidativo.

4.1.2 Avaliação do efeito do tabaco no stresse oxidativo e progressão do cancro da próstata

Diversos estudos evidenciam que os hábitos tabágicos são indutores do aumento de stresse oxidativo. Os nossos resultados corroboram essas observações. Assim, no plasma do grupo de doentes fumadores pode observar-se uma diminuição significativa de TAS relativamente aos doentes não fumadores, concordante com o descrito por Freitas e colaboradores (2007). Também se observa diminuição de GST, aumento de $\text{NO}\cdot$ e de GC, indicadores do aumento de stresse oxidativo. Os parâmetros de stresse oxidativo eritrocitário nos doentes fumadores revelaram aumento significativo da atividade da Gl-Red, redução da atividade da Gl-Px e do conteúdo em vitamina E. Entre fumadores, o MDA eritrocitário encontra-se aumentado nos doentes. Desta forma, os hábitos tabágicos parecem interferir com quase todos os parâmetros estudados, traduzindo um impacto muito importante na modificação do stresse oxidativo. Tratando-se de um fator de risco modificável a sua evicção deveria ser considerada para a prevenção do desenvolvimento e progressão do cancro da próstata.

Parte destas alterações verificaram-se também no grupo com doença avançada, nomeadamente, aumento de $\text{NO}\cdot$ e diminuição da Gl-Px, sugerindo que os hábitos tabágicos, poderão agravar a progressão da doença, em parte, através do aumento de stresse oxidativo. Além disso, os nossos resultados sugerem que o aumento de $\text{NO}\cdot$ se pode relacionar não só com a com a progressão da doença, mas também com o aumento do PSA. Assim, os hábitos tabágicos ao contribuírem para o aumento de $\text{NO}\cdot$ dos doentes, podem levar ao agravamento da doença, o que corrobora a participação do tabaco na progressão/metastização do cancro da próstata.

O NO \cdot desempenha uma dualidade de funções, consoante o tecido celular e a sua concentração. Apresenta-se como uma molécula mediadora de processos vitais, mas ao mesmo tempo indutora de citotoxicidade e efeitos mutagénicos, se presente em excesso. Participa ainda na angiogénese, necessária à metastização dos tumores sólidos (Bergers e Benjamin, 2003; Ridnour *et al.*, 2007). O NO \cdot é capaz de lesar direta ou indiretamente o ADN, através da sua conversão em moléculas mais reativas como o ONOO $^-$ (Hecht, 1999; Hecht, 2006; Donohue, 2006; Biswas e Rahman, 2009). Além disso, pode ainda inibir moléculas de reparação do ADN como por exemplo da alquiladenina ADN glicosilase (Jones *et al.*, 2009).

Neste estudo observa-se uma associação entre a carga tabágica e a diminuição de GST. A GST cataliza a biotransformação, por conjugação com o GSH, de metabolitos ativados como o benzo(a)pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido (BPDE), permitindo a sua excreção. Uma vez desativado, o composto fica impedido de se ligar ao ADN e de formar adutos (Nebert e Vasiliou, 2004). Assim a GST protege a célula da ação dos PAHs sobre o genoma.

Apesar das células epiteliais características da atrofia inflamatória proliferativa evidenciarem elevados níveis de GSTP1 (Parsons *et al.*, 2001), a diminuição desta enzima, provavelmente por hipermetilação dos ilhéus CpG da região promotora do gene da GSTP1, parece refletir a transição entre atrofia inflamatória proliferativa, e a neoplasia intraepitelial prostática ou o cancro da próstata (Brooks *et al.*, 1998; Putzi *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001).

O silenciamento de genes através da metilação do ADN em ilhéus CpG, nas regiões promotoras, é um dos mecanismos *major* de inativação de genes supressores tumorais (Jones e Baylin, 2007). Enokida e colaboradores (2006) demonstraram uma relação significativa entre o estado de hipermetilação dos ilhéus de CpG da GSTP1 (glutathione-S-transferase π 1) com os hábitos tabágicos. O estado de metilação tem tendência a ser menor nos ex-fumadores do que em

fumadores ativos, e maior em indivíduos com cancro da próstata avançado. Por outro lado, a metilação encontrada nos genes de indivíduos fumadores, revelou ser significativamente superior comparativamente à que ocorre nos genes de indivíduos que nunca fumaram. Estes autores observaram ainda uma relação positiva entre a carga tabágica, traduzida pelo número de unidades maço/ano (UMA) e a metilação destes genes, em doentes com cancro da próstata.

No nosso estudo observámos uma diminuição da GST nos doentes que apresentavam uma carga tabágica superior a 10 UMA, que, pelo exposto poderá ser devido à hipermetilação induzida pelo tabaco. No entanto, outros mecanismos poderão contribuir para a diminuição desta defesa antioxidante.

De acordo com Marsit e colaboradores (2005), a metilação dos genes parece estar relacionada essencialmente com a idade de início dos hábitos tabágicos e não tanto com a carga tabágica. Segundo Nelson e colaboradores (2003), a GSTP1 é expressa nas células basais do epitélio prostático, mas não na maioria das células de cancro da próstata devido à hipermetilação que ocorre nos ilhéus CpG da sequência reguladora do gene (Lin *et al.*, 2001; Meiers *et al.*, 2007). Nelson e colaboradores (2001) demonstraram uma diminuição na formação de adutos de ADN induzidos pela exposição a PhIP, uma amina aromática heterocíclica, em linhas celulares de cancro da próstata (LNCaP), modificadas para expressarem GSTP.

Apesar dos nossos resultados evidenciarem uma diminuição significativa de GST no grupo de doentes com hábitos tabágicos, o mesmo não se observa nos indivíduos sem neoplasia, sugerindo que os indivíduos mais suscetíveis à diminuição da GST, a qual pode ser mediada pelo tabaco, terão maior predisposição para desenvolver a doença. Esta possibilidade sugere a participação do património genético, relacionado com a GST. A este respeito, Nora e colaboradores (2006) estudaram a participação das variantes polimórficas do gene funcional GSTM1, avaliando a

GSTM1 “null deletion”, que conduz a perda total da enzima, por oposição à variante “nondeleted”. Os resultados indicaram que os fumadores portadores do alelo “null deletion” apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento do cancro da próstata. Existem outros estudos concordantes, sugerindo que indivíduos fumadores portadores da variante GSTT1, que também conduz a perda total da enzima, apresentam maior risco de cancro da próstata (Kelada *et al.*, 2000; Komiya *et al.*, 2005).

Nos nossos resultados, também verificámos nos doentes fumadores aumento de VIT E plasmática e diminuição nos eritrócitos. O recrutamento de VIT E dos tecidos, nomeadamente do fígado para o plasma, poderá corresponder a uma resposta natural ao aumento de stresse oxidativo (Rocchi *et al.*, 2003). Em contrapartida observa-se uma diminuição de VIT E e da atividade da Gl-Px eritrocitária, sem corresponder a um aumento de MDA, o que poderá ser explicado por um aumento acentuado da atividade de Gl-Red. Apesar do resultado não ser significativo observa-se aumento de GSH eritrocitário. De facto, tem sido descrito que em resposta ao aumento de ROS circulante, é possível que haja um aumento da produção de GSH, o que requer aumento da atividade da Gl-Red. Os nossos estudos em linhas celulares revelam que o aumento de ROS nas células de metástase da próstata é acompanhado por um aumento de GSH e da atividade da Gl-Red (Freitas *et al.*, 2012b), à semelhança do que observámos nos eritrócitos de doentes. Da mesma forma, as células de metástase também evidenciam diminuição da atividade da Gl-Px, como observámos nos eritrócitos dos doentes, sob efeito do tabaco. A diminuição da atividade da Gl-Px poderá resultar de uma resposta ao insulto oxidativo, devido ao seu recrutamento para combater a formação de ROS, e por isso uma menor deteção. Por outro lado, a diminuição da atividade da Gl-Px poderá ser o resultado da oxidação dos radicais sobre a mesma, diminuindo a sua atividade. Neste sentido, a diminuição da Gl-Px, requer a resposta de

mecanismos compensatórios, que poderão estar na base do aumento de GSH e Gl-Red, ou de outras enzimas que não foram avaliadas.

Os resultados deste trabalho, sugerem que os hábitos tabágicos induzem aumento de stresse oxidativo e que este poderá estar relacionado com a progressão da doença. No entanto, a associação entre o tabagismo e o desenvolvimento e progressão do cancro da próstata deverá ser influenciada pelo património genético individual, em particular pelos genes que codificam as defesas antioxidantes, como a GST. Importa ainda notar que as diferentes condições estudadas poderão induzir efeitos diferentes nos parâmetros de stresse oxidativo, no entanto, condicionam claramente um aumento deste.

4.1.3 Avaliação do efeito dos hábitos alcoólicos no stresse oxidativo e progressão do cancro da próstata

Além do tabaco, o consumo de álcool é também responsável pelo aumento de stresse oxidativo. Neste sentido fomos avaliar de que forma o consumo de álcool poderá contribuir para o aumento de stresse oxidativo e progressão do cancro da próstata.

Os resultados indicam um aumento dos grupos carbonilo (GC) e dos níveis de MDA a nível plasmático, na população de doentes que ingere acima de 60g de álcool diariamente, indicadores de lesão oxidativa de proteínas e da peroxidação lipídica, respetivamente.

Resultados não evidenciados, demonstram que entre indivíduos saudáveis não se observam alterações significativas. A ingestão de 60g de álcool diariamente nos indivíduos doentes, poderá contribuir para o agravamento da doença, através do aumento de stresse oxidativo, evidenciado pela lesão oxidativa de proteínas (GC) e lípidos, como mencionado. Além das proteínas e dos

lípidos membranares (peroxidação lipídica), os alvos dos radicais são também os ácidos nucleicos (oxidação das bases) (Freeman *et al.*, 1986).

Nos lípidos a peroxidação lipídica, ocorre frequentemente ao nível dos ácidos gordos polinsaturados da bicamada lipídica da membrana celular, comprometendo as propriedades biofísicas da membrana, nomeadamente, a fluidez e permeabilidade, afetando também a estrutura e função das proteínas que aí estão contidas e, por conseguinte, a atividade enzimática inerente (Agostinho *et al.*, 1997; Moley e Mueckler, 2000; Zadak, 2009).

A peroxidação lipídica é iniciada pela subtração de um átomo de hidrogénio da cadeia hidrocarbonada de um ácido polinsaturado, por um radical, que se auto perpetua, contribuindo para a lesão celular, mesmo na ausência da espécie radicalar iniciadora (Gutteridge *et al.*, 1990), originando ainda diversos radicais capazes de iniciar novas reações em cadeia (Halliwell, 1987). Destas reações formam-se também produtos não radicalares como aldeídos citotóxicos, nomeadamente, malonilaldeído (MDA), utilizado para avaliação da extensão da peroxidação lipídica e o hidroxi-nonenal (Burdon, 1995; Toyokuni, 1999). As lesões oxidativas dos lípidos condicionam ao longo do tempo a progressiva substituição de ácidos gordos polinsaturados por outros monoinsaturados, por sua vez mais suscetíveis à ação de ROS (Dexter *et al.*, 1994).

Apesar da VIT E contribuir para a proteção da peroxidação lipídica, não se observaram alterações no seu conteúdo. A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel que compreende derivados de tocoferol e tocotrienol (van Poppel e Tombal, 2011; Kannappan *et al.*, 2012). O α -tocoferol capta radicais peróxilo e é convertido no radical α -tocoferoxilo, sendo reduzido de novo a α -tocoferol pelo ácido ascórbico, que por sua vez se transforma no radical ascorbilo (Halliwell *et al.*, 1989; Garcia-Bailo *et al.*, 2011).

Pelo exposto, associando estes resultados aos obtidos relativamente à ação do tabaco o nosso estudo sugere que a cessação da ingestão de álcool e a evicção tabágica poderão ter um efeito protetor no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata. No entanto, seria necessário aumentar o tamanho da amostra, de forma a avaliar o efeito combinado destas condições.

4.1.4 Relação de variantes polimórficas do fator de crescimento do endotélio vascular – VEGF e o stresse oxidativo no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata

À semelhança do que se verifica na maioria dos tumores sólidos, o crescimento tumoral progressivo e a metastização do cancro da próstata, são dependentes da angiogénese para a qual é necessária a participação do VEGF (Singh *et al.*, 2011).

O VEGF é uma glicoproteína que se liga de modo específico aos receptores de membrana com atividade de tirosina-cinase, VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR). Este fator tem a capacidade de induzir a formação de novos vasos que vascularizam o tumor e que facilitam a entrada de células tumorais na corrente sanguínea, favorecendo a metastização à distância (Ferrara e Gerber, 2001).

No cancro da próstata, o VEGF apresenta-se também como um fator indutor de proliferação celular e da linfangiogénese (Zeng *et al.*, 2004; Jennbacken *et al.*, 2005; Burton *et al.*, 2008).

Vários estudos mostram que a expressão de VEGF se encontra aumentada neste tipo de neoplasia (Ferrer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004; Fukuda *et al.*, 2007).

As células de metástase apresentam maior produção de VEGF e vascularização, comparativamente a células com menor potencial de metastização (Balbay *et al.*, 1999). O mesmo foi observado neste estudo em linhas celulares. Pande e colaboradores (2012) encontraram uma associação entre o aumento dos níveis de VEGF, com o aumento de marcadores de stresse oxidativo e uma diminuição significativa de antioxidantes, nos doentes com cancro da próstata. Demonstraram assim que a angiogénese e o stresse oxidativo aumentam progressivamente, acompanhando a evolução da doença para um estágio mais avançado, em parte, concordante com os nossos resultados. É de referir que neste estudo o aumento stresse oxidativo nos doentes com cancro da próstata em fase avançada se associa a aumento de NO \cdot , o qual participa na vasodilatação dos capilares e vénulas, sendo um mediador da angiogénese (Bergers e Benjamin, 2003; Ridnour *et al.*, 2007). Por seu lado, o VEGF estimula a libertação de NO \cdot das células endoteliais através do aumento da expressão da enzima sintase do óxido nítrico (NOS), responsável pela formação de NO \cdot (van der Zee *et al.*, 1997; Hood *et al.*, 1998).

No entanto, um estudo recente de Muders e colaboradores (2012), evidenciou que o VEGF protege as células de cancro da próstata do stresse oxidativo resultante de peróxidos. O processo envolve a ativação do complexo-2 da rapamicina (mTORC-2) e da serina-treonina cinase AKT1. As ROS induzem a dissociação do mTORC-2 impedindo a ativação da AKT1. Na presença de VEGF o mTORC-2 dissociado é repostado na sua forma íntegra promovendo a atividade da AKT1, a qual induz a fosforilação das moléculas anti-apoptóticas GSK-3 β e FOXO-1 inibindo a sua função e desta forma contribuindo para a sobrevivência celular (Kops *et al.*, 2002).

O gene do VEGF está localizado no cromossoma 6p21, compreendendo uma região com 14kb que codifica 8 exões e 7 intrões. Muitos polimorfismos (SNP-*Single nucleotide polymorphisms*) foram identificados neste gene. Com base nesse conhecimento, diversos estudos foram

concebidos no sentido de relacionar variantes polimórficas no gene do VEGF, com a suscetibilidade para o desenvolvimento e progressão do cancro da próstata (McCarron *et al.*, 2002; Sfar *et al.*, 2006; Onen *et al.*, 2008; Langsenlehner *et al.*, 2008).

