



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Análise de mediadores inflamatórios sistêmicos em pacientes portadores de câncer
de próstata e de hiperplasia prostática benigna**

GLEICIANE GONTIJO DE AVELAR

Brasília -DF
18 de março de 2020

GLEICIANE GONTIJO DE AVELAR

Análise de mediadores inflamatórios sistêmicos em pacientes portadores de câncer de próstata e de hiperplasia prostática benigna

Orientador: Prof. Dr. Otávio de Toledo Nóbrega

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina – UnB, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Brasília – DF

18 de março de 2020

Gleiciane Gontijo de Avelar

**ANÁLISE DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SISTÊMICOS EM
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE PRÓSTATA E DE
HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de
Medicina – UnB, como requisito parcial à obtenção
do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Otávio de Tolêdo Nóbrega (Orientador)

Antônio Macho Quirós (Banca Examinadora)

Karla Helena Coelho Vilaça e Silva (Banca Examinadora)

Clayton Franco Moraes (Suplente)

Brasília – DF

18 de março de 2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

GAV948a Gontijo de Avelar, Gleiciane
Análise de mediadores inflamatórios sistêmicos em
pacientes portadores de câncer de próstata e de hiperplasia
prostática benigna. / Gleiciane Gontijo de Avelar;
orientador Otávio Toledo Nóbrega. -- Brasília, 2020.
36 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2020.

1. Interleucina. 2. inflamação. 3. câncer de próstata. 4.
hiperplasia prostática benigna . 5. envelhecimento. I.
Toledo Nóbrega, Otávio, orient. II. Título.

“With great power comes great responsibility!”

Stan Lee

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Otávio Nóbrega, que me concedeu esta oportunidade de trabalharmos juntos, me direcionando e sempre me orientando a caminhos mais sensatos.

Ao “menino da TI”, meu amigo Gabriel Lacerda, que me forneceu suportes técnicos, psicológicos e críticos.

À minha grande amiga Maíza Gomes que sempre esteve comigo e acreditou no meu potencial, especialmente nos momentos mais frágeis e de pouca sanidade.

Ao meu companheiro, Paulo César, agradeço por todo carinho, parceria e bom senso. Seu exemplo me faz querer ser sempre um ser humano melhor.

Ao meu irmão, Gustavo Gontijo, que sempre me ensinou que nós criamos nossos próprios demônios e é nosso dever combatê-los.

A minha mãe, Divina Célia, e meu pai, Amilton Alves, que sempre me mostraram que somos definidos por nossas ações.

A CAPES, CNPq e FAP-DF, órgãos de fomento nacionais que viabilizaram a realização deste trabalho, juntamente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina por todo auxílio prestado, em especial os servidores Alessandro, Isabela e Júnior, que sempre foram muito solícitos em quaisquer necessidades.

Ao Programa *Global Affairs Canada* que viabilizou minha bolsa de estudos no Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP), contribuindo com mais uma inesquecível experiência internacional de mobilidade acadêmica em parceria com universidade *McGill*.

E a todos aqueles que mesmo não mencionados aqui contribuíram com mais esta conquista em minha jornada acadêmica.

LISTA DE ABREVIATURAS

CaP: Câncer de próstata

HbA1c: hemoglobina glicada tipo A1c

HDL: lipoproteína de alta densidade

HPB: Hiperplasia prostática benigna

HOMA: avaliação do modelo de homeostase

INF: interferon

IL: Interleucina

LDL: lipoproteína de baixa densidade

PAP: Fosfatase ácida

PCR: proteína C reativa

PSA: Antígeno específico prostático

TAMs: Macrófagos associados a tumores

TGO: transaminase glutâmico-oxaloacética sérica

TGP: transaminase glutâmico-pirúvica sérica

TNF α : Fator de necrose tumoral α

TSH: hormônio estimulador da tireóide

VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa

γ GT: gama-glutamil transferase

Resumo

A investigação do perfil inflamatório sistêmico de pacientes afetados por câncer de próstata (CaP) ou hiperplasia prostática (HPB) pode contribuir para caracterizar o perfil patológico, bem como permitir a identificação de marcadores e promover alternativas para tratamentos adequados e menos invasivos. Neste aspecto, este trabalho se propôs a comparar os níveis séricos de 10 mediadores inflamatórios clássicos em pacientes com 50 anos ou mais de idade afetados por CaP ou HPB. Para isso, foram considerados aspectos clínicos, bioquímicos, metabólicos, antropométricos e inflamatórios de cada paciente. A partir da análise estatística, foi encontrada uma correlação positiva fraca ($d = 0,16$) entre a IL-2 e os valores séricos de PSA total. Além disso, os valores séricos medianos de IL-2 foram três vezes maiores nos pacientes com CaP em comparação aos pacientes com HPB. Pela interpretação da literatura atual, levantamos a hipótese de que a atividade de macrófagos do tipo M1 infiltrados e células citotóxicas ativadas no meio neoplásico pode explicar esse aumento da IL-2 como parte de uma resposta antineoplásica endógena.

Abstract

Investigation on the systemic inflammatory profile of patients affected by prostate cancer (PCa) or prostatic hyperplasia (BPH) may contribute to characterize the pathological profile as well as enable identification of markers and promote alternatives for appropriate, less invasive treatments. This research compared the serum levels of 10 classic inflammatory mediators among patients aged 50 years or older affected by PCa or BPH. For this, clinical, biochemical, metabolic, anthropometric and inflammatory aspects of each patient were considered. From statistical analysis, a weak positive correlation ($r = 0.16$) between IL-2 with serum total PSA values was found. In addition, median serum IL-2 values were three times higher in patients with PCa compared to BPH patients. By interpretation of current literature, we hypothesize that the activity of infiltrated type M1 macrophages and activated cytotoxic cells in the neoplasm milieu might explain this increase of IL-2 as part of an endogenous anti-neoplastic response.

