

**MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE
PRÓSTATA EVIDENCIADOS PELA ANÁLISE
DE ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE
CÓPIAS GENÔMICAS (aCGH)**

LÍVIA NARDI

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do Título de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Silvia Regina Rogatto

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Nardi, Livia

Marcadores moleculares no câncer de próstata evidenciados pela análise de alterações no número de cópias genômicas (aCGH) / Livia Nardi – São Paulo, 2010.

154p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Descritores: 1. CÂNCER DA PRÓSTATA. 2. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 3. EXPRESSÃO GÊNICA. 4. MARCADORES DE TUMOR.

DEDICATÓRIA



DEDICATÓRIA

A minha querida família... Aginaldo, Beatriz e Renata, pelo
amor e paciência em todos momentos!!!

Ao meu querido marido,
Rodrigo pelo amor e carinho...

AGRADECIMENTOS



AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me deu força e me fez saber que tudo posso naquele que me fortalece

Aos **meus pais**, pelo grande amor que construímos a cada desafio conquistado, sem vocês nada seria possível, amo muito vocês...

A **minha irmã**, pelo novo mundo que descobri ao seu lado... você faz parte dessa conquista, te amo!!!!!!!!!!

Ao **meu amor**, pelo amor incondicional durante toda essa caminhada... Por acreditar e me apoiar em todas novas etapas desta fase... Pela força e coragem em todos momentos difíceis... Pela grande amizade e companheirismo... por toda nossa vida!!!!!!!!!! Te amo...

A **minha grande família (avós, tios e primos)**, pelas alegrias e boas energias que vocês trazem para minha vida...

A **Dr^a Silvia**, pela oportunidade em me apresentar o mundo da pesquisa

As **pós-doutorandas Dr^a Sandra, Dr^a Renee e Dr^a Maria**, por toda dedicação pela equipe e principalmente ao meu trabalho

Ao **Dr Francisco Fonseca**, por todos ensinamentos compartilhados, pela orientação e dedicação na elaboração do banco de dados.

Ao **Dr Fernando Soares e a equipe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo**, pela colaboração na elaboração das plataformas de tissue microarray e toda dedicação nas atividades desempenhadas

As **minhas queridas amigas bauruenses (Kamila, Luciana, Mariana e Tatiana)**, pelo companheirismo e carinho nos momentos de desabafos e angústias

As **minhas queridas amigas paulistanas (Juliana, Roberta e Sandra)**, pela nova amizade que nasceu em meio desta caminhada, que todos momentos de alegria e amizade permaneçam por toda vida

Aos colegas da equipe Neogene, André, Arianne, Cássia, Déborah, Fábio, Fernanda, Francine, Graziela, Hellen, Juan, Julia, Luciana, Matheus, Priscila, Renata, Rogério e Sara, pelas novas descobertas profissionais e pessoais, pela colaboração em todos momentos de angústia, pelos desabafos durante os momentos de descontração e principalmente pelos momentos de alegria e companheirismo que vivemos durante estes anos, que vocês sejam muito felizes...Obrigada!!!!

Aos ex-colegas Neogene, (Elaine, Fabíola, Flávia, Miriam, Renata e Rodrigo), que deixaram grandes lembranças na memória espero que estejam felizes

Aos funcionários do laboratório de imunoistoquímica do Hospital A. C. Camargo Carlinhos, Ivan, Suely e Severino, pela perfeição em todas atividades desempenhadas para este trabalho

Aos funcionários do arquivo do Hospital A.C. Camargo Glauber, Humberto e Fábio, pela colaboração na elaboração das plataformas de tissue microarray

A toda equipe da Pós Graduação e Biblioteca do Hospital A.C. Camargo

Ao SAME e o PINGA, por organizarem as informações necessárias de forma clara e eficiente

RESUMO



RESUMO

Nardi L. **Marcadores moleculares no câncer de próstata evidenciados pela análise de alterações no número de cópias genômicas (aCGH)**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

O adenocarcinoma de próstata é extremamente comum em países do Ocidente, representando a segunda causa de câncer em homens americanos. A recente aplicação de metodologias moleculares no estudo do cancer de próstata tem resultado na identificação de alterações somáticas e germinativas associadas a fatores de risco da doença. Neste estudo foram avaliados 10 genes (*c-MYC*, *NKX3.1*, *SRF*, *SRC*, *TIMP3*, *NCOA1*, *DAB2*, *1*, *ATF1*, *ETV6* e *ICAM*) candidatos a marcadores moleculares no carcinoma de próstata selecionados a partir de resultados preliminares (HR-CGH e CGHarray) e da pesquisa em redes biológicas. A expressão dos transcritos *c-MYC*, *NKX3.1*, *SRF* e *SRC* foi realizada por RT-PCR quantitativa em tempo real em 95 carcinomas de próstata (CaP), 9 tecidos adjacentes (TecAdj) em comparação com duas amostras de próstata normal (N). Foi observado aumento de expressão do gene *c-MYC* em 87% dos CaP e 78% dos TecAdj, enquanto para o supressor *NKX3.1*, 34% dos CaP apresentaram níveis reduzidos dos transcritos. A maioria dos casos apresentou níveis normais dos transcritos *SRF* e *SRC*. A expressão das proteínas *c-MYC*, *NKX3.1*, *SRF*, *SRC*, *TIMP3*, *NCOA1*, *DAB2*, *ATF1*, *ETV6* e *ICAM1* foi avaliada por imunoistoquímica em duas plataformas de microarranjos de tecidos contendo 195 CaP, 23 hiperplasias prostáticas benignas (HPB), 9 TecAdj e 1N. Destes, 62 CaP, 9 TecAdj e 2N foram analisados pelas duas técnicas. Confirmando os resultados da expressão gênica, aumento dos níveis protéicos de cMYC e diminuição de NKX3.1 foram detectados nos CaP. Níveis mais altos de cMYC detectados por análise gênica e proteica foram associados com tumores com características de menor agressividade. Houve correlação entre os níveis de transcritos e da proteína c-MYC e NKX3.1 em 83% e 70% dos CaP, respectivamente. Não houve diferença significativa entre a expressão protéica de SRF nos tecidos prostáticos avaliados. Para as proteínas ligadas ao SRF,

