

**INSTITUTO METROPOLITANO DE ENSINO SUPERIOR
UNIÃO EDUCACIONAL DO VALE DO AÇO**

**Juliana Hosken Pires
Letícia Assis Cândido
Natália Trifiletti Crespo
Viviane Silva Rampinelli**

**DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTOPORFIRINA IX
ERITROCITÁRIA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE
INDIVÍDUOS COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

IPATINGA

2017

Juliana Hosken Pires
Letícia Assis Cândido
Natália Trifiletti Crespo
Viviane Silva Rampinelli

**DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTOPORFIRINA IX
ERITROCITÁRIA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE
INDIVÍDUOS COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto Metropolitano
de Ensino Superior – IMES/Univaço,
como requisito parcial à graduação no
curso de Medicina.

Prof. orientador: Daniel Riani Gotardelo

IPATINGA
2017

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTOPORFIRINA IX ERITROCITÁRIA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE INDIVÍDUOS COM CÂNCER DE PRÓSTATA

Juliana Hosken Pires¹, Letícia Assis Cândido¹, Natália Trifiletti Crespo¹, Viviane Silva Rampinelli¹ & Daniel Riani Gotardelo²

1 - Acadêmicas do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil.

2 - Coordenador e docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES – Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. Orientador do TCC.

RESUMO

O câncer de próstata é atualmente o segundo câncer com maior incidência entre homens no Brasil e no mundo. Muitos fatores de risco já estão estabelecidos, sendo alguns deles: idade, história familiar, raça, estilo de vida e hábitos alimentares. Os exames mais largamente utilizados para o rastreamento são o PSA total e o toque retal. Tem sido observado em indivíduos com este e outros tipos de câncer um metabolismo anormal da protoporfirina IX eritrocitária (PpIX), uma porfirina precursora do heme, fazendo com que os níveis dessa substância estejam elevados e possam ser quantificados.

Objetivos: O objetivo desse estudo foi quantificar e comparar as concentrações de PpIX em amostras biológicas (sangue) e avaliar o perfil sociodemográfico e clínico dos pacientes com câncer de próstata diagnosticados por biópsia, em comparação aos controles, representados por pacientes submetidos a exames de toque retal e PSA total com resultados negativos nos últimos 12 meses.

Métodos: Foi realizado um estudo do tipo caso-controle com uma amostra de 54 indivíduos, sendo 27 pacientes portadores de câncer e 27 indivíduos sem a doença. Foi analisada a concentração de PpIX em sangue dos pacientes, além da aplicação de um questionário que abordou as variáveis: idade, estado civil, história familiar de câncer de próstata, presença de diabetes, grau de etilismo ou tabagismo e doença prostática. **Resultados:** Em relação às variáveis do questionário, foi demonstrada homogeneidade entre os dois grupos. A respeito da dosagem de PpIX, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos por meio das amostras sanguíneas.

Conclusão: O câncer de próstata representa um grande desafio, suscitando controvérsia em relação ao rastreamento e aos marcadores de prognóstico. Não houve diferença significativamente estatística em relação às variáveis clínicas, sociodemográficas e a respeito da dosagem de PpIX, nos grupos caso e controle, contrariando dados observados em modelos experimentais de câncer prostático. Com isto, sugere-se a realização de novas pesquisas, visando um melhor entendimento dos processos fisiopatológicos que possam contribuir para o desenvolvimento de melhores métodos diagnósticos e marcadores prognósticos.

Palavras-chave: Câncer. Próstata. Protoporfirina IX.

Introdução

Desconsiderando-se os tumores de pele, o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens no Brasil e no mundo. Em 2012, a última estimativa considerou 1,1 milhão de casos novos no mundo. No Brasil, as estimativas para o ano de 2016 eram de 61.200 novos casos e número de óbitos seriam de 13.772 e, nos Estados Unidos, acredita-se que esse tipo de câncer seja diagnosticado em 161.360 homens e que venha levar ao óbito 26.730 pessoas no ano de 2017. O aumento observado nas taxas de incidência no Brasil pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017; INCA, 2016).

A idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata, sendo que a etnia e a história familiar também podem contribuir para o aparecimento da enfermidade. Obesidade e dietas com base em gordura animal, carne vermelha, embutidos e cálcio têm sido associadas ao aumento do risco de desenvolver essa neoplasia. Por outro lado, acredita-se que dietas à base de frutas e vegetais, ricas em fitoquímicos e antioxidantes, poderiam interferir no desenvolvimento desse tipo de tumor por reduzirem potencialmente o dano genômico causado por espécies reativas de oxigênio e pelo aumento de enzimas antioxidantes. A ingestão de carotenoides, vitaminas C e E, polifenóis existentes em cafés e chás, flavonoides e licopenos também têm sido estudados com resultados variáveis - ora positivos, ora negativos, ora sem associação com o risco de desenvolvimento do tumor (VANCE et al., 2013; INCA, 2016). Algumas investigações têm avaliado relações entre alguns microelementos e esse tipo de câncer, sendo que o zinco e o selênio são os mais estudados (STRATTON; GODWIN, 2011).