Sumário

INTRODUÇÃO	14
1.1 Próstata	14
1.2 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)	15
1.3 Câncer de Próstata (CaP).....	16
1.4 Biomarcadores	18
OBJETIVOS.....	20
MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Avaliação Urológica	21
3.2 Análises laboratoriais: testes clínicos e bioquímicos	22
3.3 Perfil Inflamatório	22
3.4 Análises estatísticas	23
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Representação da anatomia da próstata com visão anterior do órgão (A) e visão lateral do órgão (B). 14
- Figura 2** – Representação da próstata em condições normais comparada a condição de HPB (Google imagens adaptado). 16
- Figura 3** - Representação do aparelho reprodutor masculino com detalhamento da próstata acometida por tumor (*American Cancer Society*). 17

TABELAS

- Tabela 1.** Características clínicas e bioquímicas do soro dos indivíduos de acordo com o diagnóstico de câncer de próstata (CaP) ou hiperplasia prostática benigna (HPB) 25
- Tabela 2.** Análises de correlação dos níveis séricos do antígeno prostático específico (total e livre) e sua relação entre os níveis dos mediadores inflamatórios investigados nos 162 homens mais velhos na admissão 26
- Tabela 3.** Níveis circulantes de mediadores imunológicos de acordo com o diagnóstico de câncer de próstata (CaP) ou hiperplasia prostática benigna (HPB)..... 27

ANEXOS

ANEXO I - Confirmação de submissão do artigo “*Serum levels of interleukin-2 differ between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia.*” 35

ANEXO II - Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP) 36

Introdução

1.1. Próstata

Com um tamanho aproximado de uma noz, a próstata corresponde a uma glândula exócrina, pertencente ao sistema reprodutor masculino (Cunha et al., 1987). Sua principal função corresponde à produção, armazenamento e secreção de fluidos, como a fosfatase ácida (PAP – do inglês, *Prostate Acid Phosphatase*) e o antígeno prostático (PSA – do inglês, *Prostate-Specific Antigens*), que servirão para nutrição e proteção dos espermatozoides auxiliando na formação do esperma (BALK; KO; BUBLEY, 2003).

Estando localizada na região pélvica do homem, abaixo da bexiga e à frente do reto (Drake et al., 2005), a próstata é atravessada pela uretra, sendo seu tamanho alterado ao longo dos anos e seu crescimento responsável por comprimir órgãos e estruturas próximas, desencadeando sinais e sintomas inespecíficos especialmente em neoplasias malignas e hiperplasia benigna prostática (HPB) (Bordoni B, Sugumar K, Leslie SW, 2020).

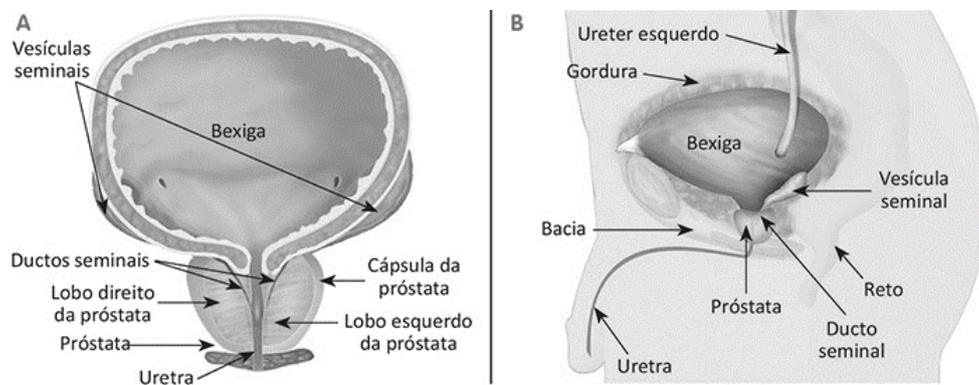


Figura 1: Representação da anatomia da próstata com visão anterior do órgão (A) e visão lateral do órgão (B). (Google Imagens. <https://www.vencercancer.org.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata-tipos-de-cancer/o-que-e-9/>)

Possuindo lobos, ácinos e ductos, o desenvolvimento prostático ocorre ainda no período fetal, sendo o crescimento variável entre os homens e dependendo dos hábitos de vida, idade, condições inflamatórias e alterações hormonais. Especialmente na puberdade, a próstata apresenta sua maior parte do crescimento (cerca de 1,6 gramas ao ano), atingindo na idade adulta um peso aproximado de 20 gramas (Lee C et al., 2001). No contexto celular, o epitélio prostático humano apresenta células basais, luminais e

neuroendócrinas, enquanto o estroma prostático apresenta diversos tipos celulares, onde os fibroblastos e as células musculares lisas são mais predominantes (PAREKH et al., 2004).

A testosterona corresponde a um componente importante para a atividade homeostática e morfogênica da próstata (Marker et al., 2003), sendo um andrógeno responsável pelo crescimento prostático no período da puberdade à vida adulta. Entretanto, a ação intraglandular ocorre a partir da atividade do metabólito ativo da testosterona, a di-hidrotestosterona (DHT), obtida através da conversão da testosterona a partir da enzima 5- α redutase, que está presente no fibroblasto do estroma e nas células epiteliais basais (LEE et al., 2019). A atividade hormonal, no entanto, é mediada por receptores específicos, como é o caso do receptor de andrógenos (AR – do inglês, *androgen receptor*) e do receptor de estrógenos (ER – do inglês, *estrogen receptor*) α e β (Yang et al., 2007)

Em termos anatômicos, a próstata é dividida em zona central, periférica e de transição. Cerca de 70% da região prostática corresponde a zona periférica que circunda parcialmente a parte distal da uretra prostática (SINGH O, BOLLA SR, 2020). A zona central corresponde a base da glândula que circunda os ductos ejaculatórios, enquanto a zona de transição corresponde a uma pequena parte da glândula que envolve uma porção da uretra entre a bexiga e o colículo seminal, justificando os sinais e sintomas urinários característicos, especialmente da HPB, uma vez que o desenvolvimento desta doença ocorre nesta região (AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016).

1.2. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A HPB corresponde à mais frequente disfunção prostática associada à idade, hoje há relatos de que cerca de 50% dos homens apresentam HPB aos 50 anos, e que esta frequência eleva-se para 90% aos 80 anos de idade (BRUM; SPRITZER; BRENTANI, 2005). Sendo caracterizada pelo aumento do número e tamanho das células prostáticas, inúmeras alterações celulares são observadas na HPB, onde a inflamação é descrita como indutora do crescimento fibromuscular prostático (DESCAZEAUD et al., 2011).

Iniciando com a proliferação do estroma fibromuscular e do epitélio glandular na região periuretral na zona de transição, o aumento glandular na HPB apresenta sinais e sintomas clínicos característicos. Alguns exemplos das alterações ocorridas no HPB

corresponde a dificuldade do esvaziamento vesical devido ao aumento do volume da próstata, fluxo urinário fraco devido a diminuição do calibre uretral, aumento da frequência urinária especialmente noturna (noctúria), esforço ao urinar, interrupção do fluxo urinário após o início da micção, disúria, hematúria, (CHUGHAI et al., 2016) (Badawy et al., 2012) (LLOYD et al., 2019).