Neste estudo avaliámos a variante polimórfica -634G>C do *VEGF* na região 5' não codificante do gene. Este polimorfismo envolve a substituição de uma citosina (C) por uma guanina (G). Os nossos resultados evidenciam uma frequência de distribuição superior (50%) do genótipo GG, nos doentes com cancro da próstata metastizado, comparativamente ao grupo controlo (44%) e aos doentes com cancro localizado (44%). No entanto, não se encontrou uma associação estatisticamente significava entre qualquer um dos genótipos e o risco de desenvolver cancro da próstata localizado e/ou avançado. Por oposição, Sfar e colaboradores (2006), num estudo realizado numa população Tunisina, com inclusão de 101 doentes com cancro da próstata e 100 controlos saudáveis, encontraram um maior do risco para desenvolver a doença no grupo de indivíduos portadores dos genótipos *VEGF* - 634GC e *VEGF* - 634CC, bem como uma associação entre o haplótipo C e o desenvolvimento de doença agressiva, observando uma associação inversa entre a presença do alelo G e o risco para desenvolver a doença.

Apesar destes autores terem determinado uma associação entre as variantes polimórficas do *VEGF* e o risco para desenvolver a doença, ou para desenvolver doença agressiva, um estudo numa população austríaca em 702 doentes com cancro da próstata e 702 indivíduos saudáveis da mesma faixa etária, não evidenciou qualquer associação entre a variante 634G>C do *VEGF*, e o risco de cancro da próstata ou a concentração de VEGF plasmático (Langsenlehner *et al.*, 2008). A meta análise realizada por Jain e colaboradores (2009) conclui que o alelo 634C é preditivo do cancro da próstata e de um maior risco de desenvolver doença avançada, na população Tunisina, mas não evidencia qualquer relação na população austríaca, pelo que consideram que não existe

associação entre o referido polimorfismo genético e o risco de cancro da próstata e/ou de desenvolver doença avançada.

A diferença nos resultados encontrados nos diversos estudos poderá estar relacionada com o tamanho das amostras, ou mesmo, com o facto de terem sido estudadas populações com etnias diferentes, resultando possivelmente num contributo genético igualmente distinto. Por outro lado, ainda que os polimorfismos no *VEGF* ou de outros fatores envolvidos na angiogénese se relacionem com a doença, é necessário lembrar que o cancro da próstata, é uma doença multifatorial, dependendo da articulação de inúmeras variáveis, quer de origem endógena, quer exógena, pelo que a avaliação genética, deveria contemplar a associação de diversos genes, que possam influenciar o risco para desenvolver a doença, e progressão para doença avançada.

Os nossos resultados, sugerem uma possível associação entre o haplótipo C ou o genótipo CC e um menor stresse oxidativo nestes indivíduos. Observa-se um maior conteúdo em GSH nos portadores do alelo C, comparativamente aos portadores do genótipo GG, bem como tendência para o aumento de GSH no genótipo CC, relativamente aos portadores do alelo G. Também se observa uma tendência para um maior conteúdo em TAS no genótipo CC, relativamente aos portadores do alelo G. Ainda, apesar dos resultados não serem significativos, observa-se menor conteúdo em MDA no genótipo CC e nos portadores do alelo C.

Os resultados sugerem que o genótipo CC e o alelo C do *VEGF*, se encontram associados a menor stresse oxidativo, caracterizado por maior conteúdo em GSH, TAS e menor peroxidação lipídica representada pelo MDA, embora seja necessário aumentar o tamanho da amostra para confirmar os resultados. Seria, ainda importante acrescentar informação sobre os níveis circulantes de VEGF de forma a estabelecer uma relação entre o polimorfismo associado a este fator de crescimento com a sua expressão e o stresse oxidativo. Tendo em conta o estudo

desenvolvido por Pande e colaboradores (2012), no qual encontraram uma associação positiva entre o aumento dos níveis de VEGF e o aumento de stresse oxidativo, podemos admitir a possibilidade do genótipo *VEGF* – 634GG, associado a aumento de stresse oxidativo no nosso estudo, se relacionar com um aumento dos níveis de VEGF.

4.2 Estudos em linhas celulares

4.2.1 Avaliação da resistência ao stresse oxidativo em linhas celulares

Apesar dos avanços científicos e clínicos, ainda não existe uma terapêutica eficaz do cancro da próstata para a doença avançada (para revisão deste assunto ver Freitas *et al.*, 2011). O tratamento conservador privilegia a recessão do tumor, a hormonoterapia, radioterapia (braquiterapia) e a quimioterapia com o docetaxel. A fase precoce de cancro da próstata é geralmente dependente de androgénios, sendo a terapêutica hormono-dependente, com ablação androgénica ou inibidora dos recetores dos androgénios, uma estratégia inicialmente eficaz. No entanto, a progressão do cancro para estádios avançados, é acompanhada de uma perda de eficácia desta estratégia terapêutica, e da evolução para o cancro da próstata hormono-refratário (HRPC). Nesta fase, as células de cancro da próstata podem, inclusivamente, perder o recetor do androgénio, como se verifica na linha celular PC3 (Kaighn *et al.*, 1979).

O cancro da próstata avançado é também caracterizado pela resistência à radioterapia e à quimioterapia, nomeadamente, com o Taxotere (docetaxel) (Makarovsky *et al.*, 2002; Freitas *et*

al., 2012a). Este composto pertence à família dos taxanos, e atua através da sua ligação à subunidade β da tubulina IV, induzindo a estabilização de microtúbulos, com consequente bloqueio do ciclo celular na fase G2/M. Makarovsky e colaboradores (2002) demonstraram que a exposição continuada ao docetaxel induz resistência em linhas celulares isoladas de metástase de cancro da próstata.

A radioterapia está também indicada no tratamento desta neoplasia, uma vez que induz níveis elevados de ROS sobre as células neoplásicas, originando lesão oxidativa com consequente morte celular (Haimovitz-Friedman, 1998). No entanto, as células de metástase de cancro da próstata apresentam frequentemente resistência a esta terapêutica. Tem sido observado que o aumento das ROS poderá contribuir para o desenvolvimento e progressão do cancro da próstata (Sikka, 2003). Estas espécies radicalares ao lesarem o ADN poderão condicionar o aparecimento de mutações e instabilidade genética. A acumulação de mutações encontra-se relacionada com as várias fases do processo de carcinogénese, em particular com a progressão (Olovnikov *et al.*, 2009). O desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o tratamento do cancro da próstata, requer uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à carcinogénese e resistência ao tratamento.

Neste trabalho propusemo-nos esclarecer algumas questões relacionadas com esta problemática, tendo para o efeito estabelecido um modelo de estudo *in vitro* baseado na utilização de três linhas celulares representativas de diferentes estádios da doença. Os estudos *in vitro* foram realizados numa linha celular isolada de epitélio prostático humano não neoplásico, as células RWPE1, (Bello *et al.*, 1997) e em duas linhas celulares obtidas de células de cancro da próstata, nomeadamente, a linha celular HPV10, isolada de cancro localizado (Weijerman *et al.*, 1994), e a linha celular PC3, isolada de metástase óssea (Kaighn *et al.*, 1979). Começámos por avaliar o

efeito do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) na proliferação, no $\Delta\Psi_{mit}$ e no tipo de morte celular, bem como a participação do stresse oxidativo através da produção de ROS, defesas antioxidantes e lesão oxidativa de biomoléculas.

Os resultados obtidos no nosso trabalho evidenciam que o H_2O_2 induz um efeito na proliferação celular, dependente do tipo de linha celular, tempo de exposição e da concentração (Freitas *et al.*, 2012b). Em particular, concentrações reduzidas de H_2O_2 (10 a 100nM) induzem proliferação na linha celular HPV10, isolada de cancro da próstata localizado, sugerindo que pequenas concentrações de ROS deverão favorecer o desenvolvimento e progressão da doença. Da mesma forma Sikka (2003) demonstrou que concentrações de H_2O_2 , entre 30pM e 300nM, induzem acentuada proliferação celular, em células representativas de hiperplasia benigna da próstata (BPH), considerada como um precursor do cancro da próstata, segundo Mishina e colaboradores (1985). Não se verifica, no entanto um consenso, uma vez que outros autores excluem a BPH como um precursor desta patologia (Zynger e Yang, 2009).

De Marzo e colaboradores (1999) referem que o cancro da próstata é precedido por uma lesão designada por atrofia inflamatória proliferativa, a qual progride para a neoplasia intraepitelial prostática e posteriormente para cancro da próstata (De Marzo *et al.*, 1999). A associação frequente entre lesões de atrofia inflamatória proliferativa e inflamação crónica sugerem que estas lesões são o resultado da proliferação regenerativa do epitélio prostático em resposta à lesão oxidativa, induzida pela persistência de ROS, resultantes do processo inflamatório (De Marzo *et al.*, 1999).

A lesão oxidativa do ADN pode associar-se a mutações genéticas que condicionam a transformação neoplásica (Nelson *et al.*, 2003), em que a célula alterada se torna anárquica, e transmite essa característica às células filhas (Civetta e Civetta, 2011). No entanto, um excesso

de ROS pode induzir uma lesão oxidativa mais extensa nas células, com potencial para induzir apoptose, nomeadamente nas células neoplásicas, como previsto no tratamento com radioterapia (Haimovitz-Friedman, 1998).

Neste estudo, verificámos que uma concentração mais elevada de peróxidos (500 μ M de H₂O₂) inibe a proliferação de todas as linhas celulares testadas, embora de forma menos acentuada na linha celular PC3. Estas diferenças assumiram maior notabilidade ao fim de 72 horas de tratamento. A inibição da proliferação celular foi acompanhada de morte, essencialmente por necrose, nas células representativas de cancro localizado, HPV10, e nas de epitélio normal, RWPE1, logo após 24 horas de tratamento (Freitas *et al.*, 2012b). Resultados similares foram obtidos por Sikka (2003) em células representativas de BPH, na presença de 300 μ M de H₂O₂. No entanto, concentrações elevadas do composto, não afetaram a viabilidade celular das células de metástase PC3, evidenciando assim, uma maior resistência destas células ao stresse oxidativo. De salientar que, as células PC3 evidenciam valores basais de ROS muito superiores, comparativamente aos das outras células, o que poderá explicar em parte, a sua capacidade de adaptação a concentrações elevadas de H₂O₂. Estas observações nas células de metástase PC3, estão de acordo com o aumento de ROS durante a progressão da doença como referido por Sikka (2003).

Uma vez que a mitocôndria é o local de maior produção de ROS e é simultaneamente um alvo destas espécies radicalares fomos analisar o envolvimento deste organelo na resistência ao stresse oxidativo através da determinação do $\Delta\psi_{mit}$.

Os nossos resultados corroboram os estudos de viabilidade celular determinados (Freitas *et al.*, 2012b). De facto, em condições basais, as células PC3 são as que apresentam maior $\Delta\psi_{mit}$ e maior viabilidade celular, enquanto as células da linha RWPE1 evidenciam os valores mais

baixos de ambos os parâmetros analisados, e as HPV10 os valores intermédios. Por outro lado as células de epitélio normal, RWPE1 evidenciam uma maior citotoxicidade induzida por ROS, sugerindo uma menor capacidade de adaptação ao stresse oxidativo. Ao contrário, do que se observa nas outras linhas celulares, o tratamento com 500 μ M de H₂O₂ não induziu uma diminuição significativa do $\Delta\psi_{mit}$ nas células PC3 o que está de acordo com a resistência destas células ao stresse oxidativo. Além disso, os resultados sugerem que a diminuição de $\Delta\psi_{mit}$ se relaciona com a variação da taxa de proliferação celular, mas não de uma forma diretamente proporcional.

Com o objetivo de tentar compreender melhor a resistência das células de metástase ao aumento de ROS, e o seu papel na progressão do cancro da próstata, quisemos caraterizar diversos parâmetros de stresse oxidativo nas diferentes linhas celulares. Desta forma, avaliámos a produção intracelular de ROS, bem como os níveis de defesas antioxidantes, o estado de antioxidação total e a lesão oxidativa de biomoléculas.

Os nossos estudos revelaram uma menor produção de peróxidos na linha celular de epitélio prostático normal, por oposição ao observado nas células PC3 (cancro da próstata metastizado), que evidenciam valores muito aumentados, como previamente referido (Freitas *et al.*, 2012b). Assim os resultados são concordantes com os obtidos por Kumar e colaboradores (2008). Estes autores, demonstraram que a quantidade de ROS produzida é diretamente proporcional à agressividade do fenótipo maligno e também encontraram valores de ROS substancialmente superiores nas células PC3, comparativamente às células RWPE1. Ao contrário do nosso trabalho, não efetuaram o estudo em células de cancro localizado (HPV10), o que nos permitiu demonstrar nestas a existência de níveis intermédios de peróxidos, entre as células de epitélio normal RWPE1 e as PC3 isoladas de metástase. Os resultados nas células de cancro da próstata

localizado, parecem assim representar uma condição entre o epitélio não neoplásico e a doença avançada. Kumar e colaboradores (2008) também demonstraram que a produção de ROS, é em grande parte devida ao sistema Nox (NADPH oxidases transmembranares), o qual participa na desregulação da proliferação celular, formação de colónias, migração celular e invasão de tecidos, contribuindo para a metastização. O nosso estudo, revela ainda uma produção de anião superóxido superior nas células PC3, o que poderá estar relacionado com o aumento da produção intracelular de peróxidos, uma vez que o anião superóxido é convertido em peróxido de hidrogénio por ação de enzimas pertencentes à família da SOD (Grek e Tew, 2010; Poljsak, 2011).

Apesar da deteção de níveis aumentados de ROS nas células PC3, encontrámos níveis de peroxidação lipídica (MDA) diminuídos e estado de antioxidação total (TAS) aumentado, consistente, com uma maior resistência às ROS (Freitas *et al.*, 2012b). Alguns autores, justificam esta resistência celular com base na capacidade de adaptação do sistema antioxidante das células neoplásicas, para o qual poderá contribuir o aumento do GSH (Coffey *et al.*, 2000; Sarmiento-Ribeiro, 2000).

Os nossos resultados evidenciam que as células PC3 estão adaptadas a um aumento do stresse oxidativo, o que pode estar relacionado com o aumento significativo dos valores basais de GSH e da atividade da Gl-Red em relação às outras linhas celulares, contribuindo para a proteção destas células contra o aumento de ROS, inclusivamente, o induzido pela radioterapia (Freitas *et al.*, 2012b). No entanto, estas defesas basais elevadas não aumentam na presença de 500 μ M de H₂O₂ tendo-se observado nestas condições, uma diminuição de TAS, concordante com o aumento de MDA. É ainda de ter em conta, que o sistema antioxidante compreende outras defesas que não

foram analisadas, como a SOD ou a catalase, que desempenha um papel importante na neutralização de peróxidos.

Contrariamente ao observado com a Gl-Red e a GSH, a atividade da Gl-Px e os níveis de GST encontram-se significativamente diminuídos nas células PC3. De acordo com o descrito por outros autores, a diminuição destas defesas poderá estar relacionada com a progressão do cancro da próstata (Trzeciak *et al.*, 2004).