Os exames mais largamente utilizados para o rastreamento dessa enfermidade são o PSA total (antígeno prostático específico) e o toque retal. O PSA é um marcador também utilizado para diagnóstico precoce, avaliação da resposta à terapia e determinação de progressão tumoral, sendo um exame próstata-específico, mas não doença-específico, possuindo várias limitações, tais como: baixa sensibilidade para detecção de tumores em estágios precoces; possibilidade de resultados falso-positivos relacionados à medicamentos, inflamações (hiperplasia

benigna da próstata e prostatites), idade, trauma e manipulação urológica, dentre outros; controvérsia relacionada aos níveis do marcador que deveriam indicar uma biópsia ou revelar a presença de metástases; dentre outros (SBU, 2016).

O valor normal de PSA total é de até 4 ng/mL. No entanto, em virtude da baixa sensibilidade desse método para diagnosticar uma neoplasia prostática, novos parâmetros foram criados para tornar o teste mais fidedigno, sobretudo em valores entre 4 e 10 ng/mL, tais como a velocidade do PSA acima de 0,75 ng/mL/ano; ajuste do PSA à idade, levando em consideração o crescimento da glândula com o passar dos anos; a relação PSA/volume prostático definido pelo US transretal (valores acima de 0,15 seriam sugestivos de neoplasia) e a relação entre PSA livre/PSA total (indicação de biópsia se for < 25%) (SBU, 2016).

Estudos experimentais e clínicos utilizando outros métodos diagnósticos continuam sendo conduzidos para quantificar substâncias capazes de identificar a presença de vários tipos de tumores, inclusive o de próstata. Essas novas técnicas são de interesse também para avaliação desses tipos de lesões e incluem substâncias autofluorescentes por serem ferramentas não invasivas e não destrutivas identificadas em estudos de espectroscopia por fluorescência devido à sensibilidade dessas técnicas em captar a fluorescência emitida por fluoróforos endógenos, capaz de diferenciar as variações teciduais. Vários fluoróforos já foram quantificados em células e tecidos, mas há um limitado número de trabalhos que abordaram a possibilidade de dosar esses componentes para o diagnóstico de câncer em material biológico de seres humanos. Dentre os fluoróforos conhecidos, citam-se lisina, prolina, VPKA, colágeno, elastina, triptofano, tirosina, fenilalanina, derivados da piridoxina e porfirinas (KALAIVANI et al., 2008; BIBLIOTECA VIRTUAL DA FAPESP, 2014).

O metabolismo anormal da protoporfirina IX eritrocitária (PpIX), uma porfirina precursora do heme, tem sido observada em indivíduos com câncer, fazendo com que os níveis dessa substância estejam elevados e possam ser quantificados por fluorescência em tecidos e líquidos biológicos humanos e de cobaias inoculadas com células neoplásicas. A determinação dos níveis dessa substância foi utilizada para investigar o câncer de mama e intestinal em humanos e o câncer de próstata em modelos animais (KALAIVANI et al., 2008; JIA; WAN, 2009; SILVA et al., 2010, 2013).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e determinar, em seres

humanos, os níveis de PpIX em amostras biológicas de pacientes com câncer de próstata diagnosticados por biópsia no Centro de Oncologia e Radioisótopos, pertencente ao Hospital Márcio Cunha/Fundação São Francisco Xavier - Ipatinga/MG, e dos pacientes que se submeteram a exames de toque retal e PSA total com resultados negativos nos últimos 12 (doze) meses, a fim de se traçar uma correlação entre os níveis das substâncias analisadas, com variáveis clínicas (estadiamento, níveis de PSA ao diagnóstico, história familiar, tabagismo, etilismo, entre outros) e sociodemográficas (idade, profissão, escolaridade e estado civil) e a presença da enfermidade.

Métodos

Trata-se de pesquisa do tipo caso-controle, descritiva e transversal realizada entre os meses de fevereiro a novembro de 2015, na Policlínica Municipal e no Centro de Oncologia e Radioisótopos (COR), ambos localizados na cidade de Ipatinga, no estado de Minas Gerais.

Participaram dessa pesquisa 54 indivíduos, do sexo masculino, sendo 27 indivíduos no grupo de caso e 27 indivíduos no grupo de controle. A amostra inicial era de 60 pessoas, tendo 10% de abstenção no dia da coleta.

O recrutamento dos indivíduos foi realizado de forma a se obter um adequado pareamento, levando em consideração atributos como a idade, a etnia, o grau de escolaridade, a condição socioeconômica e outras variáveis pertinentes entre os grupos estudados.

Como casos, foram recrutados pacientes com câncer de próstata diagnosticados por biópsia no Centro de Oncologia e Radioisótopos (COR), pertencente ao Hospital Márcio Cunha/Fundação São Francisco Xavier. Como controles, foram recrutados indivíduos saudáveis, submetidos a exames de toque retal e PSA total, que são os métodos de rastreamento mais utilizados, com resultados negativos nos últimos 12 (doze) meses antecedentes à seleção, recrutados nos ambulatórios da Policlínica Municipal.