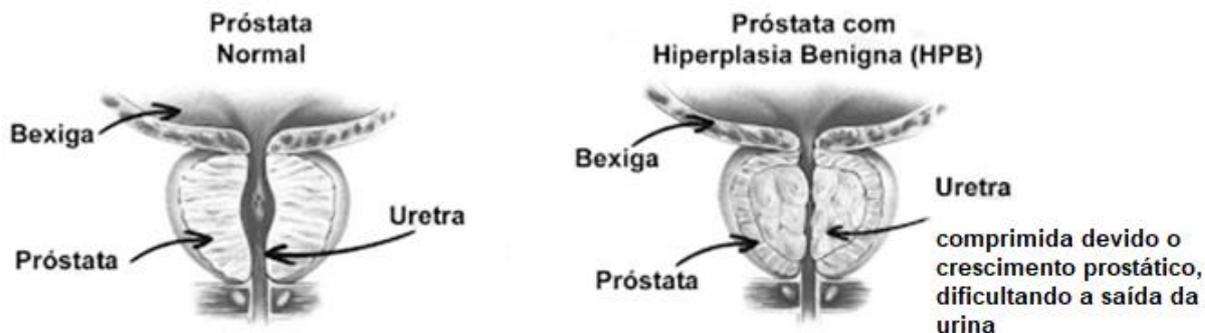


Figura 2 – Representação da próstata em condições normais comparada a condição de HPB (Google imagens adaptado. [https://www.urologyhealth.org/urologic-conditions/benign-prostatic-hyperplasia-\(bph\)](https://www.urologyhealth.org/urologic-conditions/benign-prostatic-hyperplasia-(bph)))

Devido a compressão uretral e o conseqüente acúmulo de urina na bexiga, a inflamação prostática apresenta-se fortemente relacionada à patogênese da HPB, sendo sustentada por evidências epidemiológicas, histopatológicas e moleculares (CAI et al., 2019). Entretanto, não há evidências de que a HPB seja responsável pelo desenvolvimento do CaP (CHUGHAI et al., 2016).

1.3. Câncer de Próstata (CaP)

Classificado como uma doença crônica não transmissível (DCNT) e caracterizado pelo acúmulo progressivo de mutações em que as células apresentam maior proliferação e resistência a mecanismos de indução de morte, o câncer de próstata (CaP) acometeu só no ano de 2018, cerca de 1,28 milhões de casos em todo mundo (WHO, 2018). Variando de forma ampla, as taxas de incidência do CaP por idade foram, respectivamente, maiores na Oceania, América do Norte e Europa, entretanto, enquanto a África e Ásia apresentaram menores taxas (RAWLA, 2019). Sendo a segunda principal causa de morte por câncer entre homens norte-americanos, seis em cada dez diagnósticos realizados para CaP ocorrem em idade igual ou superior a 65 anos (Sociedade Americana do Câncer, 2018). Em linha com a realidade brasileira, o CaP corresponde ao câncer não melanoma mais frequente entre os homens altamente associado ao envelhecimento (INCA, 2017).

Dentre os contribuintes para o desenvolvimento do CaP, a herança familiar figura como principal fator de risco à doença, ao lado do grupo étnico (ancestralidade) e dos hábitos de vida enquanto fatores adicionais, enfatizando a possibilidade de uma prevenção primária (PUTNAM et al., 2000) (ORNISH et al., 2005).

A proliferação progressiva de células estromais e epiteliais da próstata com o avanço da idade é comum e, embora acredita-se que as respostas inflamatórias prostáticas em homens longevos seja multifatorial e seu estímulo ainda não foi totalmente elucidado (BARTOLETTI, 2013). Representando um fator de risco para o desenvolvimento do CaP condições inflamatórias contribuem para formação de lesões, induzindo a mutagênese a partir de estresse oxidativo (SFANOS et al., 2018). Além disso, um papel sinérgico em tumores de próstata de alto grau e na disseminação metastática é exercida pela inflamação (STARK; LIVAS; KYPRIANOU, 2015).

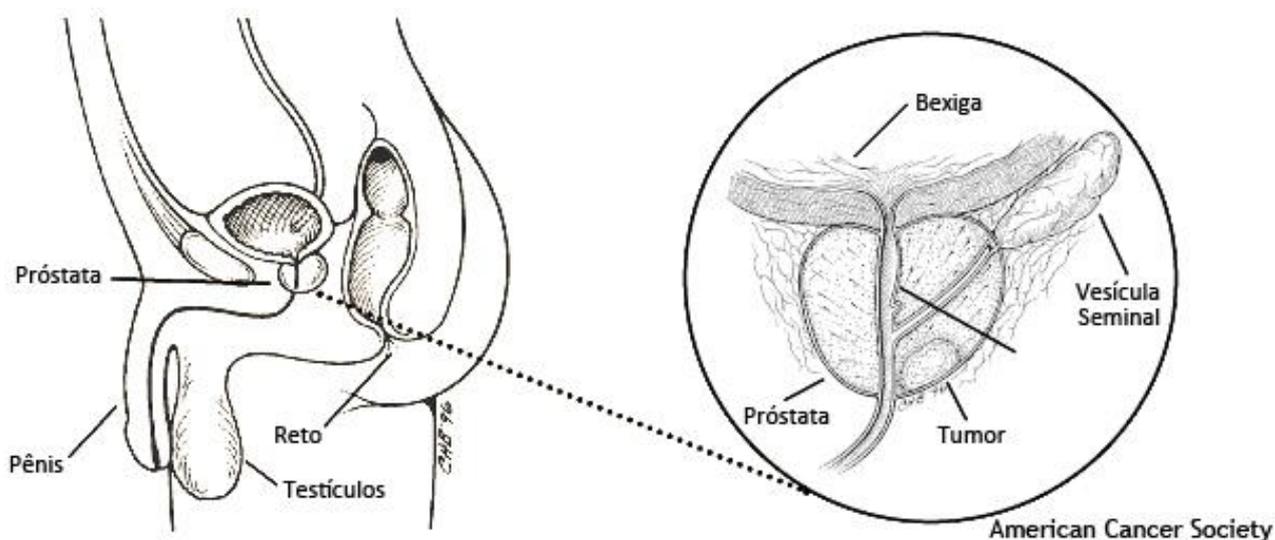


Figura 3: Representação do aparelho reprodutor masculino com detalhamento da próstata acometida por tumor (*American Cancer Society*. <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/what-is-prostate-cancer.html>)

Neste aspecto, tratando-se do ciclo celular normal, quaisquer comportamentos anormais reconhecidos no ambiente celular são passíveis de parada do ciclo e indução de apoptose. Entretanto, uma vez que as células passam por transformações genéticas e se tornam cancerosas, elas necessitam se adaptar ao ambiente celular, competir por nutrientes e serem capazes de evadir do sistema imunológico. Neste aspecto, o surgimento das células cancerosas desencadeia forte reação imunológica, especialmente pelas células citotóxicas (TCD8+) e natural killers (NK). Neste contexto, linfócitos T reguladores CD4+ CD8 + e CD25 +, que possuem sua ativação mantida pela IL-2, foram descritos no

tecido prostático acometido por câncer, e o aumento da sinalização de IL-2 foi capaz de auxiliar no reconhecimento imunológico e direcionamento seletivo para destruição de células cancerosas (ENGELHARDT et al., 2015).