TIMP3 e NCOA1, foi observado diminuição de expressão de TIMP3 em 45% dos CaP, 83% das HPBs e 78% dos TecAdj em relação ao padrão da próstata normal. Houve associação significativa entre expressão diminuída de TIMP3 e maior escore de Gleason. Os CaP e HPB apresentaram níveis aumentados de NCOA1 em relação ao TecAdj e próstata normal. O aumento de NCOA1 se mostrou um fator prognóstico independente para recidiva bioquímica ($P=0,010$; $HR=2,271$, $IC95\%=1,212-4,257$). A proteína SRC mostrou imunomarcacão citoplasmática no epitélio glandular e no estroma de todos os tecidos avaliados. Observou-se aumento de expressão protéica no epitélio de CaP, HPB e TecAdj em relação a próstata normal, sendo que os tumores apresentaram níveis significativamente mais baixos da proteína. Em relação ao componente estromal, os tumores apresentaram níveis significativamente menores que os tecidos não neoplásicos tanto para análise de intensidade quanto de extensão de marcação. Associação significativa entre diminuição da intensidade de SRC no estroma tumoral e recidiva bioquímica foi detectada. Resultado este confirmado na análise de extensão de imunomarcacão no estroma. Níveis mais baixos de SRC no componente estromal foram associados com altos valores de PSA ($>10\text{ng/mL}$). Em relação aos genes ligados ao SRC, diminuição da expressão DAB2 e ETV6 nos CaP em relação aos demais tecidos. A proteína ATF1 apresentou aumento de expressão em 92% dos CaP e 100% das HPB em relação a próstata normal. Na maioria das amostras estudadas, a imunomarcacão de ICAM1 foi semelhante a da próstata normal, não sendo observada associação significativa para os parâmetros clínicos e histológicos testados. Frente aos resultados obtidos podemos concluir que c-MYC, NKX3.1, SRF, SRC, DAB2 e ATF1 tem papel importante nas doenças proliferativas prostáticas, uma vez que se mostraram alterados em CaP e HPB. Por outro lado, TIMP3 e ETV6 foram diferencialmente expressos entre CaP e HPB, sugerindo que estas proteínas tenham um papel importante na carcinogênese prostática. Em conclusão, a expressão protéica aumentada de NCOA1 no epitélio tumoral e a diminuição de intensidade da imunomarcacão de SRC no componente estromal do mostraram-se como marcadores de pior prognóstico em CaP.