Dados sociodemográficos e bioquímicos foram obtidos por meio de prontuários e entrevistas realizadas com os indivíduos para preenchimento formulário de pesquisa, sendo que cada entrevista durava, em média, 30 minutos e

eram feitas por cinco pesquisadores previamente treinados, sendo um médico e quatro acadêmicas de medicina.

Neste estudo, a utilização de cálculo amostral para definição do número de participantes foi inviável, pois não existem estudos prévios em seres humanos para a avaliação proposta. Sendo assim, para definir o tamanho da população em estudos dessa natureza, utilizamos dados anteriores já aplicados em referências da literatura em que se abordou avaliação semelhante. O cálculo amostral obtido a partir dos trabalhos clínicos e experimentais existentes resultou em uma população muito pequena necessária para a pesquisa.

Como este trabalho é inovador em seres humanos com câncer de próstata, realizou-se o estudo com os parâmetros universalmente aceitos pela literatura para fins estatísticos, ou seja, 30 indivíduos em cada grupo. A amostra utilizada, também foi encontrada no trabalho de Moesta e colaboradores em pacientes com câncer colorretal em estágio precoce (MOESTA et al., 2001).

O estudo iniciou-se após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro Universitário do Leste de Minas Gerais, localizado na cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais, credenciado junto à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o número 784.592.

Os pacientes com câncer de próstata foram recrutados no Centro de Oncologia e Radioisótopos, pertencente ao Hospital Márcio Cunha/Fundação São Francisco Xavier, Ipatinga, MG. Sempre que possível, mas não necessariamente em todas às vezes, as amostras de sangue dos sujeitos de pesquisa com câncer foram obtidas na ocasião em que as mesmas foram colhidas por outras razões clínicas, indicadas pelo médico oncologista. Quando, após discussão em equipe multiprofissional, foi constatado que a abordagem e a coleta de amostras deveriam ser feitas em ocasiões diferentes das previstas, os custos com o transporte dos pacientes eram arcados pelos próprios pesquisadores. A abordagem para esclarecimentos e leitura/assinatura do TCLE foi realizada em uma sala reservada para esse fim, no COR/FSFX.

Considerando que a Unidade de Oncologia atende apenas pacientes com diagnóstico altamente suspeito ou confirmado de câncer, a seleção dos pacientes sem a doença foi realizada em conjunto com especialistas em urologia do Ambulatório da Policlínica Municipal da SMS de Ipatinga. As amostras e os formulários de pesquisa obtidos dos indivíduos sem câncer foram colhidos na

mesma ocasião em que eles receberam os resultados (negativos) dos exames de rastreamento, por meio de abordagem direta feita pelo pesquisador. Nesse caso, a aproximação ao paciente para esclarecimentos e leitura/assinatura do TCLE foi realizada em uma sala reservada, nos dias de atendimentos urológicos.

Após esclarecimento sobre a pesquisa, os procedimentos a serem realizados e os objetivos da mesma, os sujeitos da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), elaborado de acordo com as normas éticas para pesquisas envolvendo seres humanos, Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Foram usados como critérios de inclusão o indivíduo que realizou investigação para câncer de próstata por meio de toque retal + PSA total (controles) ou biópsia prostática nos últimos doze meses (casos). Como critérios de exclusão foram levados em consideração o indivíduo que tinha histórico de doenças capazes de produzir níveis de PpIX falso-positivos, a saber: porfiria, outros tipos de câncer e história ocupacional de risco para intoxicação por chumbo ou outros metais; que estava fazendo uso de aspirina ou outra substância que pudessem interferir na coagulação na ocasião da coleta do exame de sangue e aqueles indivíduos que não consentiram em participar da pesquisa.

Aproximadamente 7 mL de sangue foram coletados por técnicos treinados do laboratório São Lucas, que colaboraram com a pesquisa, por punção venosa da veia do antebraço de cada indivíduo. Todas as amostras foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante apropriado (heparina) até o momento de seu processamento. Os tubos coletores foram envoltos em papel alumínio visando proteger as amostras, por serem as mesmas fotossensíveis.

O sangue coletado foi armazenado e transportado a 4°C pelo período de 48-72h antes de ser processado nos laboratórios do IPEN/USP. O transporte foi realizado pelo orientador-pesquisador, do município de Ipatinga, MG, até o município de São Paulo, SP, por via aérea, em uma única viagem. A manutenção da temperatura foi realizada através de gelo comum colocado dentro de caixas de isopor e acompanhada por meio de um termômetro instalado dentro delas durante todo o trajeto.

As amostras foram processadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), cerca de 48-72h após a data da coleta, pela Profa. Dra. Maria Helena Bellini, orientadora da

pesquisa de doutorado do Prof. Daniel Riani Gotardelo, juntamente com seus alunos de iniciação científica.