1.4. Biomarcadores

Isolado por Wang et al. pela primeira vez e sendo utilizado na clínica a partir de 1986 o PSA representou um avanço para o diagnóstico e tratamento do CaP. O que antes era um marcador imuno-histológico para distinguir neoplasias prostáticas de outros adenocarcinomas metastáticos, agora é responsável por auxiliar no diagnóstico de doenças prostáticas, estadiamento do câncer, prognóstico e detectar recidivas.(REIS; CASSINI, 2010).

O PSA corresponde a uma protease da família das calicreinas, sintetizada no epitélio prostático e excretada no fluido seminal, sendo uma proteína importante no sêmen, uma vez que promove a liquefação do líquido seminal (BALK; KO; BUBLEY, 2003). Classificado como um marcador órgão específico e não doença específica, o aumento da concentração plasmática do PSA baseia-se na ocorrência de lise celular, possibilitando a liberação desta glicoproteína à corrente sanguínea, sua ligação a proteína plasmática e consequente mensuração bioquímica, quando não previamente inativado. (REIS; CASSINI, 2010).

Como alternativa de monitorização de diferentes condições prostáticas, a dosagem do PSA é atualmente preconizada pela maioria das sociedades médicas de urologia no mundo com valor de referência em 4 ng/mL, entretanto na clínica uma zona de dúvida entre valores de 4 – 10 ng/mL deste antígeno faz com que seja estritamente necessária a realização do toque retal em procedimentos de triagem para detecção precoce do CaP (DE CASTRO et al., 2011). Apesar da utilidade clínica enquanto marcador órgão-específico, dosagens de PSA são passíveis de alteração em diferentes condições prostáticas (prostatite, hiperplasia benigna e câncer, por exemplo), sendo preconizado que sua utilização clínica seja associada a diferentes procedimentos para incremento da especificidade diagnóstica (INCA, 2012).

Além disso, outros estudos que investigaram ferramentas capazes de auxiliar a detecção precoce constataram uma isoforma do PSA, o p2PSA importante para a identificação de CaP agressivo (JANSEN et al., 2010). Além disso, a aplicação clínica de biomarcadores urinários é uma grande promessa no tratamento de pacientes com câncer de próstata em estágio inicial e tardio, onde pelo menos três testes demonstraram alta

sensibilidade (~ 90%) e valor preditivo negativo (~ 95%) para tumores clinicamente significativos (ESKRA et al., 2019).

Tecidos prostáticos acometidos por tumor expressam elevados níveis de diferentes mediadores inflamatórios com potencial para produzir repercussões sistêmicas (FUJITA et al., 2008). Dentre suas inúmeras características, a capacidade de induzir e/ou de promover inflamação crônica, corresponde a uma importante peculiaridade do câncer, sendo estimado que 20% dos casos de câncer entre adultos sejam associadas as condições inflamatórias teciduais (SFANOS; DE MARZO, 2012), onde fatores quimiotáticos acumulados podem viabilizar a evasão neoplásica pela circulação sanguínea e linfática (DE CASTRO BARRETO, 2010). Neste contexto, estudos tem sugerido que a liberação de algumas citocinas, como por exemplo a IL-6, coopere com a sinalização de fatores de crescimento no microambiente da próstata para promover a tumorigênese e a progressão da malignidade (CULIG, 2011). Além disso, tem sido ressaltada a importância do TGF- β , IL-1, por exemplo, como possíveis biomarcadores prognósticos do CaP (TORREALBA et al., 2016)

Tendo em mente a importância dos mediadores inflamatórios, especialmente das citocinas, nos processos carcinogênicos, a investigação do perfil inflamatório sistêmico em pacientes acometidos por doenças prostáticas com alta incidência e prevalência, como o CaP e o HPB, corresponde a uma ferramenta para a distinção mais precisa dessas doenças, bem como auxilia no entendimento sobre seu desenvolvimento, prognóstico e alternativas para tratamentos mais adequados e cada vez menos invasivos.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Observando os métodos diagnósticos atuais e o papel intrínseco dos mediadores inflamatórios nos processos carcinogênicos, este trabalho dedica-se à investigação de possíveis biomarcadores que viabilizem a distinção da hiperplasia prostática benigna do câncer de próstata.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o perfil inflamatório de pacientes ambulatoriais e comparar os níveis séricos de um conjunto de 10 mediadores inflamatórios clássicos entre pacientes acometidos por câncer de próstata ou hiperplasia prostática benigna.

3. Materiais e Métodos

O desenho desta pesquisa corresponde a um estudo transversal que analisou pacientes masculinos com idade igual ou superior a 50 anos, atendidos consecutivamente no período de agosto de 2017 a julho de 2018 no Serviço Ambulatorial de Urologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB). Cada indivíduo foi submetido a protocolo clínico focado na caracterização de alteração prostática (CaP ou HPB), caso houvesse. Em paralelo à realização da avaliação urológica, foram analisados aspectos clínicos, bioquímicos, metabólicos, antropométricos e inflamatórios de cada paciente que não estava sob uso de medicações como 5- α redutase ou anti-inflamatórios.

3.1 Avaliação Urológica

O presente estudo contou inicialmente com uma investigação clínica geral sobre sinais e sintomas clássicos de alterações fisiológicas dos aparelhos excretor e reprodutor, como redução do jato urinário, sensação de esvaziamento incompleto da bexiga, intermitência ou esforço miccional, disúria, noctúria, sensação de repleção e hemospermia. Em seguida, foram avaliados os níveis total e livre de PSA seguido por uma análise da condição prostática de cada paciente por meio do exame do toque retal, com avaliação da consistência (fibroelástica, endurecida ou com nódulos), superfície (lisa ou irregular), contornos (nítidos ou imprecisos) e volume (normal ou aumentado), bem como a presença ou ausência do sulco mediano. Foram encaminhados para biópsia pacientes com presença de nódulos prostáticos detectados ao toque retal e/ou com níveis elevados de PSA ($> 4,0$ ng/mL), acompanhados ou não dos sinais e sintomas descritos.