SUMMARY



SUMMARY

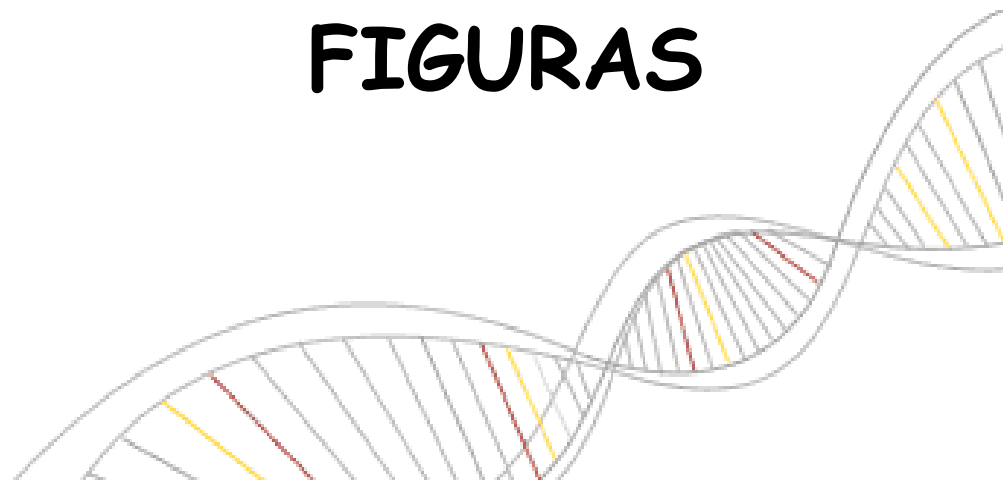
Nardi L. [**Molecular markers detected for copy number alterations by aCGH (arrays-Comparative Genomic Hybridization) in prostate carcinoma**]. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Prostatic adenocarcinoma is extremely common in Western nations, representing the second leading cause of cancer death in American men. The recent application of molecular approaches to the study of prostate cancer has resulted in a rapid increase in the identification of somatic genome alterations and germline heritable risk factors in this disease. This study aimed to evaluate 10 candidate genes (*c-MYC*, *NKX3.1*, *SRF*, *SRC*, *TIMP3*, *NCOA1*, *DAB2*, *ATF1*, *ETV6* and *ICAM1*) in prostate carcinoma selected from previous study (HR-CGH and CGH-array) and biological network analysis (Unified Human Interactome). *c-MYC*, *NKX3.1*, *SRF* and *SRC* mRNA levels were evaluated by quantitative real time RT-PCR in 95 PCa and 9 adjacent non-neoplastic tissues (Adj) in comparison with two normal (N) prostate tissues from necropsies. High levels of *cMYC* oncogene were detected in 87% of PCa and 78% of Adj, while reduced transcript levels of *NKX3.1* suppressor gene were observed in 34% of PCa. Normal mRNA levels of *SRF* and *SRC* were detected in the majority of prostate tissues evaluated. Protein levels of c-MYC, NKX3.1, SRF, SRC, TIMP3, NCOA1, DAB2, ICAM1, ATF1 and ETV6 were assessed by immunohistochemistry in two tissue microarrays platforms presenting 195 PCa, 23 benign prostate hyperplasias (BPH), 9 Adj and 1N. Paired samples from 62 PCa, 9 Adj and 2N were evaluated by both procedures. In agreement with mRNA findings, high levels of c-MYC and low levels of NKX3.1 were detected in PCa. Higher c-MYC transcript and

protein levels were detected in more aggressive tumors. Positive correlation was observed for c-MYC transcript and protein levels as well as NKX3.1 in 83% and 70% of PCa, respectively. None statistical difference was observed between SRF protein levels and the prostate tissues evaluated. TIMP3 and NCOA1, associated with SRF pathways, were also evaluated. Lower levels of TIMP3 were detected in 45% of PCa, 83% of BHP and 78% of Adj in comparison with N. In addition, was found significant association between reduced TIMP-3 levels and high Gleason score. Higher levels of NCOA1 were detected in PCa and BHP compared with N and Adj. Furthermore, overexpression of NCOA1 in tumor samples was detected as an independent prognostic marker for biochemical recurrence ($P=0,010$; $HR=2,271$, $IC95\%=1,212-4,257$). SRC protein expression analysis showed cytoplasmic immostaining both in glandular epithelium and stromal cells in all prostate tissues analyzed. PCa, BPH and Adj showed SRC overexpression in epithelium cells in comparison with normal prostate patterns, which presented lower levels in PCa. Stromal cells showed significant lower levels in PCa compared with Adj, in both intensity and extension of immunostaining. Significant association between low intensity immunostaining in stromal cells and biochemical recurrence was detected. The immunostaining extension in PCa confirmed these data. Lower levels of SRC in stromal cells were associated with higher PSA levels ($>10ng/mL$). In relation to genes connected to SRF pathways, reduced expression of DAB2 and ETV6 were detected in PCa compared with BPH and Adj. Higher expression levels of ATF-1 protein was detected in 92% of PCa and 100% of BPH compared with N. In the majority of samples studied, the immunostaining of ICAM-1 was similar to the normal prostate. Towards the obtained results, we can conclude that, c-MYC,

NKX3.1, SRF, SRC, DAB2 and ATF1 may play a role in prostatic proliferative disorders, since they are altered in PCa and in BPH. In contrast, TIMP3 and ETV6 were differentially expressed between PCa and BPH, suggesting that these proteins can be involved in prostatic carcinogenesis. Higher NCOA1 expression levels in PCa epithelium and lower SRC immunostaining in tumor stromal cells were demonstrated as worse prognostic markers in prostate tumors.

LISTA DE FIGURAS



LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Análise de redes biológicas, indicando os genes candidatos envolvidos no câncer de próstata após a análise dos genes significantes envolvidos em CaP por CGH-array.....	32
Figura 2	Curvas de amplificação e dissociação para os genes alvo <i>c-MYC</i> (A), <i>NKX3.1</i> (B), <i>SRF</i> (C), <i>SRC</i> (D) e para o gene de referência <i>HPRT</i> (E).....	47
Figura 3	Níveis de transcritos do gene <i>c-MYC</i> em amostras de tumores de próstata (CaP), tecidos adjacentes não-neoplásicos (TecAdj) e próstatas normais (Normal).....	48
Figura 4	Níveis de expressão do transcrito <i>c-MYC</i> nos tumores de próstata em relação.....	50
Figura 5	Imunomarcacão nuclear da proteína <i>c-MYC</i>	52
Figura 6	Comparação entre os níveis de expressão gênica e proteica de <i>c-MYC</i> nos tumores de próstata (A) e tecidos adjacentes (TecAdj) não neoplásicos (B).....	55
Figura 7	Níveis de transcritos do gene <i>NKX3.1</i> em amostras de tumores de próstata (CaP) e tecidos adjacentes não-neoplásicos (TecAdj). Não foi observada diferença significativa entre os níveis de transcritos detectados nos dois grupos CaP e TecAdj ($P=0,133$, teste de Mann-Whitney).....	56
Figura 8	Análise dos níveis de expressão gênica de <i>NKX3.1</i> em tumores de próstata em relação à história familiar (positiva versus negativa) ($P=0,027$, teste de Mann-Whitney).....	57