A extração da PpIX a partir do sangue foi realizada com acetona pura na proporção de 3 partes de acetona para 1 parte de líquido biológico. Todas as amostras foram extraídas em duplicata. Após centrifugação em 4.000 rpm por 15 minutos, as amostras foram analisadas por espectroscopia de fluorescência no Centro de Laser e Aplicações do IPEN/USP pela Profa. Dra. Flávia Rodrigues de Oliveira Silva, colaboradora na pesquisa de doutorado do Prof. Daniel Riani Gotardelo, utilizando o equipamento Fluorog Horiba Jobin Yvon, com lâmpada de xenônio de 150W. A abertura do slit, fenda que define a quantidade de luz que atingirá a amostra, foi de 4 mm. As amostras foram excitadas em 405 nm e, preliminarmente, foi realizada varredura para escolha do melhor pico para, em seguida, proceder-se à análise espectrofotométrica.

Os dados foram analisados empregando-se estatística descritiva e inferencial. Para análise estatística, foi utilizado o software SPSS, versão 19.0. As variáveis quantitativas foram descritas por meio de média e desvio padrão. Já as variáveis qualitativas foram descritas por meio de frequência absoluta e relativa. Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade. Para comparação das médias dos grupos utilizou-se o teste t independente e para verificar a correlação utilizou-se o teste de Pearson. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Neste estudo foram analisadas amostras de 54 indivíduos, do sexo masculino, com a faixa etária entre 45 e 83 anos de idade, sendo 27 indivíduos no grupo de caso e 27 indivíduos no grupo de controle, tendo havido o não comparecimento de 10% dos sujeitos recrutados para a coleta das amostras.

Nas tabelas 1 e 2 pode-se observar a homogeneidade dos grupos estudados quanto às variáveis idade, estado civil, história familiar de câncer de próstata, presença de diabetes e de algum grau de etilismo. Para análise das variáveis da tabela 1, foi empregado o teste qui quadrado com o objetivo de avaliar relação entre 2 variáveis quantitativas. Para a comparação das médias da tabela 2, utilizou-se teste t independente.

TABELA 1 - Frequência das variáveis estudadas nos casos e controles.

| Variáveis | Controle | | Casos | | Valor p |
|--|----------|------|-------|------|---------|
| | n | % | n | % | |
| Estado Civil | | | | | |
| Casado | 20 | 74,1 | 22 | 81,5 | 0,65 |
| Solteiro | 3 | 11,1 | 1 | 3,7 | |
| Divorciado | 2 | 7,4 | 1 | 3,7 | |
| Viúvo | 2 | 7,4 | 3 | 11,1 | |
| Etilismo | | | | | |
| Sim | 10 | 37,0 | 11 | 40,7 | 0,78 |
| Não | 17 | 63,0 | 16 | 59,3 | |
| Tabagismo | | | | | |
| Sim | 1 | 3,7 | 5 | 18,5 | 0,08 |
| Não | 26 | 96,3 | 22 | 81,5 | |
| História Familiar de Câncer de Próstata | | | | | |
| Sim | 5 | 18,5 | 4 | 14,8 | 0,71 |
| Não | 22 | 81,5 | 23 | 85,2 | |
| Histórico de outros tipos de câncer | | | | | |
| Sim | 2 | 7,4 | 1 | 3,7 | 0,55 |
| Não | 25 | 92,6 | 26 | 96,3 | |
| Diabético | | | | | |
| Sim | 7 | 25,9 | 7 | 25,9 | 0,99 |
| Não | 20 | 74,1 | 20 | 74,1 | |

TABELA 2 - Média de idade \pm DP dos casos e dos controles.

| Idade (anos) | $\bar{x} \pm s$ | Valor p |
|--------------|------------------|---------|
| Controles | 63,14 \pm 6,76 | 0,19 |
| Casos | 67,9 \pm 8,76 | |

Os níveis de PSA total inicial encontrados nos indivíduos com e sem a doença podem ser vistos na tabela 3. Empregou-se teste t independente para a análise.

TABELA 3 - Média dos níveis de PSA total \pm DP encontrados nos casos e dos controles.

| PSA total (ng/mL) | $\bar{x} \pm s$ | Valor p |
|-------------------|-----------------|---------|
| Controles | 1,54 \pm 1,01 | p<0,05 |
| Casos | 9,37 \pm 4,06 | |

O paciente com câncer de próstata pode ser estadiado de acordo com sua dosagem de PSA total. Um valor abaixo de 10 ng/mL é um forte indicativo da ausência de doença metastática. Em relação ao estadiamento em que se

encontravam os pacientes com câncer de próstata, o número e a proporção de indivíduos de baixo, intermediário e alto risco de acordo com a classificação D'Amico, podem ser vistos na figura 1.