Pacientes com resultado de biópsia indicativa de adenocarcinoma acinar e que não foram submetidos a procedimento prévio de prostatectomia radical compuseram o grupo CaP do estudo, onde as caracterizações desses casos foram determinadas através do Escore de Gleason.

À admissão no estudo, o sangue periférico foi obtido com obtenção do respectivo soro para realização das análises complementares para o presente estudo, com parcela de amostras biológicas congeladas a -80°C para análise do painel inflamatório.

3.2 Análises laboratoriais: testes clínicos e bioquímicos

As amostras biológicas coletadas foram processadas seguindo protocolos e instruções técnicas analíticas de rotina laboratorial. Foram analisados os perfis glicêmicos, lipêmicos, enzimáticos, metabólicos e inflamatórios de cada paciente.

Os níveis, em jejum, de glicose, colesterol total, triglicerídeos e HDL foram realizados através de testes colorimétricos, utilizando como automação o equipamento *HumanStar 600* da marca InVitro®. Através da técnica analítica de turbidimetria, os valores de PCR ultrasensível foram obtidos. Com o auxílio de corantes indicadores verde de bromocresol e reagente de Biureto, foram determinados os níveis de albumina e proteínas totais, respectivamente. Os valores de TGO (AST) e TGP (ALT) foram analisados pela técnica de automação *Reitman-Frankel*. As estimativas da filtração glomerular foram obtidas por meio da fórmula *Cockcroft-Gault*. Através do teste colorimétrico com reagente picrato alcalino, valores de creatinina foram determinados. Os níveis de LDL foram obtidos segundo a fórmula de *Friedewald*, por fim, o VLDL – c, foi obtido através do cálculo $VLDL = TG/5$, onde TG corresponde aos triglicerídeos. Além disso, a resistência à insulina foi quantificada através da avaliação do modelo de homeostase (HOMA).

O hemograma completo foi realizado por meio do sistema hematológico automatizado *CELL-DYN Ruby*®. A hemoglobina glicada foi obtida através da técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), enquanto níveis de insulina, vitamina D, homocisteína, TSH, T4 livre e de PSA total e livre foram obtidos por eletroquimioluminescência por meio do sistema *Cobas E411* da marca Roche®.

3.3 Perfil inflamatório

Ao que tange as avaliações bioquímicas, o sangue total foi colhido e o soro obtido foi mantido congelado a -80°C até descongelar para a avaliação dos mediadores imunológicos. As concentrações de citocinas foram avaliadas por um método de citometria de fluxo multiplexada usando dois conjuntos de imunoensaios à base de bead-based, conhecidos como kit humano Th1 / Th2 II e kit humano de inflamação, fabricado por BD Biosciences® (San Diego, CA, EUA), utilizados de acordo com os protocolos do fabricante e que, juntos, produziram medições para 9 mediadores circulantes diferentes, como: interferon- γ (IFN γ), interleucina-1 β (IL1 β), IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12.p70, tumor fator de necrose α (TNF α) e proteína C-reativa.

Resumidamente, os padrões de citocinas liofilizadas e as amostras de soro foram processadas e os resultados obtidos usando o citômetro de fluxo BD FACSVerser®, canal FL4. Trezentos eventos foram adquiridos para cada esfera de citocina utilizada. Os dados foram analisados no software FCAP, versão 3.0 (BD Biosciences®, San Diego, CA, EUA). As curvas padrão para cada citocina foram geradas usando uma mistura padrão de mediadores fornecidos. A concentração em cada soro foi determinada por interpolação a partir da curva padrão correspondente. Sempre que uma determinada citocina foi avaliada pelos dois kits, foi considerado o valor médio obtido.

A proteína C reativa foi avaliada usando o kit CRP Human Instant ELISA™, fabricado pela Invitrogen® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA EUA).

3.4 Análises estatísticas

Com o objetivo de avaliar a ocorrência de uma associação entre a linha de base, as características clínicas da amostra e a condição sob investigação, nossas análises estatísticas foram iniciadas pela comparação das características antropométricas e bioquímicas do potencial efeito de confusão no modelo principal.

A distribuição normal de todas as variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foi realizada uma comparação dos níveis de mediadores imunológicos entre os portadores de câncer de próstata e HPB. O teste t de Student e o teste de Mann-Whitney foram utilizados para comparação dos escores de tendência central dos dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente, com dados expressos em média \pm desvio padrão ou mediana com intervalos interquartis.

A associação entre características contínuas foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson. Para todas as análises, um $P < 0,05$ foi apresentado como limiar de significância estatística. Todas as análises foram realizadas com o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para Windows (versão 17.0).

4. Resultados

Um total de 182 pacientes com idade média de 66 anos foram identificados como portadores de CaP ou HPB após os procedimentos de diagnóstico médico. Reconhecida como uma das afecções prostáticas mais frequentes entre os homens longevos, HPB correspondeu à maior proporção ($n = 162$; 89%) dos pacientes com disfunção da glândula neste estudo quando comparados àqueles com CaP (Tabela 1). As características clínicas e bioquímicas observadas nos pacientes demonstraram uma elevada prevalência de distúrbios metabólicos independentemente da condição prostática, sendo ilustrado pelos valores médios para os índices lipêmicos e glicêmicos em patamar limítrofe ou suprafisiológico.

Níveis do PSA total e livre mostraram-se consistentemente elevados entre portadores de CaP quando comparados ao HPB (Tabela 1). Uma vez que no CaP, PSA encontra-se em sua maior parte complexado a α -1-quimiotripsina e α -2-macroglobulina, os índices da razão PSA livre/PSA total, como já esperado, foram superiores nos pacientes portadores de HPB (Tabela 1).

Nas condições de saúde apresentadas, uma análise exploratória de correlação entre os níveis de PSA (livre, total e razão) e os níveis dos mediadores inflamatórios constatou existência de uma sutil correlação positiva ($r = 0,16$) entre IL-2, mas não de outras citocinas, com valores séricos de PSA total (Tabela 2). Tendência semelhante foi observada com escores de PSA livre.

Com relação às condições prostáticas observadas pelo exame do toque retal em portadores de HPB, 18% ($n = 29$) apresentaram alterações de consistência. Entretanto, para os portadores de CaP, este exame demonstrou alteração prostática perceptível ao toque na maioria dos pacientes ($n = 19$; 95%), sendo a presença de nódulos e endurecimento os fenótipos mais frequentes (60% dos casos de CaP). O escore de Gleason foi determinado para os portadores de CaP, sendo o escore mais frequente ($n = 8$; 40%) aquele de grau intermediário 3 + 4, aqueles de baixo grau 3+3 corresponderam a 30% ($n=6$) e os de alto risco (Gleason ≥ 8) representaram 30% ($n = 6$) do total analisado.