Figura 9	Imunomarcção nuclear da proteína NKX3.1.....	59
Figura 10	Comparação entre os níveis de expressão gênica e da proteína NKX3.1 nos tumores de próstata.....	62
Figura 11	Níveis de transcritos do gene <i>SRF</i> em amostras de tumores de próstata (CaP), tecidos adjacentes não-neoplásicos (TecAdj) e tecidos normais (Normal).....	63
Figura 12	Níveis de expressão do gene <i>SRF</i> em tumores de próstata em relação.....	64
Figura 13	Imunomarcção citoplasmática da proteína SRF.....	66
Figura 14	Imunomarcção citoplasmática da proteína TIMP3.....	71
Figura 15	Imunomarcção citoplasmática da proteína NCOA1.....	71
Figura 16	Sobrevida livre de recorrência bioquímica (SLRB) de acordo com a expressão proteica de NCOA1 em carcinomas de próstata.....	74
Figura 17	Níveis de transcritos <i>SRC</i> em amostras de tumores de próstata (CaP), tecidos adjacentes não-neoplásicos (TecAdj) e tecidos normais (N).....	75
Figura 18	Imunomarcção citoplasmática e estromal da proteína SRC.....	78
Figura 19	Análise comparativa entre a expressão gênica e proteica de SRC nos tecidos tumorais e tecidos adjacentes não neoplásicos.....	83
Figura 20	Imunomarcção da membrana da proteína DAB2.....	86
Figura 21	Imunomarcção nuclear da proteína ATF1.....	86

Figura 22	Imunomarcação nuclear da extensão da proteína ETV6.....	87
Figura 23	Imunomarcação da membrana da proteína ICAM1.....	87

LISTA DE TABELAS



LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos genes associados aos genes centrais <i>SRF</i> e <i>SRC</i> após análises de redes biológicas em tumores de próstata, incluindo o a referência do clone.....	22
Tabela 2	Caracterização clínica, dados de seguimento dos pacientes cujas amostras foram utilizadas no estudo e características histopatológica das amostras de CaP.....	28
Tabela 3	Alterações genômicas (perda ou ganho de seqüência) detectadas por CGH cromossômico de alta resolução (HR-CGH) e/ou CGH-array e os genes candidatos selecionados para o presente estudo....	31
Tabela 4	Seqüências de bases dos iniciadores utilizados nas qRT-PCR em tempo real dos genes <i>NKX3.1</i> , <i>c-MYC</i> , <i>SRC</i> , <i>SRF</i> e o gene endógeno <i>HPRT</i>	36
Tabela 5	Relação dos anticorpos primários utilizados na reação de imunoistoquímica, marca, clone, tecido utilizado como controle positivo, padronização da técnica e tipo de avaliação dos resultados.....	41
Tabela 6	Critérios considerados na análise de risco segundo características clínicas e morfológicas.....	42
Tabela 7	Resultados da análise da expressão protéica de c-MYC (nuclear) detectada pela técnica de imunoistoquímica em carcinomas de próstata (CaP), tecidos prostáticos não neoplásicos adjacentes (Tec Adj) e hiperplasias prostáticas benignas (HPB) avaliada pela intensidade de marcação nos tecidos.....	52

Tabela 8	Comparação entre a intensidade de marcação nuclear de c-MYC detectada por imunoistoquímica (IHQ) nos carcinomas de próstata (CaP) e as variáveis clínico-histopatológicas.....	53
Tabela 9	Expressão de NKX3.1 (nuclear) detectada pela técnica de Imunoistoquímica (IHQ), em carcinomas de próstata (CaP), tecidos adjacentes prostáticos não neoplásicos (Tec Adj) e hiperplasias prostáticas benignas (HPB) de acordo com a intensidade de marcação nuclear.....	59
Tabela 10	Resultados da comparação entre os dados clínico-histopatológicos e da expressão da proteína NKX3.1 segundo a intensidade de marcação nuclear por imunoistoquímica (IHQ) nos carcinomas de próstata (CaP).....	60
Tabela 11	Expressão protéica de SRF detectada pela técnica de imunoistoquímica (IHQ), em carcinomas de próstata (CaP), tecidos adjacentes prostáticos não neoplásicos (Tec Adj) e hiperplasias prostáticas benignas (HPB) de acordo com a intensidade de marcação.....	66
Tabela 12	Associação dos achados clínico-histopatológicos com a intensidade de marcação citoplasmática de SRF, detectados por imunoistoquímica (IHQ) nos carcinomas de próstata (CaP).....	67
Tabela 13	Expressão protéica de TIMP3 e NCOA1 (genes ligados à via do SRF) detectada pela técnica de imunoistoquímica em carcinomas de próstata (CaP), tecidos adjacentes prostáticos não neoplásicos (Tec Adj) e hiperplasias benignas prostáticas (HPB) de acordo com a intensidade de marcação citoplasmática.....	72