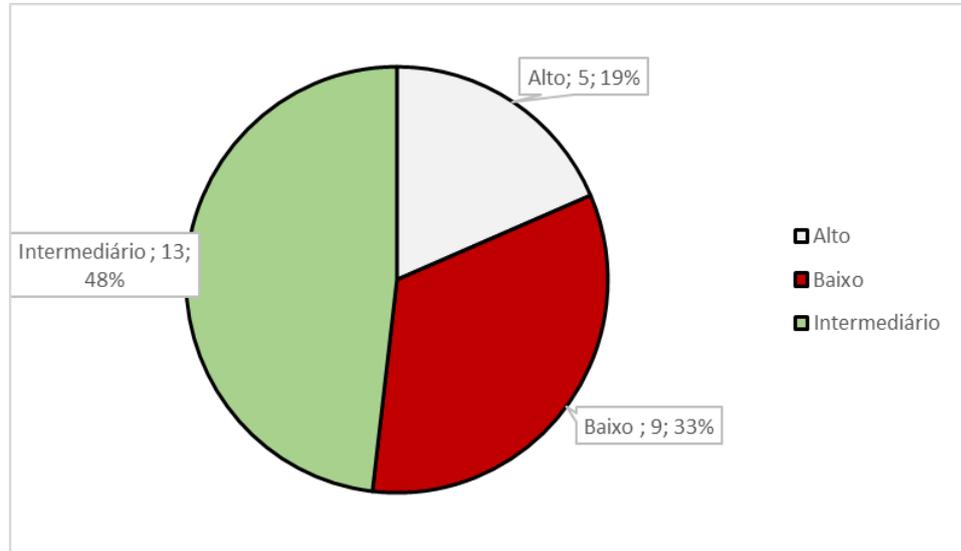


FIGURA 1. Número e proporção de indivíduos com câncer de próstata, de acordo com o risco.

Os níveis de PpIX em sangue total foram determinados nos casos e nos controles e não se mostraram estatisticamente significativos entre os grupos, já que $p = 0,792$ (tabela 4). Para comparação das médias utilizou-se o teste t independente ($p < 0,05$).

TABELA 4. Níveis de PpIX em casos e controles.

| Variável | Grupos | \bar{x} | S | Valor p |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|---------|
| PpIX sanguínea (unidades arbitrárias) | Controles | 4.158.900 | 1.789.190 | 0,792 |
| | Casos | 4.288.800 | 1.775.550 | |

A correlação entre os níveis de PSA total e as concentrações de PpIX foi verificada pelo coeficiente de Pearson (r). No caso do PSA total x PpIX, não houve correlação estatisticamente significativa (tabela 5).

TABELA 5. Correlação entre os níveis de PSA total e os níveis de PpIX nos casos.

| Variáveis | r | Valor p |
|----------------------------|--------|---------|
| PpIX Sanguínea x PSA total | -0,089 | 0,672 |

Correlação de Pearson * $p < 0,05$

Possível associação entre os níveis de PpIX *versus* o estágio/risco em que se encontravam os pacientes com câncer também foi verificada e não foi estatisticamente significativa (tabela 6).

TABELA 6. Correlação entre os níveis de PpIX e o estágio/risco em que se encontravam os pacientes com câncer.

| Variável | Risco | n | % | \bar{x} | <i>s</i> | Valor p |
|-----------------------------|---------------|----|----|-----------|-----------|---------|
| PpIX (unidades arbitrárias) | Baixo | 9 | 33 | 4.752.200 | 2.644.680 | 0,181 |
| | Intermediário | 13 | 48 | 4.484.200 | 921.101 | |
| | Alto | 5 | 19 | 2.986.000 | 813.867 | |

Discussão

Nos últimos anos tem-se observado grande controvérsia em relação ao rastreamento do câncer de próstata no meio científico. A combinação de toque retal mais dosagem de PSA total apresenta utilidade para a detecção precoce da doença, mas não tem sido suficiente para diferenciar os casos indolentes daqueles mais invasivos, onde a relação risco-benefício de um tratamento oncológico mais agressivo se justificaria.

Até o presente momento, o sistema de classificação D'Amico é uma das abordagens mais utilizadas para avaliar o risco de câncer de próstata e dividir os pacientes em grupos prognósticos. Tal distribuição foi projetada com o intuito de verificar o risco de recorrência após o tratamento localizado. Classifica os pacientes em três grupos baseados em risco: baixo, intermediário e alto risco, usando medidas como níveis de PSA total, o escore patológico de Gleason e estágios do tumor através dos escores T, tornando esses os melhores marcadores prognósticos ainda disponíveis. (EIFLER et al., 2013; MOHLER et al., 2016; MARK SCHOLZ, 2017).

Em relação ao risco é categorizado como: baixo risco, aqueles com um PSA inferior ou igual a 10, um escore de Gleason inferior ou igual a 6, ou estão no estágio clínico T1-2a; risco intermediário, homens com PSA entre 10 e 20, um escore de Gleason de 7, ou estão no estágio clínico T2b; alto risco, aqueles com um PSA de mais de 20, um escore de Gleason igual ou maior que 8, ou estão no estágio clínico T2c-3a (MARK SCHOLZ, 2017).

Foi demonstrado o metabolismo anormal da PpIX eritrocitária, uma molécula autofluorescente, em algumas condições clínicas como o câncer, envenenamento por chumbo e porfirias. A PpIX encontra-se aumentada em tecidos e materiais biológicos de indivíduos com câncer como consequência de alterações metabólicas que podem ser causadas pela hipervascularização tumoral (COURROL et al., 2007; KALAIVANI et al., 2008; MADHURI et al., 2003).