O GSH, uma defesa antioxidante não enzimática é considerado o tiol major do sistema antioxidante dos mamíferos, sendo responsável pela manutenção de um potencial redox ótimo, em parte através da inativação do H₂O₂. A contribuição da GSH e da Gl-Red na proteção das células PC3 contra as ROS foi também defendida por Lim e colaboradores (2005). Estes autores compararam as células PC3 com outra linha celular representativa de metástase de cancro da próstata, as células LNCaP e verificaram que as células PC3 tinham níveis de ROS inferiores. Tal facto foi justificado pela presença de um maior conteúdo celular de GSH, bem como pelo aumento da atividade da Gl-Red, da redutase de tioredoxina (TRxr) e da GST. Pelo contrário, Kumar e colaboradores (2008) contrariam estes resultados demonstrando nas células PC3 níveis superiores de ROS comparativamente às células LNCaP. Além disso, verificaram que a atividade da Gl-Red nas células PC3, é da mesma ordem de grandeza dos valores determinados por Jung e colaboradores (1997) para as mesmas células. Estes autores também descreveram um aumento da atividade da Gl-Red e diminuição das atividades da GST e Gl-Px em células de metástase de cancro da próstata (PC3, LNCaP e DU145) comparativamente a células de culturas primárias de origem benigna e maligna, de tecido prostático. Jung e colaboradores (1997) também detetaram aumento da atividade da Gl-Px e diminuição da Gl-Red nas células PC3, comparativamente a outras linhas celulares de metástase. Estes dados reforçam os nossos resultados de que a

atividade da Gl-Px se encontra diminuída enquanto a da Gl-Red se encontra aumentada nos tumores avançados.

Para confirmar a ação protetora do GSH e da Gl-Red contra a ação de ROS nas células de metástase, estas foram tratadas com um agente indutor da diminuição de grupos tiol, presente na constituição destas defesas antioxidantes. O composto utilizado foi o dietil maleato (DEM) e o nosso estudo revelou que este agente induz uma diminuição do conteúdo em GSH e da atividade da Gl-Red, sem interferência na viabilidade e proliferação celular de PC3. No entanto, na presença de H₂O₂, a diminuição destas defesas é acompanhada por uma diminuição da proliferação celular e indução de morte, sobretudo por apoptose tardia vs necrose (Freitas *et al.*, 2012b). A diminuição do conteúdo em GSH na presença de DEM é concordante com os resultados obtidos por Coffey e colaboradores (2000) e Coffey e colaboradores (2001). Estes autores demonstraram um aumento de apoptose nas células PC3 e noutras células representativas de metástase de cancro da próstata, LNCaP e DU145, induzida pela radiação, na presença de DEM. Os autores demonstraram que a apoptose era acompanhada de um fluxo de GSH do núcleo para o citosol admitindo que a presença desta defesa no núcleo poderá contribuir para a resistência à apoptose.

Para além dos nossos resultados confirmarem a diminuição de GSH, descritos nos estudos de Coffey e colaboradores (2000) e Coffey e colaboradores (2001) demonstram pela primeira vez a diminuição da atividade da Gl-Red na presença de DEM, evidenciando que a sua depleção participa na indução de citotoxicidade mediada por H₂O₂, nas células de cancro da próstata. Parece assim que a diminuição destas defesas poderá apresentar-se como uma estratégia terapêutica ou adjuvante da terapêutica do cancro da próstata. A diminuição da atividade da enzima, poderá estar também relacionado com a redução de GSH observado neste estudo (Freitas

et al., 2012b). Na realidade, a Gl-Red é a enzima que cataliza a transformação do glutatião oxidado (GSSG) em GSH, devolvendo-lhe as suas propriedades antioxidantes (Almondes *et al.*, 2010; Fujii *et al.*, 2011).

Estes resultados, também sugerem a possibilidade de utilização de outros compostos indutores da diminuição de GSH e da atividade da Gl-Red, ou do efeito combinado desses compostos com fármacos anticancerígenos convencionais. Esta associação poderá ser benéfica, pois poderá permitir utilizar concentrações mais reduzidas dos fármacos, do que o atualmente praticado, diminuindo os efeitos secundários (para revisão ver Freitas *et al.*, 2012a). Como já referido nos nossos resultados, e que iremos discutir adiante, o selenito de sódio, um indutor da diminuição de GSH, evidenciou um efeito anti-proliferativo sinérgico e indutor de morte celular, quando combinado com docetaxel, nas células PC3 (Freitas *et al.*, 2011).

Este estudo remete também para a importância de no futuro analisar o efeito de DEM nas células de epitélio normal, no sentido de avaliar a potencial citotoxicidade mediada pelo composto, em células não neoplásicas.

Apesar do modelo apresentado evidenciar uma abordagem mais clara da evolução do stresse oxidativo ao longo dos diferentes estádios do cancro da próstata, é importante considerar a possibilidade do modelo não refletir com exatidão a realidade *in vivo*. É assim, importante ter em conta que a estratégia terapêutica abordada, não assegura a mesma eficácia *in vivo*, e que as diferentes condições de cultura das células, nomeadamente, a utilização de diferentes meios de cultura, poderão influenciar os resultados obtidos, sendo importante experimentar esta abordagem num modelo animal.

A ação das defesas antioxidantes é relevante no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata. Este estudo contribui para uma melhor compreensão do envolvimento do stresse

oxidativo no cancro da próstata, uma vez que aborda, em simultâneo, células representativas dos diferentes estádios do cancro da próstata. É, segundo o nosso conhecimento, o estudo pioneiro na comparação do stresse oxidativo em linhas celulares representativas de epitélio normal, cancro localizado e cancro metastizado, demonstrando um aumento de ROS ao longo da progressão do cancro da próstata, concomitantemente com uma adaptação ao stresse oxidativo, através do aumento de GSH e da atividade da Gl-Red. Estes resultados, sugerem que esta dualidade deverá ser uma condição necessária para a progressão da doença e para a aquisição de um fenótipo maligno mais agressivo. Por sua vez, como as células de epitélio normal evidenciam menor produção de ROS, em condições basais, e uma maior suscetibilidade à citotoxicidade induzida por peróxidos, concomitantemente com níveis inferiores de GSH e atividade da Gl-Red, é de admitir que estas condições se relacionem com uma menor capacidade de adaptação a ROS nas células de epitélio normal. Estes resultados sugerem a relevância da atividade Gl-Red como potencial alvo terapêutico do cancro da próstata.

4.2.2 Ação do selenito de sódio em combinação com a terapêutica convencional

O selénio tem sido associado à prevenção do cancro da próstata, no entanto, concentrações elevadas deste composto relacionam-se com a indução de apoptose (Menter *et al.*, 2000; Husbeck *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Reagan-Shaw *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2009), resultante em parte do aumento de anião superóxido e da diminuição das defesas antioxidantes portadoras de grupos tiol (Husbeck *et al.*, 2005; Reagan-Shaw *et al.*, 2008).

Neste trabalho avaliámos a ação de selenito de sódio como estratégia terapêutica e adjuvante da terapêutica convencional no cancro da próstata, de forma isolada e em associação com o docetaxel, utilizando a linha celular de metástase PC3. O docetaxel é o agente quimioterapêutico de eleição para o tratamento do cancro da próstata, atuando através da sua ligação à subunidade β da tubulina IV, com conseqüente estabilização de microtúbulos. No entanto, as células de metástase desenvolvem resistência à quimioterapia (Para revisão ver Freitas *et al.*, 2012a).

Os nossos resultados evidenciaram um efeito anti-proliferativo sinérgico e indutor de morte celular, em resultado do efeito combinado de selenito de sódio e docetaxel, nestas células (Freitas *et al.*, 2011).

Demonstrou-se ainda que o docetaxel isoladamente tem um efeito anti-proliferativo, não evidenciando efeito citotóxico nas concentrações testadas (Nadiminty *et al.*, 2008). Makarovskiy e colaboradores (2002) verificaram que a exposição continuada ao docetaxel induz resistência em linhas celulares isoladas de metástase de cancro da próstata. Os nossos resultados confirmam que o selenito de sódio induz morte celular nas células PC3, como previamente documentado noutras linhas celulares de metástase da próstata, nomeadamente, nas células DU145, LNCaP e LAPC-4 (Menter *et al.*, 2000; Husbeck *et al.*, 2005). Além disso, a combinação do selenito de sódio com docetaxel evidenciou um efeito sinérgico de potenciação na inibição da proliferação celular e aditivo na indução de morte, maioritariamente por apoptose tardia *vs* necrose. Estes resultados estão de acordo com o bloqueio do ciclo celular nas fases G2M e S e a diminuição do $\Delta\Psi_{mit}$ observado nas células de metástase (Freitas *et al.*, 2011).

Subsequentemente avaliámos a expressão de moléculas envolvidas na sinalização da morte celular por apoptose, nomeadamente, das proteínas BCL2 e BAX, que desempenham uma ação anti-apoptótica e pró-apoptótica, respetivamente. A família das proteínas BCL2 é formada por

elementos indutores e repressores da apoptose que participam na regulação deste processo. Assim, a proteína BCL2 inibe a apoptose, pois, previne a libertação do citocromo C que por sua vez ativa a caspase 3, por via mitocondrial (Cory e Adams, 1998). Os resultados revelaram que o selenito de sódio, mas não o docetaxel, induz um aumento da razão BAX/BCL2 da expressão de citocromo C e de caspase 3, de acordo com estudos previamente descritos (Yoo *et al.*, 2008; Husbeck *et al.*, 2005; Xiang *et al.*, 2009). No entanto, o aumento de morte celular por apoptose tardia *vs* necrose, resultante da combinação dos compostos, não se encontra associada a um aumento da razão BAX/BCL2, expressão de citocromo C e caspase 3. Contudo, a técnica utilizada para os estudos de morte, não nos permite distinguir entre apoptose tardia e apoptose tardia *vs* necrose. Apesar de termos observado uma diminuição do $\Delta\Psi_{mit}$, concordante com apoptose, é ainda possível que uma percentagem de morte tenha ocorrido por necrose, a qual não se associa a aumento da expressão de marcadores apoptóticos, de acordo com o observado. No entanto, poderão estar envolvidas outras vias apoptóticas como a membranas ou extrínsecas, não abordadas neste estudo, e relacionadas com a ação dos recetores da família do TNF, como o TNF-R1 e o TRAIL, ou outros membros da família BCL2. Também é importante considerar a possibilidade de existência de morte celular por autofagia.

Estes resultados vão ao encontro dos estudos desenvolvidos por Yoo e colaboradores (2008) demonstrando que o docetaxel induz apoptose nas células PC3 mediada pelo TRAIL, mas não induz alterações significativas nos níveis intracelulares de BCL2.

A variação de caspase 3 apresenta aumento significativo apenas quando comparada com o controlo, encontrando-se significativamente aumentada nas células tratadas com selenito de sódio isoladamente e na presença deste composto em associação com o docetaxel. No entanto, quando comparamos o efeito da combinação dos compostos, em relação ao induzido pelo

selenito de sódio isoladamente, observamos uma diminuição de caspase 3, embora sem significado estatístico.

A morte celular observada, poderá também ser resultante da indução de stresse oxidativo. Estudos recentes associam o aumento de ROS com a presença de docetaxel, em linhas celulares de cancro da próstata metastizado, nomeadamente nas células DU-145 (Rabi e Bishayee, 2009). Surpreendentemente, os nossos resultados evidenciam uma diminuição de peróxidos, após 24 horas de tratamento. No entanto, é de admitir que os peróxidos tenham sido convertidos no radical hidroxilo, não avaliado, e que este tenha sido responsável pela lesão oxidativa, com consequente indução de morte celular. No entanto, resultados não apresentados, indicam que após 6 horas de tratamento com docetaxel e selenito de sódio, isoladamente não há alteração na produção intracelular de peróxidos nas PC3. Será assim, de admitir um papel importante do selenito de sódio na inibição do sistema antioxidante, como já sugerido, permitindo a ação do radical hidroxilo.

Xiang e colaboradores (2009) e Li e colaboradores (2007) demonstraram que o selenito de sódio induz apoptose através da formação de anião superóxido nas células de metástase da próstata LNCaP. A apoptose induzida pelo selenito de sódio, tem sido atribuída, em parte ao efeito pró-oxidante deste composto, associado a um aumento de anião superóxido (Xiang *et al.*, 2009). Os nossos resultados corroboram essas observações (Figura 3.19).

A Mn-SOD converte o anião superóxido em peróxido de hidrogénio como mencionado. Alguns autores referem que o selenito de sódio altera a distribuição intracelular desta defesa antioxidante, com diminuição na mitocôndria e consequente aumento no citosol (Guan *et al.*, 2009). Pelo exposto a sua diminuição na matriz mitocondrial poderá resultar numa ineficiente dismutação de anião superóxido em peróxido de hidrogénio, justificando em parte, a pequena

quantidade peróxidos observada. O mesmo estudo reforça as observações de Li e colaboradores (2007) e Xiang e colaboradores (2009) demonstrando um aumento de anião superóxido na presença de selenito de sódio. Outros estudos reforçam a relevância da Mn-SOD. Assim, Xiang e colaboradores (2009) revelam que a sobre expressão desta enzima se associa a resistência celular à morte induzida por selenito de sódio.

O aumento de GSH parece estar associado a uma maior resistência das células à presença de ROS (Freitas *et al.*, 2012b) como as resultantes da radiação (Coffey *et al.*, 2000). Apesar do selenito de sódio, em pequenas concentrações, se associar a um efeito preventivo do cancro da próstata contribuindo para a síntese de seleno-proteínas como as defesas antioxidantes Gl-Px e redutase de tiorredixina (TRxr), concentrações elevadas, encontram-se associadas à diminuição da razão GSH/GSSG e alteração subcelular da Mn-SOD, contribuindo para o aumento do stresse oxidativo, com aumento de ROS e da suscetibilidade das células à apoptose (Husbeck *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2009).

O aumento da razão BAX/BCL2, da expressão de citocromo C e de anião superóxido, e a diminuição do $\Delta\psi_{mit}$, de Mn-SOD e da razão GSH/GSSG, como demonstrado, (Husbeck *et al.*, 2005; Xiang *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2011) reforça a contribuição do selenito de sódio na indução de apoptose pela via mitocondrial. Neste estudo poderia ter sido esclarecedor avaliar o tipo de morte celular, para períodos de incubação inferiores a 24 horas, a fim de avaliar se este composto induziu apoptose, em vez da apoptose tardia vs necrose. Os diferentes estudos são reveladores de que uma multiplicidade de vias intracelulares poderão ser alvo da ação combinada do selenito de sódio e docetaxel. Desta forma, a combinação de ambos reforça a ideia de que uma estratégia anti neoplásica se torna mais eficaz quando dirigida a diversos alvos celulares, ao invés de um número restrito, facilitando o desenvolvimento de

resistência, como se verifica com o docetaxel isoladamente. É de esperar que em resultado do efeito sinérgico, observado com as associações terapêuticas, seja possível a utilização de concentrações mais reduzidas dos fármacos (Para revisão ver Freitas *et al.*, 2012a).

Neste estudo podemos concluir que a ação combinada do docetaxel e selenito de sódio evidenciam um efeito anti-proliferativo sinérgico e uma indução significativa de morte celular, maioritariamente por apoptose tardia *vs* necrose, em concordância com a diminuição do $\Delta\Psi_m$. Além disso, estes resultados poderão estar relacionados com um bloqueio do ciclo celular e/ou produção de outras ROS, para além de peróxidos, como sendo o anião superóxido e o radical hidroxilo, de todos o mais lesivo para os sistemas biológicos.

Pelo exposto, os resultados sugerem que a ação combinada de docetaxel e selenito de sódio, poderão constituir uma estratégia terapêutica de cancro da próstata, mais eficaz que o docetaxel isoladamente.

Este estudo remete também para a importância de no futuro avaliar o efeito combinado destes compostos em células de epitélio normal, no sentido de avaliar a potencial citotoxicidade mediada pela ação conjunta dos fármacos. No entanto, é importante considerar a possibilidade do modelo em estudo não refletir com exatidão a realidade *in vivo* pelo que seria relevante analisar a presente abordagem num modelo animal.