Tabela 14	Resultados da associação dos achados clinico-histopatológicos com a intensidade de marcação citoplasmática dos genes TIMP3 e NCOA1 (ligados a via do SRF), detectados por imunoistoquímica nos carcinomas de próstata (CaP).....	72
Tabela 15	Análise multivariada para sobrevida livre de recorrência bioquímica (SLRB) em pacientes com carcinoma de próstata (n=184).....	74
Tabela 16	Expressão protéica de SRC no componente epitelial e estromal detectada por imunoistoquímica (IHQ), em carcinomas de próstata (CaP), tecidos adjacentes prostáticos não neoplásicos (Tec Adj) e hiperplasias benignas prostáticas (HPB) de acordo com a intensidade de marcação.....	78
Tabela 17	Associação dos dados clinico-histopatológicos com a intensidade de marcação citoplasmática (componente epitelial) e a intensidade e extensão do estroma (componente estromal) de SRC detectados por imunoistoquímica nos carcinomas de próstata (CaP).....	79
Tabela 18	Expressão das proteínas DAB2, ATF1, ICAM1 e ETV6 (genes ligados à via do SRC) detectada pela técnica de imunoistoquímica em carcinomas de próstata (CaP), tecidos adjacentes prostáticos não neoplásicos (Tec Adj) e hiperplasias benignas prostáticas (HPB) de acordo com a intensidade de marcação.....	88
Tabela 19	Associação dos achados clinico-histopatológicos com os padrões de marcação dos genes ligados a via do SRC (DAB2 e ATF1), detectados por imunoistoquímica nos carcinomas de próstata (CaP).....	89

Tabela 20 Associação dos achados clinico-histopatológicos com os padrões de marcação dos genes ligados a via do SRC (ETV6 e ICAM1), detectados por imunoistoquímica nos carcinomas de próstata (CaP)..... 91

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS



LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Genes*

APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
AR	<i>androgen receptor</i>
ATF1	<i>activating transcription factor 1</i>
ATFB1	<i>atrial fibrillation, familial 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer 2</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
CAPZB	<i>mitochondrial ribosomal protein L20</i>
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
c-MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
COX-2	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
CREB	<i>CREB binding protein</i>
DAB2	<i>disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein</i>
EPAC2	<i>rap guanine nucleotide exchange factor 4</i>
EGR	<i>early growth response</i>
ELAC2	<i>elaC homolog 2</i>
ETV6	<i>ETS variant 6</i>
EWSR1	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>
FAT	<i>FAT tumor suppressor homolog</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
HER2	<i>2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog</i>
HPC1	<i>hereditary prostate cancer 1</i>
HPRT	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
KLF5	<i>kruppel-like factor 5</i>
MTA1	<i>metastasis associated 1</i>
MSR1	<i>macrophage scavenger receptor 1</i>
MYBL2	<i>v-myb myeloblastos viral oncogene homolog (avian)-like 2</i>
NCOA1	<i>nuclear receptor coactivator 1</i>
NKX3.1	<i>NK3 homeobox 1</i>

RAB5A	<i>member RAS oncogene family</i>
RB1	<i>retinoblastoma 1</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RNASEL	<i>ribonuclease L</i>
VDR	<i>vitamin D receptor</i>
SRC	<i>v-src sarcoma viral oncogene homolog</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
SRD5A2	<i>steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2</i>
TIMP3	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 3</i>
TMPRSS2	<i>transmembrane protease, serine 2</i>
TP16	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
TP27	<i>2-oxoglutarate/malate transporter</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
PAI1	<i>serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1</i>
PON1	<i>paraoxonase 1</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PSCA	<i>prostate stem cell antigen</i>

Metodologias*

CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
DAPI	<i>4'-6-Diamidino-2-phenylindole</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
GWASs	<i>Genome wide association study</i>
HE	<i>Hematoxylin-eosin</i>
HiMAP	<i>Human Interactome Map</i>
HR-CGH	<i>hibridação gênômica comparativa de alta resolução</i>
IHQ	<i>imunoistoquímica</i>
ISCN	<i>Internacional Software Consulting Network</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PBS	<i>fosfatate buffer saline</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
TMA	<i>Tissue microarrays</i>
UNIHI	<i>Unified Human Interactome</i>

Geral:

CaP	câncer de próstata
HPB	hiperplasia prostática benigna
PIN	neoplasia intraepitelial prostática
PSA	antígeno prostático específico
USTR	ultrasom transrretal
SLD	sobrevida livre de doença
SVO	serviço de verificação de óbitos
Tec Adj	tecido adjacente não neoplásico
TNM	estádio clínico
EDR	exame digital retal