Ao se comparar os níveis circulantes dos mediadores imunológicos conforme diagnóstico de CaP ou HPB, os valores séricos de IL-2 se mostraram três vezes superiores em termos medianos entre pacientes com CaP comparados a pacientes com HPB (Tabela 3).

Tabela 1. Características clínicas e bioquímicas do soro dos indivíduos de acordo com o diagnóstico de câncer de próstata (CaP) ou hiperplasia prostática benigna (HPB).

	HPB (n= 162)	CaP (n = 20)	<i>P</i> *
Idade, anos	67.5 ± 10.1	66.0 ± 11.5	0.533
Índice de massa corporal, kg/m ²	25.7 ± 4.3	26.2 ± 3.8	0.646
Glicose, mg/dl	101.4 ± 32.4	104.3 ± 24.2	0.696
HbA1c, %	5.8 ± 1.3	5.8 ± 1.1	0.985
Insulina, mU/mL	5.7 [2.8; 10.1]	7.8 [3.2; 9.2]	0.483†
HOMA	1.4 [0.6; 2.5]	1.8 [0.8; 2.3]	0.414†
Triglicérides, mg/dL	155.9 ± 115.2	141.9 ± 42.1	0.286
Colesterol Total, mg/dL	195.4 ± 47.5	204.2 ± 37.2	0.424
Colesterol VLDL, mg/dL	28.8 ± 16.2	28.4 ± 8.4	0.857
Colesterol LDL, mg/dL	112.4 ± 42.7	126.5 ± 35.2	0.158
Colesterol HDL, mg/dL	50.9 ± 12.9	49.4 ± 10.8	0.626
TGO, U/L	27.4 ± 12.2	27.3 ± 11.7	0.985
TGP, U/L	26.0 ± 14.7	25.6 ± 17.1	0.911
γGT, U/L	53.0 ± 44.0	56.0 ± 42.6	0.874
Creatinina, mg/dL	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.505
Proteína Total, g/dL	7.4 ± 0.4	7.2 ± 0.5	0.196
Albumina, g/dL	4.4 ± 0.4	4.2 ± 0.4	0.221
25-Hidroxi D3, nmol/L	31.5 ± 12.8	29.4 ± 10.2	0.485
PC-R, mg/L	1.10 ± 0.68	1.12 ± 0.77	0.949
TSH, mU/L	1.9 [1.2; 3.0]	1.8 [1.0; 3.2]	0.901†
PSA Total, ng/mL	2.4 [1.1; 5.2]	21.8 [10.5; 34.6]	<0.001†
PSA livre, ng/mL	0.4 [0.2; 0.8]	1.8 [0.5; 4.3]	<0.001†
Razão PSA livre/total, %	19.7 [13.0; 26.0]	8.0 [5.4; 16.1]	<0.001†

PC-R: proteína C reativa; HbA1c: hemoglobina glicada tipo A1c; HOMA: avaliação do modelo de homeostase; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa; TGO: transaminase glutâmico-oxaloacética sérica; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica sérica; γGT: gama-glutamil transferase; TSH: hormônio estimulador da tireóide; PSA: antígeno específico da próstata. Dados expressos dentro de cada grupo como média ± desvio padrão ou mediana com intervalos interquartis entre parênteses. * Valores de p para comparação de diferenças usando o teste t de Student, exceção para o uso do teste de Mann-Whitney † para dados não paramétricos.

Tabela 2. Análises de correlação dos níveis séricos do antígeno prostático específico (total e livre) e sua relação entre os níveis dos mediadores inflamatórios investigados nos 162 homens mais velhos na admissão.

	IFN γ	IL1 β	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	IL12	TNF
PSA Total, ng/mL	0.03; 0.740	-0.01; 0.894	0.16; 0.034 [#]	0.05; 0.554	0.02; 0.850	0.02; 0.790	0.02; 0.781	0.04; 0.595	0.04; 0.587
PSA Livre, ng/mL	0.03; 0.678	0.00; 0.989	0.13; 0.086	0.04; 0.660	0.00; 0.977	-0.01; 0.901	0.00; 0.987	0.02; 0.810	0.02; 0.752
Razão PSA Livre/ Total	0.05; 0.509	-0.02; 0.790	0.10; 0.217	0.10; 0.181	-0.02; 0.802	-0.04; 0.671	0.03; 0.734	0.09; 0.264	0.08; 0.301

Utilizado o teste de correlação de Pearson. Dados expressos em índice de correlação e nível de significância (dois dígitos r; três dígitos P). PCR: proteína C reativa; IFN: interferon; IL: interleucina. Limiar de significância fixado em $P \leq 0,05$. Sobrescrito ([#]) representa tamanho de efeito (d) = 0,16.

Tabela 3. Níveis circulantes de mediadores imunológicos de acordo com o diagnóstico de câncer de próstata (CaP) ou hiperplasia prostática benigna (HPB).

	CaP (n = 20)	HPB (n = 162)	<i>P</i> *
IFN γ , pg/mL	2.3 [0.7; 3.5]	2.1 [0.7; 3.3]	0.857
IL1 β , pg/mL	1.3 [0.3; 2.0]	1.0 [0.0; 2.1]	0.496
IL2, pg/mL	3.0 [0.0; 3.9]	0.0 [0.0; 3.3]	0.034
IL4, pg mL	2.7 [0.5; 4.1]	1.2 [0.4; 3.4]	0.213
IL6, pg/mL	5.0 [2.9; 11.4]	4.1 [2.4; 6.6]	0.355
IL8, pg/mL	14.7 [10.7; 35.0]	17.9 [10.4; 42.6]	0.810
IL10, pg/mL	1.9 [0.1; 2.3]	1.7 [0.0; 2.2]	0.356
IL12, pg/mL	2.0 [0.8; 2.4]	1.3 [0.2; 2.3]	0.122
TNF α , pg/mL	2.3 [0.7; 2.9]	1.5 [0.4; 2.2]	0.286

Interferon; IL: interleucina; TNF α : Fator de necrose tumoral α . Dados expressos dentro de cada grupo como mediana com intervalos interquartis entre parênteses. *Valores de *P* para comparações pelo teste de Mann-Whitney.

5. Discussão

As células neoplásicas e não neoplásicas são influenciadas pelo processo inflamatório que controla, delinea e remodela o tecido prostático. Em resposta à lesão tecidual, a inflamação é impulsionada por um mecanismo dinâmico de produção de fatores de crescimento, enzimas remodeladoras da matriz celular e citocinas, objetivando a reparação tecidual (COUSSENS; WERB, 2002).