4.2.3 Contribuição da função mitocondrial na progressão do cancro da próstata

A respiração celular que ocorre a nível mitocondrial é o fenómeno predominantemente responsável pela produção intracelular de ROS (Freeman *et al.*, 1986), por sua vez dependente

da atividade dos complexos I e III da cadeia respiratória. A redução incompleta do oxigênio condiciona a formação de anião superóxido, posteriormente convertido em H₂O₂ por ação da superóxido dismutase (Grek e Tew, 2010).

O aumento da produção de peróxidos intracelulares ao longo da progressão da doença, particularmente, nas células de metástase, bem como o aumento do $\Delta\Psi_{mit}$ e da viabilidade celular, são sugestivos da participação da mitocôndria na progressão do cancro da próstata.

A avaliação de outras ROS, como a produção de anião superóxido, permitiu concluir que este se encontra aumentado nas células de metástase o que poderá estar relacionado com um aumento da produção intracelular de peróxidos por ação da superóxido dismutase (Grek e Tew, 2010).

Adicionalmente, avaliámos a participação da mitocôndria através da determinação da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial: I, II+III (redutase do succinato-citocromo C, SCCR) e da sintase do citrato.

Os resultados evidenciam um aumento significativo da sintase do citrato na linha celular de metástase PC3, o que traduz um maior número de mitocôndrias nestas células, comparativamente às células RWPE1 e HPV10. Desta forma, os resultados são concordantes com um maior $\Delta\Psi_{mit}$, produção de ROS e viabilidade celular, observado nesta linha. Perante um número mais elevado de mitocôndrias, poderemos admitir a presença de uma maior quantidade de Mn-SOD, a qual poderá contribuir também para uma maior resistência destas células ao stresse oxidativo, bem como uma maior produção de peróxidos em resultado da conversão de anião superóxido em peróxidos, através da referida enzima.

Segundo o presente modelo de estudo, o aumento do número de mitocôndrias parece estar mais relacionado com a progressão da doença do que com o seu desenvolvimento inicial, dado que

não se observam diferenças significativas entre as células de epitélio normal, RWPE1, e as de cancro localizado, HPV10.

Relativamente à atividade dos complexos da cadeia respiratória, observa-se diminuição da atividade dos complexos II/III normalizado em função da sintase do citrato, isto é em função do número de mitocôndrias, em ambas as linhas celulares de cancro da próstata, sendo mais acentuado nas células de metástase. Os resultados sugerem uma alteração deste complexo, desde os estádios iniciais de desenvolvimento da doença. Por outro lado, o acentuado aumento das mitocôndrias, observado nas células PC3, poderá em parte ser um resultado compensatório da diminuição da atividade destes complexos.

A diminuição da atividade associada ao complexo III, também poderá contribuir para explicar uma maior produção de ROS. Observa-se maior atividade do complexo I da cadeia respiratória, nas células de cancro da próstata, sobretudo nas células de metástase, sugerindo a sua alteração quer nos estádios iniciais quer nos mais avançados da doença.

4.2.4 Ação de compostos presentes no fumo do tabaco nas linhas celulares

A compreensão dos mecanismos que estão na base do aumento de ROS durante o desenvolvimento e progressão do cancro da próstata não se resumem às alterações mitocondriais aqui evidenciadas, ou à contribuição do sistema NOX como descrito por Kumar e colaboradores (2008).

Inúmeros estudos sugerem a contribuição do estilo de vida, da dieta alimentar, da obesidade (Park *et al.*, 2011; van Kruijsdijk *et al.*, 2009), da inflamação crónica ou recorrente (Nelson *et al.*, 2003), do envelhecimento (Khandrika *et al.*, 2009), da exposição a carcinogéneos como os

hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e as aminas aromáticas heterocíclicas (Cerhan *et al.*, 1999; Hickey *et al.*, 2001), no desenvolvimento do cancro da próstata. Todas estas condições estão associadas a um aumento de ROS e, por conseguinte, constituem fatores de risco para esta doença. Apesar da exposição a compostos resultantes das combustões, como os PAHs, presentes no fumo do tabaco, estar implicada no desenvolvimento do cancro da próstata, pouco se sabe sobre o seu papel na progressão da doença. Assim, urge conhecer o contributo destes compostos no processo de carcinogénese em geral e da próstata em particular, permitindo a identificação de novas formas de abordar a doença, tornando a sua terapêutica mais eficaz.

Foi demonstrado que células expostas ao fumo do tabaco possuem maior quantidade de ADN mitocondrial, quando comparadas com células de não fumadores (Tan *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2012). Uma vez que o aumento do número de cópias de ADN mitocondrial reflete maior quantidade de mitocôndrias (El Shourbagy *et al.*, 2006; St John *et al.*, 2006) e que estas se encontram em maior número nas células de metástase, de acordo com os nossos resultados, é de admitir que a exposição a estes compostos contribua para a progressão da doença. Além disso, o aumento do conteúdo de ADN mitocondrial encontra-se associado a lesão do ADN e à redução da função da cadeia respiratória resultantes da lesão oxidativa, a qual poderá ser induzida pelo fumo do tabaco (Tan *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2012).

Vários estudos indicam que os indivíduos fumadores possuem níveis de marcadores moleculares compatíveis com aumento de stresse oxidativo (Bloomer, 2007) nomeadamente, um aumento do malonilaldeído (MDA), o qual se encontra associado à peroxidação lipídica, como evidenciado no nosso estudo (Freitas *et al.*, 2007). O mesmo estudo revelou aumento de stresse oxidativo num grupo de doentes fumadores com cancro da próstata, traduzido por diminuição do estado antioxidante total (TAS) e de GSH, sugerindo a participação dos hábitos tabágicos e do stresse

oxidativo no desenvolvimento do cancro da próstata. Os hábitos tabágicos também se associam a diminuição dos níveis séricos das vitaminas A e C, da razão GSH/GSSG e cisteína/cisteína oxidada, bem como a diminuição dos níveis do aminoácido cisteína, necessários à conversão de GSSG em GSH (Yanbaeva, *et al.*, 2007; Sarir, *et al.*, 2009).

Os resultados deste trabalho, mostram que as concentrações de PAHs testadas, e correspondentes às concentrações ambientais, nomeadamente as existentes no fumo do tabaco (Lodovici *et al.*, 2004), estimulam a proliferação celular de uma forma dependente do tempo de exposição, do tipo de linha celular e do composto. Este efeito, foi mais pronunciado nas células representativas de cancro localizado, HPV10 sugerindo que a exposição aos PAHs poderá favorecer o desenvolvimento do cancro da próstata, logo nos estádios iniciais da doença. Plísková e colaboradores (2005) observaram um aumento da proliferação celular numa linha de cancro da mama, as células MCF-7, quando tratadas com PAHs, nomeadamente, benzopireno, o que pode resultar da interação dos PAHs com os recetores dos androgénios de forma agonista (Vingaard *et al.*, 2000). Na maioria das vezes o cancro da próstata é dependente da estimulação dos recetores dos androgénios para a proliferação e sobrevivência das células. No entanto, como já abordado, uma diversidade de mecanismos poderá contribuir para que estas células se tornem independentes dos androgénios, incluindo a sobre expressão, amplificação e mutação do AR. Estas alterações poderão induzir uma maior sensibilidade do AR à presença de androgénios ou outras hormonas, promovendo a proliferação (Koochekpou, 2010). No estádio hormono-independente, existem outras vias intracelulares alternativas àquela que envolve o recetor do androgénio para estimular a proliferação celular (Marques *et al.*, 2010). No entanto, as células estudadas, HPV10 e PC3, não expressam o AR (resultados não apresentados), sugerindo que

outras vias celulares, como as que envolvem a sinalização mediada por ROS, deverão estar implicadas na proliferação, sob a ação de PAHs.

Chaudhary e colaboradores (2007) demonstraram que os PAHs, nomeadamente o benzopireno, induzem aumento de ciclofilina A, associada à proliferação celular. De acordo com Li e colaboradores (2006) esta encontra-se sobre expressa em células de cancro pancreático. Estes autores demonstraram que o mesmo composto induz aumento de produção de ROS nas células de cancro da próstata 22Rv1 bem como em células de epitélio da próstata normal (PrEC) (Kumar *et al.*, 2008).

Para além do aumento da proliferação celular, pudemos observar um aumento de ROS nas células tratadas com PAHs, nomeadamente nas HPV10, RWPE1 mas, não nas PC3, a quais evidenciam valores basais muito superiores. Os nossos resultados também demonstram que o aumento de ROS não é acompanhado por um aumento do conteúdo em GSH, sugerindo que o incremento de ROS não terá sido suficiente para induzir a ação de GSH, ou que a técnica em uso não é suficientemente sensível para detetar a alteração do conteúdo em glutatião. É de notar que as células PC3 evidenciam valores basais de GSH superiores, concordantes com níveis de ROS bastante superiores. Contudo, os PAHs poderão ter sido neutralizados por outras defesas antioxidantes como a GST (Kabler *et al.*, 2009).

Além da participação do stresse oxidativo, a expressão de HIF e de VEGF são necessárias à invasão e metastização do cancro. O HIF ativa genes envolvidos na proliferação celular, invasão, sobrevivência e angiogénese como o VEGF (Alqawi *et al.*, 2006; Kilic *et al.*, 2007). Esta molécula desempenha um papel na formação de novos vasos - angiogénese, necessária à metastização (Nicholson *et al.*, 2001).

De acordo com o esperado, as células de metástase PC3, evidenciam valores de HIF e VEGF significativamente superiores em condições basais. Além disso, os níveis de expressão do HIF aumentam em condições de hipóxia. No entanto, na presença de PAHs observámos um aumento da expressão de HIF e VEGF mais pronunciado na linha celular HPV10, reforçando a ação destes compostos no desenvolvimento dos estádios iniciais desta doença. O aumento da proliferação celular e da expressão de HIF e VEGF nas células PC3, sugere que estes compostos poderão tornar as células de metástase potencialmente mais invasivas.

Haque e colaboradores (2005) demonstraram em células de cancro da próstata que o benzo(a)pireno estimula a produção de metaloproteinase-9, uma enzima envolvida da dissolução da matriz tecidual, necessária à metastização.

Os estudos com PAHs, presentes no fumo do tabaco, ao induzirem proliferação celular, produção de ROS e expressão de HIF e VEGF, particularmente nas células de cancro localizado, sugerem que a exposição a estes compostos contribui para a progressão do cancro da próstata. Desta forma, seria de avaliar a quantidade de PAHs que atinge o tecido prostático de fumadores e de indivíduos expostos a estes poluentes ambientais. É também importante ter em conta que o efeito dos PAHs poderá ser cumulativo, pelo que a exposição a estes compostos, nomeadamente, através dos hábitos tabágicos deverá ser evitada a fim de prevenir o desenvolvimento e progressão do cancro da próstata.

É ainda de considerar que a interação gene-ambiente nos diversos tipos de cancro associados aos hábitos tabágicos é complexa, dependendo inclusivamente, da multiplicidade de genes envolvidos no metabolismo dos compostos do fumo do tabaco (Taioli, 2008).

5. CONCLUSÕES GERAIS

As conclusões dos resultados obtidos neste estudo, em doentes com cancro da próstata e em linhas celulares, representativas dos diferentes estádios da doença, serão divididas em duas partes: estudos realizados em sangue periférico (*in vivo*) e estudos realizados em linhas celulares (*in vitro*).

5.1 Estudo realizado em sangue periférico

No grupo de indivíduos com doença avançada observou-se um aumento de stresse oxidativo, caracterizado pela diminuição significativa do TAS, possivelmente em resultado da diminuição de defesas antioxidantes que participam diretamente no ciclo de oxidação/redução do GSH, como o próprio GSH e atividade da Gl-Px, e ainda em resultado da diminuição de VIT A ou tendência para a diminuição de GST e aumento de NO·.

A associação positiva entre GSH vs TAS determinada pela análise da correlação *Spearman's rho* reforça a importância de utilização destes parâmetros como possíveis marcadores moleculares de stresse oxidativo na monitorização da doença, adicionalmente à avaliação do PSA.

Estes resultados sugerem o envolvimento do stresse oxidativo na patogenia do cancro da próstata, em particular nas fases avançadas da doença, podendo constituir eventuais novos biomarcadores preditivos do prognóstico. Além disso, apontam para a sua potencial utilização como marcadores na monitorização da doença.

A BPH e a prostatite crónica, são patologias prostáticas associadas também a aumento de stresse oxidativo. Na prostatite crónica observa-se diminuição significativa de GSH plasmática,

enquanto na BPH, se observa aumento de MDA eritrocitário e diminuição significativa da atividade da Gl-Px.

Os nossos resultados confirmam que o PSA é significativamente superior no grupo de doentes com cancro da próstata, sobretudo na doença avançada e que o aumento de PSA parece estar relacionado com o aumento de stresse oxidativo nos doentes. Assim, observou-se tendência para a diminuição de GSH eritrocitário, em conformidade com o aumento do PSA, acompanhada de uma redução significativa da atividade da Gl-Red. Relativamente ao NO \cdot , observou-se uma tendência para o seu aumento nos doentes relativamente ao controlo e que o aumento de NO \cdot acompanhou de forma significativa o aumento de PSA no grupo de doentes com cancro da próstata localizado. Assim, os resultados reforçam a potencial utilidade na determinação do NO \cdot , como eventual marcador molecular preditivo da agressividade e progressão do cancro da próstata. O aumento de NO \cdot também parece estar associado ao aumento de IMC nos doentes.

Os hábitos tabágicos parecem estar relacionados com aumento de NO \cdot e GC, diminuição da atividade da Gl-Px, de GST, de VIT E eritrocitária e de TAS, nos doentes fumadores, sugerindo que os hábitos tabágicos poderão acelerar a progressão da doença, em parte, através do aumento de stresse oxidativo. O aumento de NO \cdot nos doentes fumadores sugere fortemente a sua contribuição no agravamento do cancro da próstata. Tratando-se de um fator de risco modificável a sua evicção deveria ser considerada para a prevenção do desenvolvimento e progressão do cancro da próstata.

Além do tabaco, os resultados indicam que a ingestão de 60g de álcool diariamente nos indivíduos doentes poderá contribuir para o agravamento da doença, através do aumento de stresse oxidativo, evidenciado pela lesão oxidativa de proteínas (deteção de GC) e de lípidos (níveis de MDA).

Pelo exposto, o nosso estudo sugere que a cessação alcoólica e a evicção tabágica poderão minimizar o desenvolvimento e progressão do cancro da próstata. No entanto, seria necessário aumentar o tamanho da amostra, de forma a avaliar o efeito combinado destas condições.

A análise das variantes polimórficas do *VEGF* evidenciou uma frequência de distribuição do genótipo GG, superior nos doentes com cancro da próstata metastizado (50%), comparativamente ao grupo controlo (44%) e aos doentes com cancro localizado (44%), sugerindo que os doentes com este genótipo têm tendência para um maior risco de desenvolver doença avançada. No entanto, os resultados não evidenciam significado estatístico.