** em inglês*

ÍNDICE



ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Mecanismo de Progressão da Doença	6
1.2	Alterações Moleculares Associadas ao Câncer de Próstata	7
1.3	Genes associados ao Câncer de Próstata	11
1.4	Análise de Alterações Genômicas em Carcinomas de Próstata de Pacientes Brasileiros	13
2	OBJETIVOS	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Caracterização das amostras	26
3.2	Crterios de seleção dos genes candidatos	29
3.3	Processamento do tecido	33
3.4	RT-PCR Quantitativa em Tempo Real	33
3.5	Elaborao da plataforma de microarranjos de tecidos (TMA)	37
3.6	Análise da expressão protéica por imunoistoquímica (IHQ) em microarranjos de tecidos	38
3.7	Análise dos resultados	42
3.8	Análise estatística	43
4	RESULTADOS	45
5	DISCUSSÃO	93
6	CONCLUSÃO	119
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

ANEXOS

Anexo 1 Tabela das características clínicas e histopatológicas dos pacientes com carcinomas de próstata (CaP) e tecido adjacente (Tec Adj) não neoplásico

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

O Câncer de Próstata (CaP) é a segunda causa de óbito por câncer no Brasil. Estima-se 52350 novos casos para o ano de 2010, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (Ministério da Saúde 2010). Além disso, é o câncer mais comum em homens, após o de pele não melanoma, representando aproximadamente 10% de todas as neoplasias diagnosticadas na população masculina. Em 2009, aproximadamente 192 mil homens foram diagnosticados com CaP nos Estados Unidos, sendo esperado que 27 mil morrerão pela doença (JEMAL et al. 2009).

Os fatores de risco ao CaP incluem idade avançada, etnia afro-americana, história familiar e dieta. Dentre estes, o fator mais relevante para o desenvolvimento do CaP é a história familiar positiva (ALBERTI 2010). Os níveis séricos do antígeno prostático específico (PSA) permitem o diagnóstico precoce da doença (MACKINNON al. 2009). Com o avanço nas técnicas diagnósticas e exames de rotina, atualmente é comum o diagnóstico de pacientes com CaP assintomático e o aumento na sobrevida (BORLEY e FENELEY 2009).

O CaP tem sido frequentemente associado à herança de genes de alta penetrância e/ou correlacionado com polimorfismos em genes de baixa penetrância (DAMBER e AUS 2008). Semelhante aos estudos realizados em outros tipos de cânceres hereditários, como colorretal e câncer de mama, o CaP hereditário foi associado principalmente a alelos raros presentes em genes de alta penetrância (SMITH et al. 1996). Os genes associados ao câncer de próstata hereditário incluem *EPAC2*, *RNASEL*, *MSR1*, *CHECK2*, *CAPZB*, receptor da vitamina D e *PONI*

(DEUTSCH et al. 2004; DONG et al. 2006; ALBERTI 2010). Em adição, mutação na linhagem germinativa do *BRCA2* parece aumentar o risco de CaP e ser responsável por aproximadamente 5% dos casos de câncer em homens com idade inferior a 55 anos (EDWARDS e EELES 2004).

Com o passar dos anos, a conduta clínica de pacientes com CaP apresentou modificações notáveis. Estas alterações se devem ao aumento do percentual de homens diagnosticados com idade inferior a 70 anos, assim como a proporção elevada de tumores moderadamente diferenciados (METTLIN et al. 1996).

Os métodos de diagnóstico dos tumores prostáticos baseiam-se no exame digital retal (EDR) ou toque retal e na dosagem sérica dos níveis de PSA. O TR é um exame rápido, de baixo custo e fácil realização. Por este procedimento é possível reconhecer as dimensões, o formato, os limites do órgão, alterações de consistência e mobilidade, tornando-o assim essencial na decisão da conduta, tanto no aspecto propedêutico quanto terapêutico (Sociedade Brasileira de Urologia – SBU 2005).

Embora a dosagem do PSA seja de grande importância para a identificação do câncer de próstata, este teste não é um método diagnóstico com especificidade e sensibilidade suficientemente elevadas para dispensar o exame físico. Desde a sua descoberta em 1970 (ABLIN et al. 1970), a análise de rotina do PSA tornou-se uma das principais ferramentas na detecção do câncer de próstata. A avaliação dos níveis séricos de PSA, quando utilizado valor referência até 4,0 ng/mL, tem se mostrado eficiente na detecção da doença. Nesta fase a prostatectomia radical está associada a um alto potencial de cura.

Ensaios de triagem mostraram que homens com PSA sérico menor que 1ng/mL podem repetir a mensuração de PSA a cada três anos (AUS et al. 2005).

Entretanto, segundo dados da Sociedade Brasileira de Urologia (2008), estes valores podem ser contraditórios uma vez que a dosagem do PSA isoladamente permite o diagnóstico de apenas 25% a 65% de todos os tumores prostáticos.

Outras ferramentas que podem auxiliar na escolha da conduta clínica, incluem a análise do PSA ajustado para a idade, a velocidade e a densidade do PSA e a relação entre o PSA total e livre (STENMAN et al. 1991; CARTER et al. 1992; OESTERELING 1995; MONCHTAR 2003; VISSCHERE et al. 2010). Outros estudos indicam que os níveis de PSA podem ser usados na estratificação de risco do câncer de próstata (ITO et al. 2003; ZHENG et al. 2009).