Van der Breggen et al. (1996) comprovaram que houve aumento da quantidade de PpIX em lesões pré-malignas e malignas de carcinoma de células escamosas de mucosa oral, em relação ao tecido normal (VAN DER BREGGEN et al., 1996). Moesta e colaboradores (2001) evidenciaram que tanto o tumor primário quanto as metástases de câncer colorretal levam ao aumento dos níveis de PpIX, apresentando potencial de utilização tanto para o diagnóstico quanto para o acompanhamento do tratamento. Em estudo conduzido na Índia, Kalaivani e colaboradores (2008) mensuraram os níveis de porfirinas a partir do sangue de pacientes sem e com câncer de mama em estágios precoce e avançado, concluindo que existe a possibilidade dos mesmos serem utilizados como marcador tumoral (KALAIVANI et al., 2008). Outros estudos em vários tipos de tecidos foram conduzidos e ratificaram o potencial de utilização da técnica para o diagnóstico de tumores (ANDERSSON-ENGELS et al., 1997; D'HALLEWIN; BEZDETNYA; GUILLEMIN, 2002; MADHURI et al., 2003; BELLINI et al., 2008; GIBBS-STRAUSS et al., 2009).

Em relação ao câncer prostático, os estudos encontrados na literatura até o momento são de nível experimental. Nesses trabalhos, Silva e colaboradores (2013) mensuraram a fluorescência da PpIX em sangue e fezes de cobaias, propondo que a determinação da mesma possa ser utilizada como método não-invasivo e rápido para o diagnóstico desse tipo de tumor, principalmente de forma complementar ao PSA e toque retal em pacientes com prostatite, situação em que, por exemplo, poderia haver um resultado falso-positivo de PSA (SILVA et al., 2010; 2013).

O número de indivíduos estudados neste trabalho foi semelhante ao utilizado em uma pesquisa que demonstrou aumento significativo da concentração de PpIX sanguínea e tissular em pacientes com câncer colorretal em estágio precoce (JIA; WAN, 2009).

A análise comparativa dos valores de autofluorescência da PpIX sanguínea entre os pacientes casos e controles não mostrou diferença significativa ($p=0,792$).

Era de esperar que a concentração de PpIX sanguínea fosse maior nos pacientes com câncer de próstata, tendo em vista que já foi demonstrado o acúmulo desta molécula em células cancerígenas de tumores prostáticos e de outros órgãos (MOESTA et al., 2001; NA; STENDER; WULF, 2001; D'HALLEWIN et al., 2002; MADHURI et al., 2003; CHATTERTON; RAY; O'BRIEN, 2006; COURROL et al., 2007; UTSUKI et al., 2007; BELLINI et al., 2008; KALAIVANI et al., 2008; LU, 2008; GIBBS-STRAUSS et al., 2009; JUZENAS et al., 2009). A justificativa para esse aumento nos trabalhos em que houve diferença estatisticamente significativa foi hipotetizada:

1. Pela hipervascularização característica das neoplasias malignas, que poderia potencializar o acúmulo de porfirinas pelo fato de maior quantidade de hemoglobina reagir com o tumor, na tentativa de neutralizá-lo (SILVA et al., 2010);

2. Pelo fato das protoporfirinas serem mais lipossolúveis em ambiente ácido, situação compatível com a presença de ácido láctico proveniente do metabolismo anaeróbico encontrado em vários tumores (JIA; WAN, 2009);

3. Pela presença de bactérias em tumores de vísceras ocas, que poderiam degradar a hemoglobina na superfície luminal, contribuindo para o aumento do sinal de autofluorescência (MOESTA et al., 2001);

4. Principalmente, pelas anormalidades metabólicas presentes em células malignas. Redução da disponibilidade intracelular de Ferro pelo aumento da frequência de divisão celular, redução de atividade da enzima ferroquelatase e aumento da atividade da enzima porfobilinogênio deaminase, interferindo na incorporação do ferro presente na biossíntese do heme, favorecendo o acúmulo de PpIX no tumor (EL-SHARABASY et al., 1992; MOESTA et al., 2001).

Como já foi discutido, o presente trabalho não apresentou significância estatística e alguns fatores que podem ter afetado os resultados são discutidos em seguida.

Limitação no que diz respeito à vulnerabilidade da aplicação do questionário, por esse depender da veracidade das respostas do entrevistado, deve ser indagada, devido ao fato que algum desconhecimento patológico ou resposta inadequada, sobretudo um desconhecimento de uma possível neoplasia que poderia interferir e/ou comprometer a amostra e até mesmo colocar o indivíduo em grupo diferente ao qual foi inicialmente classificado. O fato de serem pacientes do SUS, onde a demora clínica e diagnóstica de algumas doenças se mostram presentes, poderia justificar

um possível desconhecimento patológico dos pesquisados, ou até mesmo o fato de que muitas pessoas não sabem ao certo sobre suas próprias comorbidades. Pacientes com câncer de próstata recrutados eram de baixo a intermediário risco em sua maioria, por esse motivo poderia se tratar de um tumor mais indolente nesses indivíduos e, em decorrência disso, as alterações nas marcações de PpIX poderiam não ter sido tão evidentes como foi visto nas pesquisas envolvendo outros tipos de câncer e na pesquisa experimental em cobaias com câncer de próstata. Portanto, não se conseguiu reproduzir o mesmo resultado satisfatório.