Apesar do pequeno tamanho da amostra, os resultados sugerem uma possível associação entre o haplótipo C ou o genótipo CC do *VEGF* e um menor stresse oxidativo nestes indivíduos. Desta forma observa-se um maior conteúdo em GSH nos portadores do alelo C, comparativamente aos portadores do genótipo GG, bem como uma tendência para o aumento de GSH no genótipo CC, relativamente aos portadores do alelo G. Também se observa uma propensão para um maior conteúdo em TAS no genótipo CC, relativamente aos portadores do alelo G e um menor conteúdo em MDA no genótipo CC e nos portadores do alelo C, sugerindo que os indivíduos portadores deste polimorfismo apresentam tendência para um menor stresse oxidativo podendo ser um fator protetor do desenvolvimento e progressão do cancro da próstata.

5.2 Estudo realizado em linhas celulares

Do estudo realizado em linhas celulares resultaram as seguintes conclusões:

Os resultados efetuados em linhas celulares mostram que as células isoladas de metástase de cancro da próstata são resistentes a concentrações elevadas de ROS, mantendo a viabilidade celular elevada. A produção de peróxidos é menor na linha celular de epitélio normal, e maior nas células de cancro da próstata, encontrando-se particularmente aumentada na linha celular isolada de metástase, PC3, corroborando o aumento de ROS, durante a progressão da doença.

O nosso estudo, revela ainda uma produção de anião superóxido superior nas células PC3, o que poderá estar relacionado com um aumento da produção intracelular de peróxidos.

Além de evidenciarem maior produção de ROS, as células PC3 apresentam maior viabilidade celular, maior $\Delta\psi_{mit}$, menor peroxidação lipídica (MDA), maior estado de antioxidação total (TAS), consistente, com uma maior resistência às ROS. Nestas células encontrou-se diminuição significativa da atividade da Gl-Px e dos níveis de GST e aumento significativo de GSH e da atividade da Gl-Red, as quais, deverão participar na adaptação ao stresse oxidativo induzido pelo aumento de ROS. Estes resultados foram confirmados pela depleção da atividade da Gl-Red e diminuição do conteúdo em GSH, pela ação de DEM, o que resultou na indução de citotoxicidade mediada por H_2O_2 com diminuição da proliferação celular e indução de morte sobretudo por apoptose tardia vs necrose, sugerindo a modulação do stresse oxidativo como estratégia terapêutica do cancro da próstata.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, estes resultados são os primeiros a evidenciar o papel da atividade Gl-Red como potencial alvo terapêutico no cancro da próstata sugerindo ainda a

possibilidade de utilização de outros compostos indutores da diminuição de GSH e da atividade da Gl-Red.

Neste sentido foi também avaliada a ação combinada de docetaxel e selenito de sódio nas células de metástase, evidenciando um efeito anti-proliferativo sinérgico com bloqueio do ciclo celular nas fases G2M e S e uma indução significativa de morte celular maioritariamente por apoptose tardia *vs* necrose. Estes resultados estão de acordo com uma diminuição do $\Delta\Psi_m$, nas células de metástase e um aumento da razão BAX/BCL2, expressão de citocromo C e caspase 3.

Apesar da menor detecção de peróxidos a morte celular, poderá resultar de indução de stresse oxidativo possivelmente, por eventual conversão de peróxidos, no radical hidroxilo que não foi contudo avaliado. Assim, além do aumento da razão BAX/BCL2 e da expressão de citocromo C, o aumento de anião superóxido e a diminuição de $\Delta\Psi_{mit}$, reforçam a importância da apoptose induzida pelo selenito de sódio pela via mitocondrial.

Pelo exposto, os resultados sugerem que a ação combinada de docetaxel e selenito de sódio, poderão constituir uma estratégia terapêutica de cancro da próstata, mais eficaz que o docetaxel isoladamente, atuando como moduladores de stresse oxidativo. É ainda de esperar que em resultado do efeito sinérgico entre os dois compostos seja possível a sua utilização em menores concentrações com conseqüente diminuição dos efeitos secundários.

Na tentativa de melhor compreender a relação entre a mitocôndria e o stresse oxidativo na carcinogénese da próstata, foi avaliada a atividade dos complexos da cadeia respiratória. Na linha celular de metástase, PC3, observou-se aumento significativo da sintase do citrato, evidenciando maior quantidade de mitocôndrias, comparativamente às células RWPE1 de epitélio prostático não neoplásico e HPV10 de cancro da próstata localizado. Estes resultados são concordantes com o elevado $\Delta\Psi_{mit}$, com a produção de ROS e a viabilidade celular, observado

nas células PC3, o que confirma a participação da mitocôndria na progressão do cancro da próstata. Além disso, observou-se diminuição da atividade dos complexos II/III da cadeia respiratória mitocondrial em ambas as linhas celulares de cancro da próstata, sendo mais acentuado nas de metástase. Os resultados sugerem uma alteração deste complexo, desde os estádios iniciais do desenvolvimento da doença. O acentuado aumento no número de mitocôndrias, observado nas células PC3, poderá em parte ser um resultado compensatório da diminuição da atividade destes complexos.

A diminuição da atividade associada ao complexo III, também poderá contribuir para explicar a maior produção de ROS. Em suma o aumento do número de mitocôndrias e as alterações na atividade da cadeia respiratória mitocondrial contribuem para o aumento de ROS nas células de metástase de cancro da próstata, podendo estar relacionado com a evolução da doença para estádios mais agressivos. Pelo exposto as modificações observadas neste organelo conferem vantagem de sobrevivência, tornando-o um potencial alvo terapêutico no cancro da próstata metastizado.

Para além da produção endógena de ROS, estas podem ter uma origem exógena como em resultado da exposição ao fumo do tabaco. Neste estudo quisemos avaliar de que forma os compostos presentes no fumo do tabaco, como os PAHs, poderão participar no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata. Para o efeito foi avaliada a expressão de HIF e de VEGF, duas moléculas envolvidos na metastização. A linha celular isolada de metástase de cancro da próstata, as células PC3, evidencia valores basais de HIF e VEGF, significativamente superiores aos encontrados para a linha celular derivada de epitélio prostático normal, as células RWPE1, ou para a linha celular obtida de cancro da próstata localizado, as células HPV10, sugerindo o seu papel na metastização destas células.

Na presença de PAHs, observou-se aumento de proliferação celular, da produção de ROS, da expressão de HIF e VEGF, nas três linhas celulares, particularmente, nas células representativas de cancro localizado, HPV10. Estes resultados indicam que a exposição aos PAHs poderá favorecer o desenvolvimento do cancro da próstata, desde os estádios iniciais da doença. Por outro lado, o efeito dos PAHs no aumento da proliferação celular, na expressão de HIF e VEGF, na linha celular isolada de metástase PC3, sugere também que estes compostos poderão contribuir para a progressão e agressividade da doença. Estes factos parecem indicar que a angiogénese e o stresse oxidativo aumentam progressivamente no decurso da doença, contribuindo para a evolução do cancro da próstata.

Este estudo é o primeiro a comparar o stresse oxidativo em linhas celulares representativas de epitélio normal, cancro localizado e cancro metastizado, demonstrando um aumento de ROS ao longo da progressão do cancro da próstata, concomitantemente com uma adaptação ao stresse oxidativo através do aumento de GSH e Gl-Red. Esta dualidade deverá ser uma condição necessária para a progressão da doença e para a aquisição de um fenótipo maligno mais agressivo.

5.3 Conclusão geral e perspetivas futuras

A figura 5.1 esquematiza a conclusão geral deste trabalho. Assim, podemos afirmar que o aumento de stresse oxidativo parece contribuir para a progressão do cancro da próstata. Nos doentes, reflete-se no aumento da lesão oxidativa de biomoléculas, incluindo de defesas antioxidantes, inativando-as. É assim de esperar que este aumento de stresse oxidativo seja

acompanhado de uma maior produção e circulação de ROS no organismo. Para o efeito poderá contribuir fortemente a exposição ao fumo do tabaco e a presença de células de metástase, as quais exibem níveis de ROS muito elevados. Este aumento nas células parece resultar de uma maior quantidade de mitocôndrias e da alteração da função mitocondrial, evidenciada pela modificação da atividade dos complexos da cadeia respiratória. No entanto, o aumento de ROS nestas células parece ser contrariado pela atividade da Gl-Red e pelo conteúdo em GSH, permitindo a adaptação das células de metástase ao stresse oxidativo. Pelo exposto, sugerimos a modulação do stresse oxidativo como estratégia terapêutica, através da diminuição da atividade da Gl-Red e do conteúdo em GSH.

Para além do aumento de ROS estas células evidenciam valores basais de HIF e VEGF aumentados, os quais que estão envolvidos na metastização, e apresentam maior capacidade de sobrevivência e proliferação. É de salientar que a exposição das células de cancro da próstata a PAHs, presentes no fumo do tabaco, induz aumento da expressão de HIF e VEGF.

Contudo, se por um lado seria de esperar que os doentes beneficiassem das defesas antioxidantes em falta é preciso ter em conta que algumas das defesas suprimidas nestes, como a GSH, estão aumentadas nas células de cancro da próstata. Da mesma forma, é necessário avaliar de que forma a proposta de modulação do stresse oxidativo nas células de cancro se poderá refletir no organismo. Uma possibilidade de contornar o problema assentaria numa terapêutica dirigida às células alvo.

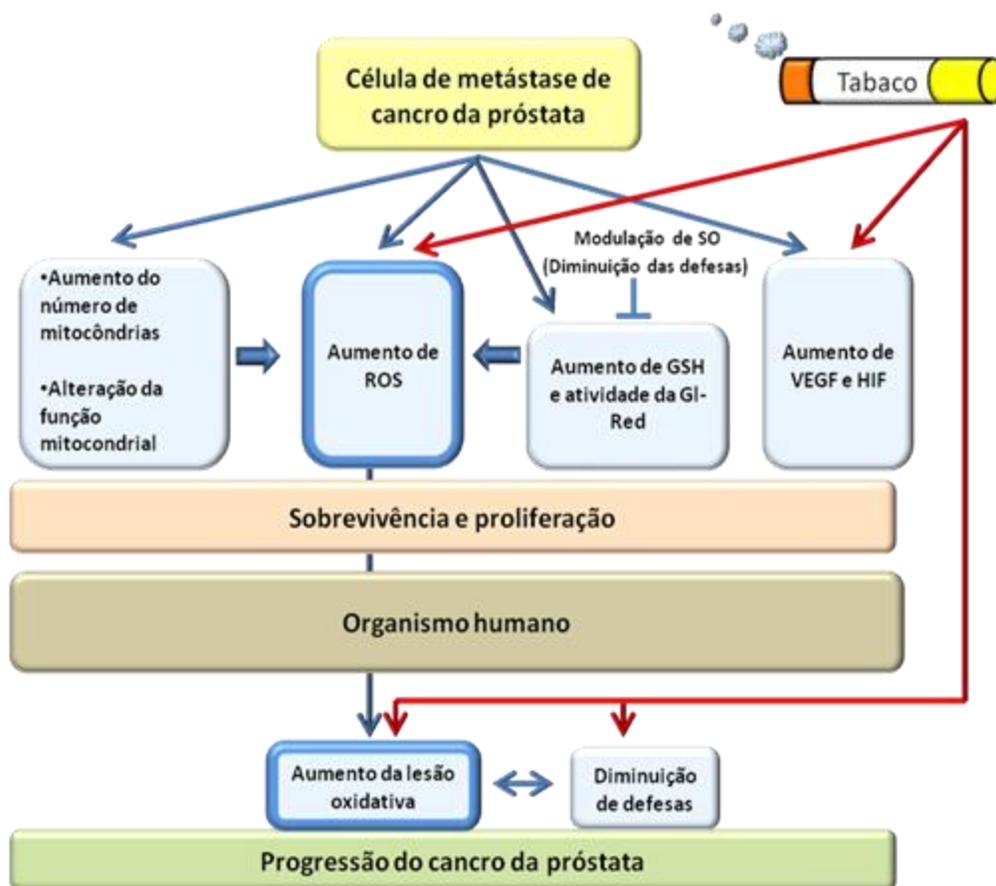


Figura 5.1 – Esquema resumido dos resultados encontrados relativamente à ação do stresse oxidativo e do tabaco no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata

Face à relevância do sistema antioxidante que envolve a oxidação/redução do GSH, parece importante, numa perspetiva futura, complementar o presente estudo com a avaliação da concentração do glutatião oxidado (GSSG).

Somos de opinião que um estudo mais alargado em sangue periférico de forma a permitir uma seriação mais restritiva de doentes por estadiamento (distinguindo entre os metastizados na fase hormono-dependente e os de escape hormonal), tempo de evolução, esquema terapêutico, IMC, níveis de PSA, hábitos tabágicos e alcoólicos, validaria a identificação de marcadores

bioquímicos que se relacionem com a evolução da afeção, bem como o contributo de algumas das variáveis supracitadas na progressão do cancro da próstata.

Os estudos em linhas celulares que não incluíram as células de epitélio prostático não neoplásico, poderão ser contemplados no futuro e aplicados a um modelo animal.

Em suma o presente estudo corrobora as teorias defensoras do envolvimento do stresse oxidativo no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata, através do aumento de ROS. Este pode ter origem endógena como a mitocondrial, ou exógena como a resultante de hábitos tabágicos ou alcoólicos, sugerindo a sua evicção nos doentes.

O trabalho apresentado contribui para uma melhor compreensão do envolvimento do stresse oxidativo nesta patologia, sugerindo inclusivamente, a sua modulação como estratégia terapêutica do cancro da próstata.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Agostinho P, Duarte CB, Oliveira CR. 1997.** Impairment of excitatory amino acid transporter activity by oxidative stress conditions in retinal cell: affect of antioxidants. *FASEB J* **11**: 154-163.
- **Ahmad A, Banerjee S, Wang Z, Kong D, Majumdar AP, Sarkar FH. 2009.** Aging and inflammation: etiological culprits of cancer. *Curr Aging Sci* **2**: 174-186.
- **Almondes KG, Leal GV, Cozzolino SM, Philippi ST, Rondo PH. 2010.** The role of selenoproteins in cancer. *Rev Assoc Med Bras* **56**: 484-488.
- **Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbot BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. 1998.** Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* **48 (3)**: 589–601.
- **Alqawi O, Moghaddas M, Singh G. 2006.** Effects of geldanamycin on HIF-1 α mediated angiogenesis and invasion in prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **9**: 126-135.
- **Ansari MS, Gupta NP, Hemal AK. 2002.** Chemoprevention of carcinoma prostate: a review. *Int Urol Nephrol* **34**: 207-214.
- **Autrup JL, Thomassen LH, Olsen JH, Wolf H, Autrup H. 1999.** Glutathione S-transferases as risk factors in prostate cancer. *Eur J Cancer Prev* **8**: 525-532.
- **Balbay MD, Pettaway CA, Kuniyasu H, Inoue K, Ramirez E, Li E, Fidler IJ, Dinney CP. 1999.** Highly metastatic human prostate cancer growing within the prostate of athymic mice overexpresses vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* **5(4)**: 783-789.
- **Baldeiras I, Santana I, Proença MT, Garrucho MH, Pascoal R, Rodrigues A, Durob D, Resende-Oliveira C. 2010.** Oxidative Damage and Progression to Alzheimer's Disease in Patients with Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimer's Disease*. **21**: 1165–1177.
- **Beckman KB, Ames BN. 1998.** The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**: 547-581.