O nível sérico do PSA, associado ao exame de toque retal, continua sendo a principal ferramenta para detecção precoce dos tumores prostáticos. Em contrapartida, o diagnóstico depende da biópsia prostática realizada com o auxílio da ultra-sonografia transretal. Por este método são obtidas informações anatomopatológicas importantes, como a graduação de Gleason. Nos casos submetidos ao tratamento por prostatectomia radical, o prognóstico pode ser mais refinado pelo uso de estadiamento e grau patológico (LAPOINTE et al. 2004).

O TNM, sistema utilizado para a classificação de tumores malignos segundo a União Internacional Contra o Câncer (UICC), é aplicado apenas para os adenocarcinomas. A categoria **T** considera a extensão do tumor primário, **N** refere-se à ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais, e **M** a ausência ou presença de metástase à distância (EPSTEIN et al. 2005). O escore de Gleason é considerado o melhor sistema para classificar estes tumores, porque a maioria expressa mais de um padrão histológico glandular (GLEASON 1992). O sistema de Gleason descreve um escore entre 2 e 10, iniciando-se com 2 para menor

agressividade e 10 para maior agressividade. O escore baseia-se na soma de dois padrões mais comuns do crescimento tumoral (por exemplo: 3+3 ou 3+4). Tumores com baixos escores de Gleason tendem a apresentar um volume menor e menor potencial metastático, enquanto tumores com altos escores de Gleason são maiores em volume e apresentam uma probabilidade aumentada de ocorrência de metástase (GLEASON 1992). Em termos prognósticos, tumores apresentando os escores 2-4 são classificados como bem diferenciados; 5-6 como moderadamente diferenciados; 7 como pouco ou moderadamente diferenciados; e 8-10 como pouco diferenciados. Um escore de Gleason 7 pode, além disso, ser sub-classificado em [3+4] ou [4+3], sendo que o padrão [4+3] está associado a um pior prognóstico e pode influenciar na decisão terapêutica (EPSTEIN 2010).

A estratificação dos pacientes com CaP, baseando-se nestas variáveis, é um fator prognóstico efetivo embora, em muitos casos, pacientes com padrão bioquímico, histopatológico e condições clínicas similares comportem-se de forma diferente (KANTOFF et al. 2009). Sendo assim, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese prostática é de grande relevância para a identificação de novos marcadores (MACKINNON et al. 2009).

Embora uma grande variedade de pesquisas tenha contribuído para a melhor compreensão dos eventos moleculares e genéticos associados a carcinogênese prostática, ainda permanecem desconhecidos marcadores moleculares que sejam efetivos na resposta à terapia (fatores preditivos) e que determinem a progressão da doença (fatores prognósticos).

1.1 MECANISMO DE PROGRESSÃO DA DOENÇA

O CaP é uma doença clinicamente heterogênea, havendo casos que permanecem confinados à próstata com pequeno efeito sobre a qualidade de vida do paciente, enquanto outros podem levar ao desenvolvimento de uma doença metastática letal (MACKINNON et al. 2009). No modelo clássico de formação de metástases, células tumorais invadem vasos sanguíneos e/ou linfáticos, atingindo a circulação e, a partir daí, se alojam em outros órgãos (HERLYN e MALKOWICZ 1991; WOODHOUSE et al. 1997). As regiões mais afetadas por metástases do CaP são linfonodos, ossos, pulmões e, raramente, bexiga, fígado e cérebro (PATEL et al. 1989; DUTT et al. 2000).

O processo metastático está intimamente relacionado com o acúmulo de alterações genéticas durante a progressão tumoral (FEARON e VOGELSTEIN 1990). Em CaP andrógeno-independente a metástase ocorre no estágio final da doença sendo uma característica substancial de morbidade e mortalidade (DAMBER e AUS 2008). A determinação do perfil genético pode evidenciar o risco aumentado de desenvolvimento de metástases; isto é indiretamente suportado por estudos de expressão gênica (VAN'T VEER et al. 2002). HÜSEMANN et al. (2008) sugerem que a extensão da metástase pode ser geneticamente pré-determinada, porém o ponto inicial da disseminação metastática ainda não está bem estabelecido. Recentemente, ALBERTI (2008) em uma revisão da literatura relataram que a alteração na expressão de genes pró-metastáticos pode ocorrer nas fases iniciais do CaP, juntamente com a expressão anormal de genes que induzem o crescimento do tumor primário. O autor exemplifica relatando que em carcinomas de próstata metastáticos,

os genes *MTA1* e *MYBL2* mostram expressão gênica aumentada em comparação com o sítio primário enquanto os genes *IGFBP*, *DAN1*, *FAT* e *RAB5A* apresentam expressão diminuída. Além disso, fatores do microambiente tumoral parecem contribuir para a progressão tumoral, como o processo inflamatório que pode gerar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, indução de COX-2 e a produção de citocinas por neutrófilos e macrófagos do microambiente hospedeiro (para revisão, ALBERTI 2008).