Apesar da falta de especificidade desse possível marcador, caso fossem confirmadas as diferenças encontradas em modelos experimentais, novos estudos com amostras maiores poderiam ser conduzidos para averiguar, além da utilidade diagnóstica, o potencial de determinação de prognóstico associado às concentrações de porfirinas em indivíduos com câncer de próstata.

Conclusão

O metabolismo anormal da protoporfirina IX eritrocitária (PpIX), quantificado e observado em outros trabalhos que investigaram o câncer de mama e o câncer intestinal, além do câncer de próstata em modelos experimentais, não se confirmou na pesquisa realizada neste trabalho. O presente estudo constatou não haver diferença estatística significativa entre as variáveis clínicas (estadiamento, níveis de PSA total ao diagnóstico, história familiar, tabagismo, etilismo, entre outros), sociodemográficas (idade, profissão, escolaridade e estado civil) e em relação às dosagens de PpIX em materiais biológicos no grupo de pacientes com câncer (caso) e sem câncer (controle).

O câncer de próstata, altamente incidente no Brasil e no mundo, apresenta-se como um grande desafio para a comunidade científica, devido à controvérsia em relação ao rastreamento e aos marcadores de prognóstico da doença. Ressalta-se a importância da realização de mais pesquisas que permitam uma melhor compreensão de processos patogênicos possivelmente relacionados a essa neoplasia. Além disso, a busca de novos métodos diagnósticos para esse tipo de câncer é necessária, visando um diagnóstico cada vez mais precoce e por meio de técnicas mais viáveis e não-invasivas.

DETERMINATION OF LEVELS ERYTHROCYTE PROTOPORPHYRIN IX IN BIOLOGICAL FLUIDS OF INDIVIDUALS WITH PROSTATE CANCER

Juliana Hosken Pires¹, Letícia Assis Cândido¹, Natália Trifiletti Crespo¹, Viviane Silva Rampinelli¹ & Daniel Riani Gotardelo²

1 - Acadêmicas do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil.

2 - Coordenador e docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES – Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. Orientador do TCC.

ABSTRACT

The prostate cancer is currently the second cancer with greater incidence among men in Brazil and in the world. Many risk factors are established, some of them being the age, family history, lifestyle and eating habits. The tests most widely used for screening is the total PSA and the rectal examination. It has been observed in individuals with this and another types of cancer an abnormal metabolism of erythrocyte protoporphyrin IX (PpIX) a precursor porphyrin heme, causing the levels of the substance to be elevated and allowing it to be quantified. **Objectives:** The aim of this study was to quantify and compare the concentrations of PpIX in biological fluids (blood) and evaluate the sociodemographic and clinical profile of patients with prostate cancer diagnosed by biopsy compared to case-control represented by patients who have undergone the examination rectal examination and total PSA with negative results in the last 12 months. **Methods:** A case-control study was conducted with a sample of 54 individuals, being 27 cancer patients and 27 without the disease. Analyses were carried out of PpIX concentration in blood of the patients, besides the application of a questionnaire with the variables: age, marital status, family history of prostate cancer, diabetes, level of alcohol abuse or smoking and prostate disease. **Results:** Regarding the variables of the questionnaire, homogeneity between the two groups was demonstrated. Regarding the dosage of PpIX, there was no statistically significant difference between the groups through the blood samples. **Conclusion:** The prostate cancer is presented as a major challenge raising controversy over screening and prognostic markers. There was no significant statistical difference in relation to clinical, sociodemographic and the dosage of PpIX in the case and control groups counteracting what had been observed in experiment models of prostate cancer. Thereby, it is suggested the conduct of further research to improve the understanding of the pathophysiological processes which can contribute to the development of better diagnostic methods and prognostic markers.