- **Beilin J, Ball EM, Favaloro JM, Zajac JD. 2000.** Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol* **25**: 85-96.
- **Beliveau R, Gingras D. 2007.** Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician* **53**: 1905-1911.
- **Bergers G, Benjamin LE. 2003.** Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3(6)**: 401-10.
- **Board PG, Webb GC, Coggan M. 1989.** Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Ann Hum Genet* **53**: 205-213.
- **Bello D, Webber MM, Kleinman HK, Wartinger DD, Rhim JS. 1997.** Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis* **18**: 1215-1223.
- **Bettuzzi S, Brausi M, Rizzi F, Castagnetti G, Peracchia G, Corti A. 2006.** Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer Res* **66**: 1234-1240.
- **Biswas SK, Rahman I. 2009.** Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med* **30**: 60-76.
- **Bloomer RJ. 2007.** Decreased blood antioxidant capacity and increased lipid peroxidation in young cigarette smokers compared to nonsmokers: Impact of dietary intake. *Nutr J* **6**: 39.
- **Bosetti C, Bertuccio P, Chatenoud L, Negri E, La Vecchia C, Levi F. 2011.** Trends in mortality from urologic cancers in Europe, 1970-2008. *Eur Urol* **60**: 1-15.
- **Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters DJ, Timms B. 2004.** Human prostate cancer risk factors. *Cancer* **101**: 2371-2490.
- **Bostwick DG, Liu L, Brawer MK, Qian J. 2004.** High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Rev Urol* **6**: 171-179.
- **Bracarda S, de Cobelli O, Greco C, Prayer-Galetti T, Valdagni R, Gatta G, de Braud F, Bartsch G. 2005.** Cancer of the prostate. *Crit Rev Oncol Hematol* **56**: 379-396.

- **Brooks JD, Weinstein M, Lin X, Sun Y, Pin SS, Bova GS, Epstein JI, Isaacs WB, Nelson WG. 1998.** CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**: 531-536.
- **Burdon RH. 1995.** Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free radical Biol Med* **18(4)**: 775-794.
- **Burton JB, Priceman SJ, Sung JL, Brakenhielm E, An DS, Pytowski B, Alitalo K, Wu L. 2008.** Suppression of prostate cancer nodal and systemic metastasis by blockade of the lymphangiogenic axis. *Cancer Res* **68(19)**: 7828-7837.
- **Capitanio U, Suardi N, Briganti A, Gallina A, Abdollah F, Lughezzani G, Salonia A, Freschi M, Montorsi F. 2012.** Influence of obesity on tumour volume in patients with prostate cancer. *BJU Int* **109**: 678-684.
- **Carew JS, Huang P. 2002.** Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* **1**: 9.
- **Cerhan JR, Parker AS, Putnam SD, Chiu BC, Lynch CF, Cohen MB, Torner JC, Cantor KP. 1999.** Family history and prostate cancer risk in a population-based cohort of Iowa men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**: 53-60.
- **Chang JW, Jeon HB, Lee JH, Yoo JS, Chun JS, Kim JH, Yoo YJ. 2001.** Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 507-512.
- **Chaudhary A, Pechan T, Willett KL. 2007.** Differential protein expression of peroxiredoxin I and II by benzo(a)pyrene and quercetin treatment in 22Rv1 and PrEC prostate cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* **220**: 197-210.
- **Cheng L, Darson MF, Bergstralh EJ, Slezak J, Myers RP, Bostwick DG. 1999.** Correlation of margin status and extraprostatic extension with progression of prostate carcinoma. *Cancer* **86**: 1775-1782.
- **Civetta MMT, Civetta JD. 2011.** (Carcinogenesis). *Salud Publica Mex* **53**: 405-414.
- **Clerkin JS, Naughton R, Quiney C, Cotter TG. 2008.** Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett* **18**;266(1):30-6.
- **Cohen JH, Kristal AR, Stanford JL. 2000.** Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **92**: 61-68.
- **Cossarizza A, Baccarini-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. 1993.** A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using J-

aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun.* 197: 40-45.

- **Choi KJ, Piao YJ, Lim MJ, Kim JH, Ha J, Choe W, Kim SS. 2007.** Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death. *Cancer Res* **67**: 3654-3662.
- **Coffey RN, Watson RW, Hegarty NJ, O'Neill A, Gibbons N, Brady HR, Fitzpatrick JM. 2000.** Thiol-mediated apoptosis in prostate carcinoma cells. *Cancer* **88**: 2092-2104.
- **Cooney KA, Wetzel JC, Merajver SD, Macoska JA, Singleton TP, Wojno KJ. 1996.** Distinct regions of allelic loss on 13q in prostate cancer. *Cancer Res* **56**: 1142-1145.
- **Counts ME, Morton MJ, Laffoon SW, Cox RH, Lipowicz PJ. 2005.** Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions. *Regul Toxicol Pharmacol* **41**: 185-227.
- **Cory S, Adams JM. 2002.** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* (**9**): 647-656.
- **Coussens LM, Werb Z. 2002.** Inflammation and cancer. *Nature* **420**: 860-867.
- **Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. 1999.** A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* **5**: 280-285.
- **Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Cato AC, Hittmair A, Radmayr C, Eberle J, Bartsch G, Klocker H. 1993.** Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol* **7**: 1541-1550.
- **Dacie JV, Lewis. 1975.** Preparation and staining methods for blood and bone marrow. *Practical Haematology* (5^a edição), New York, Churchill Livingstone. pp. 68-83.
- **Davis CD, Milner JA. 2011.** Vitamin D and colon cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **5**: 67-81.
- **Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. 1997.** **Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.** *Biochem J.* **324**:1-18.
- **Debes JD, Tindall DJ. 2004.** Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N Engl J Med* **351**: 1488-1490.

- **De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. 1999.** Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* **155**: 1985-1992.
- **Denis LJ, Griffiths K. 2000.** Endocrine treatment in prostate cancer. *Semin Surg Oncol* **18**: 52-74.
- **Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD. 1994.** Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov Disord* **9**:92-7.
- **Donkena KV, Young CY, Tindall DJ. 2010.** Oxidative stress and DNA methylation in prostate cancer. *Obstet Gynecol Int* **2010**: 302051.
- **Donohue JF. 2006.** Ageing, smoking and oxidative stress. *Thorax* **61**: 461-462.
- **Downing SR, Russell PJ, Jackson P. 2003.** Alterations of p53 are common in early stage prostate cancer. *Can J Urol* **10**: 1924-1933.
- **Draper HH, Hadley, M. 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **186**: 421-431.
- **Drivalos A, Papatsoris AG, Chrisofos M, Efstathiou E, Dimopoulos MA. 2011.** The role of the cell adhesion molecules (integrins/cadherins) in prostate cancer. *Int Braz J Urol* **37**: 302-306.
- **Dröge W, Schipper HM. 2007.** Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* **6**: 361-370.
- **Dupont I, Bodenez P, Berthou F, et al. 2000.** Cytochrome P-450 2E1 activity and oxidative stress in alcoholic patients. *Alcohol Alcohol.***35**:98-103.
- **Durackova Z. 2010.** Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* **59**: 459-469.
- **Duray A, Demoulin S, Hubert P, Delvenne P, Saussez S. 2010.** Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clin Dev Immunol* **2010**: 701657.
- **Ebbert J, Yang P, Vachon C, Vierkant R, Cerhan J, Folsom A, Sellers T. 2003.** Lung cancer risk reduction after smoking cessation: Observations from a prospective cohort of women. *Journal of Clinical Oncology*, **21** (5): 921-926.
- **Edwards SM, Badzioch MD, Minter R, Hamoudi R, Collins N, Ardern-Jones A, Dowe A, Osborne S, Kelly J, Shearer R, Easton DF, Saunders GF, Dearnaley DP,**

- Eeles RA. 1999.** Androgen receptor polymorphisms: association with prostate cancer risk, relapse and overall survival. *Int J Cancer* **84**: 458-465.
- **Eheman C, Henley SJ, Ballard-Barbash R, Jacobs EJ, Schymura MJ, Noone AM, Pan L, Anderson RN, Fulton JE, Kohler BA, Jemal A, Ward E, Plescia M, Ries LA, Edwards BK. 2012.** Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2008, featuring cancers associated with excess weight and lack of sufficient physical activity. *Cancer* **118**: 2338-2366.
 - **El Shourbagy SH, Spikings EC, Freitas M, St John JC. 2006.** Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction* **131(2)**: 233-245.
 - **Enokida H, Shiina H, Urakami S, Terashima M, Ogishima T, Li LC, Kawahara M, Nakagawa M, Kane CJ, Carroll PR, Igawa M, Dahiya R. 2006.** Smoking influences aberrant CpG hypermethylation of multiple genes in human prostate carcinoma. *Cancer* **106**: 79-86.
 - **Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. 2011.** Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *J Mol Sci.* **12(5)**: 3117-3132.
 - **Ferrara N, Gerber HP. 2001.** The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* **106**: 148–156.
 - **Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP, Kreutzer DL. 1998.** Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology* **51(1)**: 161-7.
 - **Ferrini RL, Barrett-Connor E. 1998.** Sex hormones and age: a cross-sectional study of testosterone and estradiol and their bioavailable fractions in community-dwelling men. *Am J Epidemiol* **147**: 750-754.
 - **Finkel T, Holbrook NJ. 2000.** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-247.
 - **Fleshner NE, Klotz LH. 1998.** Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility. *Cancer Metastasis Rev* **17**: 325-330.
 - **Flora SJ, Mittal M, Mehta A. 2008.** Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* **128**: 501-523.

- **Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. 1990.** Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4533-4537.
- **Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. 2007.** Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* **128**: 92-105.
- **Freedland SJ, Banez LL, Sun LL, Fitzsimons NJ, Moul JW. 2009.** Obese men have higher-grade and larger tumors: an analysis of the duke prostate center database. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **12**: 259-263.
- **Freeman BA, Crapo JD. 1986 .** Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest* **47**:412-426.
- **Freitas M, Alves V, Sarmento-Ribeiro AB, Mota-Pinto A. 2011.** Combined effect of sodium selenite and docetaxel on PC3 metastatic prostate cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **408**: 713-719.
- **Freitas M, Baldeiras I, proença T, Alves V, Mota-Pinto A, Sarmento-Ribeiro A. 2012.** Oxidative stress adaptation in aggressive prostate cancer may be counteracted by the reduction of glutathione reductase. *FEBS Open Bio* **2**:119–128 (b).
- **Freitas M, Baldeiras I, Proença T, Pascoal R, Valido F, Rabaça C, Mota-Pinto A, Sarmento-Ribeiro AB. 2007.** Cigarette smoking increases oxidative stress in prostate cancer patients: A preliminary study. *Free Radical Research*. **41**. Suppl 1(S28): P52.
- **Freitas M, Sarmento-Ribeiro A, Mota-Pinto A. 2012** An overview of docetaxel applications and effects. In *Horizons in Cancer Research Volume 50* (HS. Watanabe eds). Nova Science Publishers (a).
- **Friedenreich CM, Orenstein MR. 2002.** Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr* **132**: 3456S-3464S.
- **Fujihara M, Nagai N, Sussan TE, Biswal S, Handa JT. 2008.** Chronic cigarette smoke causes oxidative damage and apoptosis to retinal pigmented epithelial cells in mice. *PLoS One* **3**: e3119.
- **Fujii H. 1995.** (Measurement of glutathione). *Nihon Rinsho* **53 Su Pt 2**: 215-217.

- **Fujii J, Ito JI, Zhang X, Kurahashi T. 2011.** Unveiling the roles of the glutathione redox system in vivo by analyzing genetically modified mice. *J Clin Biochem Nutr* **49**: 70-78.
- **Fukuda H, Tsuchiya N, Narita S, Kumazawa T, Horikawa Y, Inoue T, Saito M, Yuasa T, Matsuura S, Satoh S, Ogawa O, Habuchi T. 2007.** Clinical implication of vascular endothelial growth factor T-460C polymorphism in the risk and progression of prostate cancer. *Oncol Rep* **18(5)**: 1155-1163.
- **Gann PH, Hennekens CH, Sacks FM, Grodstein F, Giovannucci EL, Stampfer MJ. 1994.** Prospective study of plasma fatty acids and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **86**: 281-286.
- **Garcia-Bailo B, El-Sohehy A, Haddad PS, Arora P, Benzaied F, Karmali M, Badawi A. 2011.** Vitamins D, C, and E in the prevention of type 2 diabetes mellitus: modulation of inflammation and oxidative stress. *Biologics* **5**: 7-19.
- **Gelmann EP. 2002.** Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* **20**: 3001-3015.
- **Gerhäuser C. 2012.** Cancer cell metabolism, epigenetics and the potential influence of dietary components – A perspective; *Biomedical Research Special Issue: Cancer Metabolism* **23 (1)**:1-21.
- **Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Colditz GA, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. 1999.** Smoking and risk of total and fatal prostate cancer in United States health professionals. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**: 277-282.
- **Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, Willett WC. 1993.** A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **85**: 1571-1579.
- **Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. 1997.** Height, body weight, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**: 557-563.
- **Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PW. 1997.** The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3320-3323.
- **Gleason D. 1966.** Classification of prostate carcinomas. *Cancer Chemother Rep* **50**:125-128,

- **Gleason DF. 1992.** Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* **23**: 273-279.
- **Gleason DF, Mellinger GT. 1974.** Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* **111**: 58-64.
- **Goldberg DM, Spooner RJ, 1983.** Glutathione reductase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J GraBl M. (ed). *Methods of enzymatic analysis* (3ª edição) vol. 111. Verlag Chemie, Weinheim, pp 258-265.
- **Gonçalves AC. 2010.** Avaliação do stresse oxidativo na Síndrome Mielodisplásica – Papel da mitocôndria e dos agentes antioxidantes. Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado
- **Gonçalves C, Bairos A. 2007.** *Histologia Texto e Imagens - Histologia Histogénese Organogénese*. 2ª Ed. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- **Gong Z, Agalliu I, Lin DW, Stanford JL, Kristal AR. 2008.** Cigarette smoking and prostate cancer-specific mortality following diagnosis in middle-aged men. *Cancer Causes Control* **19**: 25-31.
- **Gordon GM, Du W. 2011.** Conserved RB functions in development and tumor suppression. *Protein Cell* **2**: 864-878.
- **Goto M. 2008.** Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory? *Biosci Trends* **2**: 218-230.
- **Graham W, Burton, Webb A, Ingold KU. 1985.** A mild, rapid, and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids*. **20**:29-39.
- **Grek CL, Tew KD. 2010.** Redox metabolism and malignancy. *Curr Opin Pharmacol* **10**: 362-368.
- **Gsur A, Haidinger G, Hinteregger S, Bernhofer G, Schatzl G, Madersbacher S, Marberger M, Vutuc C, Micksche M. 2001.** Polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTP1, GSTM1 and GSTT1) and prostate-cancer risk. *Int J Cancer* **95**: 152-155.
- **Guan L, Jiang Q, Li Z, Huang F, Ren Y, Yang Y, Xu C. 2009.** The subcellular distribution of MnSOD alters during sodium selenite-induced apoptosis. *BMB Rep* **42**: 361-366.

- **Gutteridge JMC, Halliwell B, 1990.** The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBBS* **15**: 129-135.
- **Haenszel W, Kurihara M. 1968.** Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* **40**: 43-68.
- **Halliwell B, 1987.** Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB Journal*. 1: 358-364.
- **Halliwell B. 1985.** Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 59:1609-1623.
- **Haimovitz-Friedman A. 1998.** Radiation-induced signal transduction and stress response. *Radiat Res* **150**: 102-108.
- **Haque M, Francis J, Sehgal I. 2005.** Aryl hydrocarbon exposure induces expression of MMP-9 in human prostate cancer cell lines. *Cancer Lett* **225**: 159-166.
- **Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. 1997.** Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* **18**: 641-644.
- **Hecht SS. 1999.** Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**: 1194-1210.
- **Hecht SS. 2006.** Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Langenbecks Arch Surg* **391**: 603-613.
- **Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Gaddipati JP, Weghorst CM, Buzard GS, Moul JW, Srivastava S. 1995.** Alteration of the tumor suppressor gene p53 in a high fraction of hormone refractory prostate cancer. *J Urol* **154**: 414-421.
- **Heinlein CA, Chang C. 2004.** Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* **25**: 276-308.
- **Hickey K, Do KA, Green A. 2001.** Smoking and prostate cancer. *Epidemiol Rev* **23**: 115-125.
- **Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. 2001.** The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol* **14**: 767-790.
- **Hori S, Blanchet JS, McLoughlin J. 2012.** From prostate-specific antigen (PSA) to precursor PSA (proPSA) isoforms: a review of the emerging role of proPSAs in the

detection and management of early prostate cancer. *BJU Int* doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11329.x.