Um estudo avaliou níveis de mediadores inflamatórios no plasma seminal de homens oligozoospermicos e detectou a presença da IL-2, sugerindo a próstata como local de origem desta citocina, ao menos sob condição fisiologicamente adversa (MATALLIOTAKIS et al.). Outro estudo comparou a expressão *in situ* de mediadores inflamatórios em diferentes doenças prostáticas e observou níveis de IL-2 mais elevados em casos de CaP quando comparados a HPB (Huang et al, 2018). Como PSA representa um antígeno órgão específico, alterações prostáticas por inflamação, hiperplasia ou neoplasia que culminam em lise celular justificariam o aumento da IL-2 associado ao PSA total, em linha com o resultado aqui encontrado.

Neste contexto, infiltrados inflamatórios em próstatas humanas são descritos na literatura e, embora sua origem ainda seja incerta, podem ser observados em lesões benignas e malignas (SCHILLACI et al., 2019). Macrófagos associados a tumores (TAMs) foram descritos como abundantes em infiltrados inflamatórios de tecidos neoplásicos (COUSSENS; WERB, 2002). Neste contexto, um papel dual importante dos TAMs é observado nas neoplasias pois podem tanto apresentar efeito citotóxico sobre células neoplásicas (mediado por IL-2, IL12 ou IFN) como também podem ser responsáveis pela produção de fatores de crescimento e proteases que contribuem para a progressão tumoral (COUSSENS; WERB, 2002).

Em meio a investigações para o tratamento do CaP, foi percebido que a IL-2 corresponde a um componente importante na resposta imunológica, visto que a partir de um cenário pró-inflamatório, macrófagos M1 liberaram IL-2, sinalizar uma resposta antitumoral (SOLÍS-MARTÍNEZ et al., 2015). Enquanto macrófagos do tipo M2 medeiam uma resposta anti-inflamatória, contribuindo para a progressão do tumor, macrófagos M1 parecem ser capazes de produzir e responder à IL-2 (DOERSCH; MOSES; ZIMMER, 2016). Ademais, IL2 promove diretamente a diferenciação dos linfócitos TCD8+ (MCNALLY et al., 2014), promovendo direcionamento seletivo para destruição de células tumorais. Dolman et al. demonstraram que infusão de IL-2 suprime crescimento e disseminação de metástases pulmonares e de medula óssea em camundongos gravemente imunosuprimidos, com provável envolvimento de TAMs na resposta promovida pelo mediador. A disponibilidade de IL-2

sugere ainda ausência de células T reguladores (Tregs CD4+CD25+Fox3p+) as quais são responsáveis por capturar/neutralizar IL2 circulante, e promover piores prognósticos de CaP (Treg) (SFANOS; DE MARZO, 2012).

Em linha com potenciais benefícios por produção endógena de IL-2, propostas terapêuticas empregam IL-2 em imunoterapia efetiva contra cânceres humanos (JIANG; ZHOU; REN, 2016). Regressões duradouras e completas de doenças metastáticas para melanoma e câncer renal foram observadas utilizando infusões de IL-2 (ROSENBERG, 2014), além de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* demonstrarem que IL2 conjugada a anticorpo monoclonal estimula citotoxicidade antitumoral mediada por linfócitos (SUGIMOTO et al., 2014).

Embora o desenho deste trabalho não permita estabelecer relação de causa e efeito e apresente limitações devido à ausência de quantificação e tipagem de macrófagos presentes na glândula prostática, este trabalho serve de base para novos estudos que investiguem imunoterapias associativas, especialmente que utilizem de IL-2 e/ou estimulem macrófagos M1 para demonstrar se esta(s) ativação(ões) associam-se ao confinamento do câncer ao órgão e a bons prognósticos.

6. Conclusão

Sendo assim, a partir dos resultados aqui apresentados, sugerimos que a elevação dos níveis circulantes da IL-2 em função de um mecanismo endógeno de defesa contra o câncer, orquestrados pela atividade de macrófagos M1, células citotóxicas ativadas em um ambiente pró-inflamatório, considerando que a progressão tumoral depende das condições do microambiente. Entretanto, a classificação da IL-2 como biomarcador para o CaP ainda é precoce, e depende de estudos que explorem a sensibilidade e a especificidade do marcador em um contexto clínico mais abrangente.

Referências Bibliográficas

- AARON, L.; FRANCO, O.; HAYWARD, S. W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of BPH. **Urol Clin North Am**, v. 43, n. 3, p. 279–288, 2016.
- BALK, S. P.; KO, Y. J.; BUBLEY, G. J. Biology of prostate-specific antigen. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 2, p. 383–391, 2003.
- BARTOLETTI, R. Chronic Inflammatory Infiltrate and Benign Prostatic Hyperplasia: What Do We Know? **European Urology Supplements**, v. 12, n. 5, p. 99–102, 2013.
- BRUM, I. S.; SPRITZER, P. M.; BRENTANI, M. M. Biologia molecular das neoplasias de próstata. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 5, p. 797–804, 2005.
- CAI, T. et al. Current Knowledge of the Potential Links between Inflammation and Prostate Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 20, p. 14, 2019.
- CHUGHTAI, B. et al. Benign prostatic hyperplasia. **Nature Publishing Group**, v. 2, p. 1–15, 2016.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. v. 420, n. December, 2002.
- CULIG, Z. Cytokine disbalance in common human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 2, p. 308–314, 2011.
- DE CASTRO BARRETO, R. O Duplo Papel Da Inflamação No Surgimento Das Lesões Cancerígenas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 107–114, 2010.
- DE CASTRO, H. A. S. et al. Contribution of PSA density in the prediction of prostate cancer in patients with PSA values between 2.6 and 10.0 ng/ml. **Radiologia Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 205–209, 2011.
- DESCAZEAUD, A. et al. Transforming growth factor β -receptor II protein expression in benign prostatic hyperplasia is associated with prostate volume and inflammation. **BJU International**, v. 108, n. 2 B, p. 23–28, 2011.

DOERSCH, K. M.; MOSES, K. A.; ZIMMER, W. E. Minireview Synergistic immunologic targets for the treatment of prostate cancer. p. 1900–1910, 2016.

ENGELHARDT, P. F. et al. Immunohistochemical expression of interleukin-2 receptor and interleukin-6 in patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: Association with asymptomatic inflammatory prostatitis NIH category IV. **Scandinavian Journal of Urology**, v. 49, n. 2, p. 120–126, 2015.