Key words: Cancer. Prostate. Protoporphyrin IX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON-ENGELS, S. et al. In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics. *Physics in medicine and biology*, v. 42, n. 5, p. 815-824, 1997.
- BELL, K. J. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *International journal of cancer*, v. 137, n. 7, p. 1749-1757, 2015.
- BELLINI, M. H. et al. Correlation between autofluorescence intensity and tumor area in mice bearing renal cell carcinoma. *Journal of fluorescence*, v. 18, n. 6, p. 1163-1168, 2008.
- BV - BIBLIOTECA VIRTUAL DA FAPESP. Sistemas de imagem de fluorescência para detecção de lesões potencialmente malignas e carcinoma epidermóide da cavidade oral. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/45378/sistemas-de-imagem-de-fluorescencia-para-deteccao-de-lesoes-potencialmente-malignas-e-carcinoma-epid/>>. Acesso em 02 de jun. 2017.
- CHATTERTON, K.; RAY, E.; O'BRIEN, T. S. Fluorescence diagnosis of bladder cancer. *Br J Nurs*, v. 15, n. 11, p. 595-597, 2006.
- COURROL, L.C. et al. Study of blood porphyrin spectral profile for diagnosis of tumor progression. *Journal of fluorescence*, v. 17, n.3, p. 289-292, 2007.
- D'HALLEWIN, M. A.; BEZDETNYA, L.; GUILLEMIN, F. Fluorescence detection of bladder cancer: a review. *European urology*, v. 42, n. 5, p. 417-425, 2002.
- DOBRUCH, J. et al. Gender and bladder cancer: a collaborative review of etiology, biology, and outcomes. *European urology*, Basel, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26346676>>. Acesso em: 28 out. 2015.
- EL-SHARABASY, M. M. et al. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *British journal of cancer*, v. 65, n. 3, p. 409-412, 1992.
- FILHO, J. D. V. *Identificação e quantificação de fotossensibilizador em tecido hepático por espectroscopia de fluorescência e sua importância na terapia fotodinâmica*. 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Física Aplicada) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.
- GIBBS-STRAUSS, S. L. et al. Noninvasive measurement of aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence allowing detection of murine glioma in vivo. *Journal of biomedical optics*, v.14, n. 1, 2009.
- GOMES, C. Z. *Utilização da espectroscopia de fluorescência para mensuramento de moléculas autofluorescentes em indivíduos diabéticos*. 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.
- HAYES, J.H.; BARRY M.J. Screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test: a review of current evidence. *Jama*, v. 311, n.11, p. 1143-1149, 2014.
- HEIDENREICH, A. et al. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *European urology*, v. 65, n.1, p. 124-137, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
 Coordenação de Prevenção e Vigilância-Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Disponível em:
 <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>
 Acesso em 02 de jun. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
 Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em:
 <http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Estimativa_2014.pdf>
 Acesso em 5 de set. 2016.

JIA, Z.; WAN, X. Concentration of protoporphyrin IX in cancer tissues and blood in patients with colorectal cancer at early stage. *Journal of Central South University Medical science*, v. 34, n. 9, p. 846-849, 2009.

JUZENAS, P. et al. Depth profile of protoporphyrin IX fluorescence in an amelanotic mouse melanoma model. *Photochemistry and photobiology*. v. 85, n. 3, p. 760-764, 2009.

KALAIVANI, R. et al. Fluorescence spectra of blood components for breast cancer diagnosis. *Photomedicine and laser surgery*, v. 26, n. 3, p. 251-256, 2008.

LU, S. Fluorescence detection of protoporphyrin IX in living cells: a comparative study on single- and two-photon excitation. *Journal of biomedical optics*, v. 13, n. 2, 2008.

MADHURI, S. et al. Native fluorescence spectroscopy of blood plasma in the characterization of oral malignancy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 78, n. 2, p. 197-204, 2003.

MARK SCHOLZ, MD. D'Amico classification system for prostate cancer - verywell. Disponível em: <<https://www.verywell.com/damico-classification-system-for-prostate-cancer-2782233>> Acesso em 02 de jun. 2017.

MOESTA, K. T. et al. Protoporphyrin IX occurs naturally in colorectal cancers and their metastases. *Cancer research*, v. 61, n. 3, p. 991-999, 2001.

MOHLER, J. L. et al. Prostate Cancer, Version 1.2016. *J Natl Compr Canc Netw*, v. 14, n. 1, p. 19-30, 2016.

NA, R.; STENDER, I.M.; WULF, H. C. Can autofluorescence demarcate basal cell carcinoma from normal skin? A comparison with protoporphyrin IX fluorescence. *Acta Derm Venereol*, v. 81, n. 4, p. 246-249, 2001.

NACIONAL CANCER INSTITUTE. Surveillance epidemiology and end results. Disponível em: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>> Acesso em 02 jun. 2017.

OBORT, A.S.; AJADI, M. B.; AKINLOYE, O. Prostate-Specific Antigen: Any Successor in Sight? *Reviews in urology*, v. 15, n. 3, p. 97-107, 2013.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.

SILVA, F.R. et al. Intrinsic fluorescence of protoporphyrin IX from blood samples can yield information on the growth of prostate tumours. *Journal of fluorescence*, v. 20, n. 6, p. 1159-1165, 2010.

SILVA, F.R. et al. Study of protoporphyrin IX elimination by body excreta: a new noninvasive cancer diagnostic method?. *Journal of fluorescence*, v. 23, n. 1, p. 131-135, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. Câncer de Próstata. São Paulo (SP): SBU; 2016. Disponível em: http://sbu-sp.org.br/old/publico-geral/materia_doencas.php?id=17

STRATTON, J.; GODWIN, M. The effect of supplemental vitamins and minerals on the development of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Fam Pract*, v. 28, n. 3, p. 243-252, 2011.

UTSUKI, S. et al. Fluorescence-guided resection of metastatic brain tumors using a 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX: pathological study. *Brain Tumor Pathol*, v. 24, n. 2, p. 53-55, 2007.

VAN DER BREGGEN, E.W.J.R.A. et al. Spectroscopic detection of oral and skin tissue transformation in a model for squamous cell carcinoma: autofluorescence versus systemic aminolevulinic acid-induced fluorescence. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*, v. 2, p. 997-1007, 1996.

VANCE, T.M. et al. Dietary antioxidants and prostate cancer: a review. *Nutrition and cancer*, v. 65, n. 6, p. 793-801, 2013.