- **Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. 1998 .** VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* **274(3 Pt 2)**: 1054-1058.
- **Hsing AW, Gao YT, Wu G, Wang X, Deng J, Chen YL, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Benichou J, Chang C. 2000.** Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. *Cancer Res* **60**: 5111-5116.
- **Hughes DA, Haslam PL, Townsend PJ, Turner-Warwick M. 1985.** Numerical and functional alterations in circulatory lymphocytes in cigarette smokers. *Clin Exp Immunol* **61**: 459-466.
- **Hursting SD, Berger NA. 2010.** Energy balance, host-related factors, and cancer progression. *J Clin Oncol* **28**: 4058-4065.
- **Husbeck B, Peehl DM, Knox SJ. 2005.** Redox modulation of human prostate carcinoma cells by selenite increases radiation-induced cell killing. *Free Radic Biol Med* **38**: 50-57.
- **Iguchi T, Sugita S, Wang CY, Newman NB, Nakatani T, Haas GP. 2009.** MnSOD genotype and prostate cancer risk as a function of NAT genotype and smoking status. *In Vivo* **23**: 7-12.
- **Israel M, Schwartz L. 2011.** The metabolic advantage of tumor cells. *Mol Cancer* **10**: 70.
- **Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, Venitz J, Figg WD. 2009.** The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther* **8(9)**: 2496-2508.
- **Jennbacken K, Vallbo C, Wang W, Damber JE. 2005.** Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *Prostate* **65(2)**: 110-106.
- **Jones PA, Baylin SB. 2007.** The epigenomics of cancer. *Cell* **128**: 683-692.
- **Irvine RA, Ma H, Yu MC, Ross RK, Stallcup MR, Coetzee GA. 2000.** Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum Mol Genet* **9**: 267-274.

- **Isaacs JT, Isaacs WB. 2004.** Androgen receptor outwits prostate cancer drugs. *Nat Med* **10**: 26-27.
- **Jackson-Rosario SE, Self WT. 2010.** Targeting selenium metabolism and selenoproteins: novel avenues for drug discovery. *Metallomics* **2**: 112-116.
- **Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**: 69-90.
- **Jemal A, Center MM, Ward E, Thun MJ. 2009.** Cancer occurrence. *Methods Mol Biol* **471**: 3-29.
- **Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. 2010.** Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **60**: 277-300.
- **Jiang C, Wang Z, Ganther H, Lu J. 2002.** Distinct effects of methylseleninic acid versus selenite on apoptosis, cell cycle, and protein kinase pathways in DU145 human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* **1**: 1059-1066.
- **Jones DP. 2006.** Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **8**: 1865-1879.
- **Jones LE Jr, Ying L, Hofseth AB, Jelezcova E, Sobol RW, Ambs S, Harris CC, Espey MG, Hofseth LJ, Wyatt MD. 2009.** Differential effects of reactive nitrogen species on DNA base excision repair initiated by the alkyladenine DNA glycosylase. *Carcinogenesis* **12**: 2123-2129.
- **Jung K, Seidel B, Rudolph B, Lein M, Cronauer MV, Henke W, Hampel G, Schnorr D, Loening SA. 1997.** Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells. *Free Radic Biol Med* **23**: 127-133.
- **Kabler SL, Seidel A, Jacob J, Doehmer J, Morrow CS, Townsend AJ. 2009.** Differential protection by human glutathione S-transferase P1 against cytotoxicity of benzo[a]pyrene, dibenzo[a,l]pyrene, or their dihydrodiol metabolites, in bi-transgenic cell lines that coexpress rat versus human cytochrome P4501A1. *Chem Biol Interact* **15(179 (2-3))**: 240–246.
- **Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. 1979.** Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC3). *Invest Urol.* **17**: 16-23.
- **Kannappan R, Gupta SC, Kim JH, Aggarwal BB. 2012.** Tocotrienols fight cancer by targeting multiple cell signaling pathways. *Genes Nutr* **7**: 43-52.

- **Kanwar J, Taskeen M, Mohammad I, Huo C, Chan TH, Dou QP. 2012.** Recent advances on tea polyphenols. *Front Biosci (Elite Ed)* **4**: 111-131.
- **Kelada SN, Kardia SL, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB, Rebbeck TR. 2000.** The glutathione S-transferase-mu and -theta genotypes in the etiology of prostate cancer: genotype-environment interactions with smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**: 1329-1334.
- **Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. 2009.** Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett* **282**: 125-136.
- **Kilic M, Kasperczyk H, Fulda S, Debatin K-M. 2007.** Role of hypoxia inducible factor-1 alfa in modulation of apoptosis resistance. *Oncogene* **26**: 2027-2038.
- **Kizaka-Kondoh S, Kuchimaru T, Kadonosono T. 2011.** Pathophysiological response to hypoxia - from the molecular mechanisms of malady to drug discovery: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)-active cells as a target for cancer therapy. *J Pharmacol Sci* **115**: 440-445.
- **Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. 2010.** Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* **38**: 96-109.
- **Knight JA, Pieper RK, McClellan L. 1998.** Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem.* **34**: 2433-2438.
- **Kobayashi J, Kizo R, Sugiyama H. 2005.** Influences of polyaromatic hydrocarbons and heavy metals on a thyroid carcinoma cell line. *Journal of Health Science.* **51**: 202-206.
- **Koedrith P, Seo YR. 2011.** Advances in carcinogenic metal toxicity and potential molecular markers. *Int J Mol Sci* **12**: 9576-9595.
- **Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, Trapman J, Cleutjens K, Noordzij A, Visakorpi T, Kallioniemi OP. 1997.** Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res* **57**: 314-319.
- **Komiya Y, Tsukino H, Nakao H, Kuroda Y, Imai H, Katoh T. 2005.** Human glutathione S-transferase A1, T1, M1, and P1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. *J Cancer Res Clin Oncol* **131**: 238-242.

- **Kooiman GG, Martin FL, Williams JA, Grover PL, Phillips DH, Muir GH. 2000.** The influence of dietary and environmental factors on prostate cancer risk. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **3**: 256-258.
- **Koochekpour S. 2010.** Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*. 12: 639–657.
- **Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM. 2002.** Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419(6904)**: 316-321.
- **Krstev S, Baris D, Stewart P, Dosemeci M, Swanson GM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Schwartz AG, Liff JM, Hayes RB. 1998.** Occupational risk factors and prostate cancer in U.S. blacks and whites. *Am J Ind Med* **34**: 421-430.
- **Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK. 2008.** Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res*. **68(6)**: 1777-1785.
- **Kumar A, Kim CS, Hoffman TA, Naqvi A, Dericco J, Jung SB, Lin Z, Jain MK, Irani K. 2011.** p53 impairs endothelial function by transcriptionally repressing Kruppel-Like Factor 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**: 133-141.
- **Langsenlehner T, Langsenlehner U, Renner W, Krippel P, Mayer R, Wascher TC, Kapp KS. 2008.** Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the gene for vascular endothelial growth factor and risk of prostate cancer. *Eur J Cancer* **44(11)**: 1572-1576.
- **Larumbe R. 1999.** Estrés oxidativo y enfermedad de Parkinson oxidative stress and Parkinson's disease *Anales del sistema sanitario de Navarra*.
- **Ledesma MC, Jung-Hynes B, Schmit TL, Kumar R, Mukhtar H, Ahmad N. 2011.** Selenium and vitamin E for prostate cancer: post-SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) status. *Mol Med* **17**: 134-143.
- **Li R, Younes M, Wheeler TM, Scardino P, Ohori M, Frolov A, Ayala G. 2004.** Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in human prostate. *Prostate* **58**: 193-199.
- **Lijinsky W, Shubik P. 1964.** Benzo(a)Pyrene and Other Polynuclear Hydrocarbons in Charcoal-Broiled Meat. *Science* **145**: 53-55.

- **Lim HW, Hong S, Jin W, Lim S, Kim SJ, Kang HJ, Park EH, Ahn K, Lim CJ. 2005.** Up-regulation of defense enzymes is responsible for low reactive oxygen species in malignant prostate cancer cells. *Exp Mol Med* **37(5)**: 497-506.
- **Lin CS, Wang LS, Chou TY, Hsu WH, Lin HC, Lee SY, Lee MH, Chang SC, Wei YH. 2012.** Cigarette Smoking and hOGG1 Ser326Cys Polymorphism are Associated with 8-OHdG Accumulation on Mitochondrial DNA in Thoracic Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol* PMID:22941157.
- **Lin X, Tascilar M, Lee WH, Vles WJ, Lee BH, Veeraswamy R, Asgari K, Freije D, van Rees B, Gage WR, Bova GS, Isaacs WB, Brooks JD, DeWeese TL, De Marzo AM, Nelson WG. 2001.** GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol* **159**: 1815-1826.
- **Lipinski B. 2011.** Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev* **2011**: 809696.
- **Lodovici M, Bigagli E. 2009.** Biomarkers of induced active and passive smoking damage. *Int J Environ Res Public Health* **6**: 874-888.
- **Longo VD, Fontana L. 2010.** Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* **31(2)**: 89-98.
- **Lotufo PA, Lee IM, Ajani UA, Hennekens CH, Manson JE. 2000.** Cigarette smoking and risk of prostate cancer in the physicians' health study (United States). *Int J Cancer* **87**: 141-144.
- **Lyko F, Brown R. 2005.** DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J Natl Cancer Inst.* **19**:97(20):1498-506.
- **Magwere T, Burchill SA. 2011.** Heterogeneous role of the glutathione antioxidant system in modulating the response of ESFT to fenretinide in normoxia and hypoxia. *PLoS One* **6**: e28558.
- **Makarovskiy AN, Siryaporn E, Hixson DC, Akerley W. 2002.** Survival of docetaxel-resistant prostate cancer cells in vitro depends on phenotype alterations and continuity of drug exposure. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1198-1211.
- **Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. 2012.** European cancer mortality predictions for the year 2012. *Ann Oncol* **23**: 1044-1052.

- **Mao GE, Morris G, Lu QY, Cao W, Reuter VE, Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Scher HI, deKernion JB, Zhang ZF. 2004.** Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism, cigarette smoking and prostate cancer. *Cancer Detect Prev* **28**: 368-374.
- **Marks RA, Zhang S, Montironi R, McCarthy RP, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Jiang Z, Zhou H, Zheng S, Davidson DD, Baldrige LA, Cheng L. 2008.** Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in prostatic adenocarcinoma after hormonal therapy: a fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Prostate* **68**: 919-923.
- **Marques RB, Dit NF, Erkens-Schulze S, van Weerden WM, Jenster G. 2010.** Bypass mechanisms of the androgen receptor pathway in therapyresistant prostate cancer cell models. *PLoS One* **19(5(10))**: doi: 10.1371/journal.pone.0013500.
- **Marsit CJ, Kim DH, Liu M, Hinds PW, Wiencke JK, Nelson HH, Kelsey KT. 2005.** Hypermethylation of RASSF1A and BLU tumor suppressor genes in non-small cell lung cancer: implications for tobacco smoking during adolescence. *Int J Cancer* **114**: 219-223.
- **Martin SK, Vaughan TB, Atkinson T, Zhu H, Kyprianou N. 2012.** Emerging biomarkers of prostate cancer (Review). *Oncol Rep* **28(2)**: 409-17.
- **McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, Southgate C, Easton DF, Eeles RA, Howell WM. 2002.** Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* **62(12)**: 3369-3372.
- **McNeal JE. 1969.** Origin and development of carcinoma in the prostate. *Cancer* **23**: 24-34.
- **McNeal JE. 2003.** (Origin and development of carcinoma of the prostate). *Aktuelle Urol* **34**: 81-82.
- **Mehraein-Ghomi F, Lee E, Church DR, Thompson TA, Basu HS, Wilding G. 2008.** JunD mediates androgen-induced oxidative stress in androgen dependent LNCaP human prostate cancer cells. *Prostate* **68**: 924-934.
- **Meiers I, Shanks JH, Bostwick DG. 2007.** Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. *Pathology* **39**: 299-304.
- **Menter DG, Sabichi AL, Lippman SM. 2000.** Selenium effects on prostate cell growth. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**: 1171-1182.

- **Milne DB, Botnen J. 1986.** Retinol, alpha-tocopherol, lycopene, and alpha- and beta-carotene simultaneously determined in plasma by isocratic liquid chromatography. *Clin Chem* **32**: 874-876.
- **Mishina T, Watanabe H, Araki H, Nakao M. 1985.** Epidemiological study of prostatic cancer by matched-pair analysis. *Prostate* **6**: 423-446.
- **Miyake H, Hara I, Gleave ME, Eto H. 2004.** Protection of androgen-dependent human prostate cancer cells from oxidative stress-induced DNA damage by overexpression of clusterin and its modulation by androgen. *Prostate* **61**: 318-323.
- **Moley, KH, Mueckler MM. 2000.** Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis* **5**: 99–105.
- **Mota-Pinto A. 2007.** Fisiopatologia, fundamentos e aplicações. Lidel- Edições técnicas, lda, 2007.
- **Muders MH, Zhang H, Wang E, Tindall DJ, Datta K. 2009.** Vascular endothelial growth factor-C protects prostate cancer cells from oxidative stress by the activation of mammalian target of rapamycin complex-2 and AKT-1. *Cancer Res* **69(15)**: 6042-6048.
- **Nadiminty N, Gao AC. 2008.** Mechanisms of selenium chemoprevention and therapy in prostate cancer. *Mol Nutr Food Res* **52**: 1247-1260.
- **Nebert DW, Vasiliou V. 2004.** Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum Genomics* **1**: 460-464.
- **Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. 2003.** Prostate cancer. *N Engl J Med* **349**: 366-381.
- **Nelson CP, Kidd LC, Sauvageot J, Isaacs WB, De Marzo AM, Groopman JD, Nelson WG, Kensler TW. 2001.** Protection against 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine cytotoxicity and DNA adduct formation in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Cancer Res* **61**: 103-109.
- **Nichols JA, Katiyar SK. 2010.** Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res* **302**: 71-83.
- **Nicholson B, Schaefer G, Theodorescu D. 2002.** Angiogenesis in prostate cancer: Biology and therapeutic opportunities. *Cancer Metastasis Rev* **20**: 297-319.
- **Nock NL, Liu X, Cicek MS, Li L, Macarie F, Rybicki BA, Plummer SJ, MacLennan GT, Casey G, Witte JS. 2006.** Polymorphisms in polycyclic aromatic hydrocarbon

metabolism and conjugation genes, interactions with smoking and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**: 756-761

- **Novo E, Parola M. 2008.** Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* **1**: 5.
- **Olovnikov IA, Kravchenko JE, Chumakov PM. 2009.** Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Semin Cancer Biol* **19**: 32-41.
- **Onen IH, Konac E, Eroglu M, Guneri C, Biri H, Ekmekci A. 2008.** No association between polymorphism in the vascular endothelial growth factor gene at position -460 and sporadic prostate cancer in the Turkish population. *Mol Biol Rep* **35(1)**:17-22.
- **Padidar S, Farquharson AJ, Williams LM, Kelaiditi E, Hoggard N, Arthur JR, Drew JE. 2011.** Leptin up-regulates pro-inflammatory cytokines in discrete cells within mouse colon. *J Cell Physiol* **226(8)** : 2123-2130.
- **Paglia DE, Valentine WN. 1967.** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* **70**: 158-169.
- **Palozza P, Colangelo M, Simone R, Catalano A, Boninsegna A, Lanza P, Monego G, Ranelletti FO. 2010.** Lycopene induces cell growth inhibition by altering mevalonate pathway and Ras signaling in cancer cell lines. *Carcinogenesis* **31**: 1813-1821.
- **Pande D, Negi R, Karki K, Dwivedi US, Khanna RS, Khanna HD. 2012.** Simultaneous progression of oxidative stress, angiogenesis, and cell proliferation in prostate carcinoma. *Urol Oncol* PMID: 22591747.
- **Park J, Euhus DM, Scherer PE. 2011.** Paracrine and Endocrine Effects of Adipose Tissue on Cancer Development and Progression. *Endocr Rev* **32**: 550-570.
- **Parsons JK, Nelson CP, Gage WR, Nelson WG, Kensler TW, De Marzo AM. 2001.** GSTA1 expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human prostate tissue. *Prostate* **49**: 30-37.
- **Pathak SK, Sharma RA, Mellon JK. 2003.** Chemoprevention of prostate cancer by diet-derived antioxidant agents and hormonal manipulation (Review). *Int J Oncol* **22**: 5-13.
- **Paule B. 2005.** Reappraisal of the concept of hormone therapy in metastatic prostate cancer and implications for treatment. *Eur Urol* **47**: 729-735.