ESKRA, J. N. et al. Approaches to urinary detection of prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 22, n. 3, p. 362–381, 2019.

FUJITA, K. et al. Cytokine profiling of prostatic fluid from cancerous prostate glands identifies cytokines associated with extent of tumor and inflammation. **Prostate**, v. 68, n. 8, p. 872–882, 2008.

HUANG, TR, Wang, GC, Zhang, HM, Peng, B. Differential research of inflammatory and related mediators in BPH, histological prostatitis and PCa. **Andrologia**. 2018; 50:e12974. <https://doi.org/10.1111/and.12974>

INCA. **Programa Nacional do Controle do Câncer de Próstata**. [s.l: s.n.].

INCA. **Estimativa 2018 /Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. v. 1

JANSEN, F. H. et al. Prostate-Specific Antigen (PSA) Isoform p2PSA in Combination with Total PSA and Free PSA Improves Diagnostic Accuracy in Prostate Cancer Detection. **European Urology**, v. 57, n. 6, p. 921–927, 2010.

JIANG, T.; ZHOU, C.; REN, S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. **OncoImmunology**, v. 5, n. 6, p. 1–10, 2016.

LEE, G. T. et al. Dihydrotestosterone Increases Cytotoxic Activity of. v. 160, n. June, p. 2049–2060, 2019.

LLOYD, G. L. et al. Benign Prostatic Hyperplasia and Lower Urinary Tract Symptoms : What Is the Role and Significance of Inflammation ? p. 1–8, 2019.

MATALLIOTAKIS, I., Sifakis, S., Goumemou, A., Fragouli, Y., Neonaki, M., Matalliotakis, G. and Koumantakis, E. (1998) Cytokine levels in seminal plasma. **Clin. Exp. Obis. Gyn.** 25, 58-60.

MCNALLY, A. et al. Immunogenic , but Not Steady-State , Antigen Presentation Permits Regulatory T-Cells To Control CD8 + T-Cell Effector Differentiation by IL-2 Modulation. v. 9, n. 1, p. 1–9, 2014.

ORNISH, D. et al. Intensive Lifestyle Changes May Affect the Progression of Prostate Cancer. **The Journal of Urology**, v. 174, n. 3, p. 1065–1070, 2005.

PAREKH, M. H. et al. Pathophysiology, Epidemiology, and Natural History of Benign Prostatic Hyperplasia. **Journal of Urology**, v. 6, n. 1, p. 341–346, 2004.

PUTNAM, S. D. et al. Lifestyle and anthropometric risk factors for prostate cancer in a cohort of Iowa men. **Annals of Epidemiology**, v. 10, n. 6, p. 361–369, 2000.

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. v. 10, n. 2, p. 63–89, 2019.

REIS, R. B.; CASSINI, M. F. Antígeno Prostático Específico (PSA). **Urologia Fundamental**, p. 190–194, 2010.

ROSENBERG, S. A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 12, p. 5451–5458, 2014.

SCHILLACI, O. et al. Prostate cancer and in fl ammation : A new molecular imaging challenge in the era of personalized medicine ☆. v. 69, p. 66–79, 2019.

SFANOS, K. S. et al. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. **Nature Reviews Urology**, v. 15, n. 1, p. 11–24, 2018.

SFANOS, K. S.; DE MARZO, A. M. Prostate cancer and inflammation: The evidence. **Histopathology**, v. 60, n. 1, p. 199–215, 2012.

SOLÍS-MARTÍNEZ, R. et al. Macrófagos asociados a tumores contribuyen a la progresión del cáncer de próstata. **Gaceta Mexicana de Oncología**, n. xx, p. 1–6, 2015.

STARKE, T.; LIVAS, L.; KYPRIANOU, N. Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. **Translational andrology and urology**, v. 4, n. 4, p. 455–63, 2015.

SUGIMOTO, Y. et al. The Therapeutic Potential of a Novel PSMA Antibody and its IL-2 Conjugate in Prostate Cancer. v. 98, p. 89–97, 2014.

TORREALBA, N. et al. Cytokine Expression of several cytokines in prostate cancer : Correlation with clinical variables of patients . Relationship with biochemical progression of the malignance. **Cytokine**, 2016.

ANEXO I

22/02/2020

Hindawi Manuscript Tracking System



Thank You for Submitting Your Manuscript

Your manuscript has been successfully submitted to “Journal of Aging Research” and assigned the manuscript number [1517260](#).

An acknowledgement email will be sent to gleicianegontijo@gmail.com, william.khalil.chaer@gmail.com, adrianedallanora@gmail.com, ac.tonet@uol.com, claytonf@ucb.br, otnobrega@gmail.com when our system has finished processing the submission. At that point, you will be able to track the status of your submission. Please note, this may take a few minutes.

Click [here](#) to return to your account in the Manuscript Tracking System.

ANEXO II



Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP)

Durante o período do mestrado, fui agraciada com a oportunidade de participar do *Emerging Leaders in the Americas Program* (ELAP), uma iniciativa canadense que visa facilitar, por meio de colaborações institucionais e acordos de intercâmbio, a mobilidade acadêmica de estudantes entre instituições, faculdades e universidades canadenses e latino-americanas ou do Caribe. Desempenhando atividades em tempo integral como *Research Trainee* na Faculdade de Medicina da Universidade *McGill*, em sua unidade acadêmica dedicada a pesquisa gerontológica (*McGill University Research Centre for Studies in Aging - MCSA*), sob supervisão do Dr. Pedro Rosa Neto, permaneci na cidade de Montréal durante o período de outubro de 2019 a março de 2020. Como uma das atribuições, foram desenvolvidas atividades de apoio ao uso de imagens por ressonância magnética (MRI) e tomografia por emissão de positrões (PET SCAN) para observação da atividade cerebral de pacientes e animais, com ênfase sobre a progressão da neuroinflamação e da formação de agregados da proteína tau em casos de neurodegeneração, especialmente nas doenças de Alzheimer e Parkinson. Além disso, tive a oportunidade de participar de *workshops*, *meetings* e *presentations* e também de participar do trabalho de validação de um protocolo para o estudo de privação de sono em modelo animal (ratos) que objetiva observar a concentração de proteínas tau, β -amilóide e a densidade sináptica a fim de constatar a influência do sono no desenvolvimento de demências. Uma vez que o grupo de pesquisa do qual participo no Brasil também se dedica a estudar demências, a oportunidade de passar um curto período como pesquisadora na universidade McGill contribuiu grandiosamente para o meu desenvolvimento pessoal e enriqueceu meu repertório acadêmico, viabilizando novos horizontes para o desenvolvimento de novas pesquisas.