- **Pelicano H, Carney D, Huang P. 2004.** ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* **7**: 97-110.
- **Pierorazio PM, Ross AE, Han M, Epstein JI, Partin AW, Schaeffer EM. 2012.** Evolution of the clinical presentation of men undergoing radical prostatectomy for high-risk prostate cancer. *BJU Int* **109**: 988-993.
- **Plaskon LA, Penson DF, Vaughan TL, Stanford JL. 2003.** Cigarette smoking and risk of prostate cancer in middle-aged men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**: 604-609.
- **Platz EA, Giovannucci E. 2006.** Prostate cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, eds. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 3rd ed. New York: Oxford University Press. 1151-1165.
- **Platz EA, Leitzmann MF, Rimm EB, Willett WC, Giovannucci E. 2004.** Alcohol Intake, Drinking Patterns, and Risk of Prostate Cancer in a Large Prospective Cohort Study. *Am J Epidemiol* **159(5)**: 444-453.
- **Plísková M, Vondráček J, Vojtesek B, Kozubík A Machala M. 2005.** Deregulation of cell proliferation by polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast carcinoma MCF-7 cells reflects both genotoxic and nongenotoxic events. *Toxicol Sci* **83(2)**: 246-256.
- **Poljsak B. 2011.** Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* **2011**: 194586.
- **Proença MM. 2002.** Marcadores periféricos de stresse oxidativo na doença de Parkinson: neurotoxicidade na L-Dopa. Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado
- **Putzi MJ, De Marzo AM. 2000.** Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* **56**: 828-832.
- **Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL. 2005.** Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer* **41**: 858-887.
- **Rabi T, Bishayee A. 2009.** d-Limonene sensitizes docetaxel-induced cytotoxicity in human prostate cancer cells: generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. *J Carcinog* **8(1)**: 1-9.
- **Rahman M, Miyamoto H, Chang C. 2004.** Androgen receptor coregulators in prostate cancer: mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res.* **10(7)**:2208-19.

- **Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahsan H, Mukhtar H, Ahmad N. 2008.** Combination of vitamin E and selenium causes an induction of apoptosis of human prostate cancer cells by enhancing Bax/Bcl-2 ratio. *Prostate* **68**: 1624-1634.
- **Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, de Sousa-Canavez JM, Dall'Oglio MF, Passerotti CC, Abe DK, Crippa A, da Cruz JA, Timoszczuk LM, Srougi M, Leite KR. 2011.** MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK underexpression is associated with prognosis in prostate cancer. *Int J Biol Markers* **26**: 255-261.
- **Resende-Oliveira C, Santos-Rosa M, Mota-Pinto A, Botelho A, Morais A, Teixeira-Veríssimo M. 2010.** Estudo do Perfil do Envelhecimento da População Portuguesa (EPEPP). ed. 1, ISBN: 978-989-8445-00-1. Lisboa: Alto Comissariado da Saúde - Ministério da Saúde.
- **Ridnour LA, Windhausen AN, Isenberg JS, Yeung N, Thomas DD, Vitek MP, Roberts DD, Wink DA. 2007.** Nitric oxide regulates matrix metal-loproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 16898-16903.
- **Rohrmann S, Genkinger JM, Burke A, Helzlsouer KJ, Comstock GW, Alberg AJ, Platz EA. 2007.** Smoking and risk of fatal prostate cancer in a prospective U.S. study. *Urology* **69**: 721-725.
- **Rocchi E, Casalgrandi G, Ronzoni A, Rosa MC, Marri L, Gozzi C. 2003.** Retinol and tocopherol content in primary and metastatic digestive neoplasms. *Anticancer Res* **23(6D)**: 5049-5054.
- **Rothe G, Valet G. 1990.** Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2,7 dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol.* **47**: 440-448.
- **Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Russo GL. 2010.** Phytochemicals in cancer prevention and therapy: truth or dare? *Toxins (Basel)* **2**: 517-551.
- **Rybicki BA, Neslund-Dudas C, Nock NL, Schultz LR, Eklund L, Rosbolt J, Bock CH, Monaghan KG. 2006.** Prostate cancer risk from occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons interacting with the GSTP1 Ile105Val polymorphism. *Cancer Detect Prev* **30**: 412-422.
- **Sambade, C. 1999.** A morte celular por apoptose. In: “Biologia celular e molecular”. Azevedo, C. (Coord): pp. 461-479. LIDEL-Edições Técnicas, Lisboa (Ed).

- **Sadar MD, Gleave ME. 2000.** Ligand-independent activation of the androgen receptor by the differentiation agent butyrate in human prostate cancer cells. *Cancer Res* **60**: 5825-5831.
- **Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, Heilbrun LK, Cassin BJ, Pontes JJ, Haas GP. 1994.** High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* **8**: 439-443.
- **Sarir H, Mortaz E, Karimi K, Kraneveld AD, Rahman I, Caldenhoven E, Nijkamp FP, Folkerts G. 2009.** Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human macrophages. *J Inflamm (Lond)* **6**: 12.
- **Sarmiento-Ribeiro AB. 2000.** Alterações fenotípicas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia. Universidade de Coimbra. Dissertação de Doutorado.
- **Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. 2009.** Cellular signaling perturbation by natural products. *Cell Signal* **21**: 1541-1547.
- **Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JC, Aris JP, Leeuwenburgh C. 2010.** New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci* **123**: 2533-2542.
- **Sfar S, Hassen E, Saad H, Mosbah F, Chouchane L. 2006.** Association of VEGF genetic polymorphisms with prostate carcinoma risk and clinical outcome. *Cytokine* **35**: 21-28.
- **Sies H. 1985.** Oxidative Stress: Introductory remarks. In: *Oxidative Stress* (Sies H, eds), Academic Press, London. pp. 1-8.
- **Sies H. 1997.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 82(2), 291-295.
- **Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. 1991.** Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* **63**: 963-966.
- **Siegel R, Naishadham D, Jemal A. 2012.** Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **62**: 10-29.

- **Sikka SC. 2003.** Role of oxidative stress response elements and antioxidants in prostate cancer pathobiology and chemoprevention--a mechanistic approach. *Curr Med Chem* **10**: 2679-2692.
- **Singh S, Pillai S, Chellappan S. 2011.** Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. *J Oncol* **2011**: 456743.
- **Spector A. 2000.** Review : Oxidative stress and disease. *Journal of ocular Pharmacology and therapeutics*. 16:193-201.
- **Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. 1990.** Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* **17**: 337-347.
- **Sterling KM, Jr., Cutroneo KR. 2004.** Constitutive and inducible expression of cytochromes P4501A (CYP1A1 and CYP1A2) in normal prostate and prostate cancer cells. *J Cell Biochem* **91**: 423-429.
- **St John JC, Amaral A, Bowles E, Oliveira JF, Lloyd R, Freitas M, Gray HL, Navara CS, Oliveira G, Schatten GP, Spikings E, Ramalho-Santos J. 2006.** The analysis of mitochondria and mitochondrial DNA in human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* **331**: 347-74.
- **Sun XY, Donald SP, Phang JM. 2001.** Testosterone and prostate specific antigen stimulate generation of reactive oxygen species in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. **22(11)**:1775-1780.
- **Szeto HH. 2006.** Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents. *AAPS J* **8**: E521-531.
- **Tachibana H. 2011.** Green tea polyphenol sensing. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **87**: 66-80.
- **Taioli E. 2008.** Gene-environment interaction in tobacco-related cancers. *Carcinogenesis* **29**: 1467-1474.
- **Tan D, Goerlitz DS, Dumitrescu RG, Han D, Seillier-Moiseiwitsch F, Spernak SM, Orden RA, Chen J, Goldman R, Shields PG. 2008.** Associations between cigarette smoking and mitochondrial DNA abnormalities in buccal cells. *Carcinogenesis* **29**: 1170-1177.
- **Tan KS, McFarlane LC, Lipworth BJ. 1997.** Effect of exogenous female sex-steroid hormones on beta 2-adrenoceptors in healthy males. *Eur J Clin Pharmacol* **52**: 281-283.

- **Tanno T, Matsui W. 2011.** Development and maintenance of cancer stem cells under chronic inflammation. *J Nihon Med Sch* **78**: 138-145.
- **Toyokuni S. 1999.** Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* **49**: 91-102.
- **Traynor P, McGlynn LM, Mukherjee R, Grimsley SJ, Bartlett JM, Edwards J. 2008.** An increase in N-Ras expression is associated with development of hormone refractory prostate cancer in a subset of patients. *Dis Markers* **24**: 157-165.
- **Trzeciak AR, Nyaga SG, Jaruga P, Lohani A, Dizdaroglu M, Evans MK. 2004.** Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145. *Carcinogenesis* **25**: 1359-1370.
- **Valastyan S, Weinberg RA. 2011.** Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**: 275-292.
- **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 44-84.
- **van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, Isner JM. 1997.** Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* **95(4)**: 1030-1037.
- **van Eeden SF, Hogg JC. 2000.** The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *Eur Respir J* **15**: 915-921.
- **van Kruijsdijk RC, van der Wall E, Visseren FL. 2009.** Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**: 2569-2578.
- **van Poppel H, Tombal B. 2011.** Chemoprevention of prostate cancer with nutrients and supplements. *Cancer Manag Res* **3**: 91-100.
- **van Roermund JG, Hinnen KA, Tolman CJ, Bol GH, Witjes JA, Bosch JL, Kiemeneij LA, van Vulpen M. 2011.** Periprostatic fat correlates with tumour aggressiveness in prostate cancer patients. *BJU Int* **107**: 1775-1779.
- **Vatassery GT, maynard UR, Hagen DF. 1978.** High performance liquid chromatography of various tocopherols. *J Chromatog.* 161:299-302.

- **Vingaard AM, Hnida C Larsen JC. 2000.** Environ-mental polycyclic hydrocarbons affect androgen recep-tor activation in vitro. *Toxicol* **145**: 173-183.
- **Wadelius M, Autrup JL, Stubbins MJ, Andersson SO, Johansson JE, Wadelius C, Wolf CR, Autrup H, Rane A. 1999.** Polymorphisms in NAT2, CYP2D6, CYP2C19 and GSTP1 and their association with prostate cancer. *Pharmacogenetics* **9**: 333-340.
- **Walsh PC. 2012.** How Charles Huggins made his nobel prize winning discovery-in his own words: An historic audio recording. *Prostate*.
- **Wang CY, Debiec-Rychter M, Schut HA, Morse P, Jones RF, Archer C, King CM, Haas GP. 1999.** N-Acetyltransferase expression and DNA binding of N-hydroxyheterocyclic amines in human prostate epithelium. *Carcinogenesis* **20**: 1591-1595.
- **Waris G, Ahsan H. 2006.** Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* **5**: 14.
- **Weijerman PC, König JJ, Wong ST, Niesters HG, Peehl DM. 1994.** Lipofection-mediated immortalization of human prostatic epithelial cells of normal and malignant origin using human papillomavirus type 18 DNA. *Cancer Res.* **54**: 5579-5583.
- **Wendel A. 1981.** Glutathione peroxidase. *Meth in Enzimol.* **77**: 2699-2704.
- **Wharton DC, Tzagoloff A. 1967.** Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol* .**10**: 245–250.
- **Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, Howe GR, West DW, Teh CZ, Stamey T. 1995.** Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am J Epidemiol* **141**: 732-740.
- **WHO. 1995.** Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series* **854**. Geneva: World Health Organization.
- **Willis MS, Wians FH. 2003.** The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. *Clin Chim Acta* **330**: 57-83.
- **Wilson SS, Crawford ED. 2006.** Controversies of androgen ablation therapy for metastatic prostate cancer. *Curr Pharm Des* **12**: 799-805.

- **Wiseman H. 1993.** Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett* **326**: 285-288.
- **Woodson K, Tangrea JA, Lehman TA, Modali R, Taylor KM, Snyder K, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. 2003.** Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, alpha-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study (Finland). *Cancer Causes Control* **14**: 513-518.
- **Wright SC, Zhong J, Zheng H, Larrick JW. 1993.** Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion. *FASEB J* **7**: 1045-1051.
- **Xiang N, Zhao R, Zhong W. 2009.** Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **63**: 351-362.
- **Yanagawa T, Ishikawa T, Ishii T, Tabuchi K, Iwasa S, Bannai S, Omura K, Suzuki H, Yoshida H. 1999.** Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. *Cancer Lett* **145**: 127-132.
- **Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. 2007.** Systemic effects of smoking. *Chest* **131**: 1557-1566.
- **Yoo J, Park S-S, Lee YJ. 2008.** Pretreatment of docetaxel enhances TRAIL mediated apoptosis in prostate cancer cells. *J Cell Biochem* **104**: 1636-1646.
- **Zadak Z, Hyspler R, Ticha A, Hronek M, Fikrova P, Rathouska J, Hrnčiarikova D, Stetina R. 2009.** Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol Res* **58 Suppl 1**: S13-17.
- **Zaman Z, Fielden P, Frost PG. 1993.** Simultaneous Determination of Vitamins A and E and Carotenoids in Plasma by Reversed-Phase HPLC in Elderly and Younger Subjects. *Clin Chem.* **39**: 2229-2234.
- **Zeng Y, Opeskin K, Baldwin ME, Horvath LG, Achen MG, Stacker SA, Sutherland RL, Williams ED. 2004.** Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 by lymphatic endothelial cells is associated with lymph node metastasis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **10(15)**: 5137-5144.

- **Zhu H, Santo A, Li Y. 2012.** The antioxidant enzyme peroxiredoxin and its protective role in neurological disorders. *Exp Biol Med (Maywood)* **237**: 143-149.
- **Zynger DL, Yang X. 2009.** High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia of the Prostate: The Precursor Lesion of Prostate Cancer. *Int J Clin Exp Pathol* **2(4)**: 327-338.