Outros estudos sugerem que a disseminação à distância é um evento inicial no processo da carcinogênese (HÜSEMANN et al. 2008). Novas vias moleculares podem distinguir tumores menos agressivos daqueles com evolução clínica desfavorável tornando possível a descoberta de novas terapias alvo para o tratamento de tumores metastáticos (MICHAELSON et al. 2008). O conhecimento das alterações genéticas bem como do papel do microambiente tumoral tem sido considerado como essencial na análise de progressão tumoral e risco de desenvolvimento de metástases.

1.2 ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS AO CÂNCER DE PRÓSTATA

O câncer é uma doença genética decorrente de alterações moleculares envolvidas em processos celulares, incluindo principalmente aqueles associados à proliferação e diferenciação celular. A complexidade da doença aumenta com a descoberta de novos genes supressores tumorais, mutações em genes específicos e alterações em vias moleculares particulares (EELES et al. 2008).

Diferentes alterações cromossômicas já foram relatadas em CaPs primários envolvendo quase todos os cromossomos humanos. Entre essas anormalidades estão incluídas as trissomias, isocromossomos, deleções, amplificações e translocações (LUO e YU 2003). A fusão gênica mais comum nos tumores de próstata ocorre entre a proteína transmembrânica serina 2 (*TMPRSS2*) e *EGR*, um membro da família dos genes da eritroblastose-transformação específica (ETS). Esta fusão foi observada em 50% dos tumores estudados (TOMLINS et al. 2005; KUMAR-SINHA et al. 2008; WITTE 2009). Esses achados têm distinguido combinações de expressão de genes que podem prever a agressividade dos CaPs.

SUN et al. (2007) realizaram uma compilação de todos os estudos publicados (até abril de 2006) no banco de dados PubMed que avaliaram alterações genômicas pela CGH (hibridação genômica comparativa) em CaP. A maioria desses estudos utilizou a metodologia da CGH cromossômico e menos de 8% avaliaram os tumores por CGH-array. Foram incluídos 41 estudos, contendo 872 tumores de próstata numa análise combinada para estimar a frequência das alterações em cânceres avançados e localizados. A frequência de perdas ou ganhos foi estimada para cada uma das 850 bandas, baseando-se no número de tumores que tinham perdas ou ganhos entre todas as amostras examinadas. Enquanto a região cromossômica 8p foi a mais comumente envolvida em perda, ocorrendo em aproximadamente um terço de todos os tumores e em metade dos tumores avançados, 8q foi a região mais comum de ganho, afetada em cerca de um quarto de todos os casos com CaP e em metade dos tumores avançados. A segunda e a terceira regiões de perdas mais frequentes foram 13q e 6q e a segunda região de ganho mais frequente foi 7q, envolvida em cerca de 10% de todos os tumores e em aproximadamente um quarto dos tumores avançados. Os

resultados dessa análise evidenciaram as regiões cromossômicas mais freqüentemente envolvidas em perdas ou ganhos nos diferentes estudos avaliados, sugerindo que essas regiões deveriam ser priorizadas na busca por genes supressores tumorais e oncogenes no CaP.

Estudos de ligação ou associação utilizados para a descoberta de genes principais relacionados à predisposição aos cânceres de próstata têm sido conduzidos evidenciando alguns genes candidatos, incluindo o *locus* 1q24-25 (SMITH et al. 1996). Outros estudos confirmaram a associação entre alterações do gene *HPC1* e a predisposição ao CaP (SMITH et al. 1996; XU 2000; ISAACS 2001). Este gene atua mediando a via de apoptose induzida pelo interferon, e foi caracterizado como um gene supressor tumoral (CARPTEN et al. 2002). Os genes *ELAC2*, *RNASEL* e *MSR1* também foram associados com predisposição familiar no CaP hereditário. Alguns autores confirmaram o aumento do risco de CaP em homens portadores de alelos variantes de *ELAC2* (SUAREZ et al. 2001; TAVTIGIAN 2001 ; WANG et al. 2001). O gene *RNASEL* codifica um componente do sistema regulado pelo interferon 2-5A que tem papel antiviral e anti-proliferativo. O gene *MSR1* codifica receptores de macrófagos classe A associados a vários processos patológicos incluindo defesa do hospedeiro (ISHIGURO et al. 2001). Mutações em *MSR1* e em *RNASEL* foram correlacionadas a um subgrupo de famílias com câncer de próstata hereditário e a casos não familiares (RENNERT et al. 2008). Os genes *EPAC2*, *CHECK2*, *CAPZB*, receptor da vitamina D e *PONI* também foram associados ao câncer de próstata hereditário (DEUTSCH et al. 2004; DONG et al. 2006; ALBERTI 2010). Grande parte desses genes codificam proteínas que atuam na resposta celular, inflamação e

no estresse oxidativo, os defeitos funcionais destas proteínas podem aumentar a suscetibilidade para a formação do tumor (PATEL e KLEIN 2008).

Além de genes principais com alta penetrância, outros genes contendo polimorfismos genéticos são importantes na determinação ou modificação do risco de CaP, especialmente aqueles envolvidos na sinalização androgênica (MAKRIDAKIS et al. 2004). O *SRD5A2* é um exemplo de gene envolvido na via de sinalização de andrógenos, responsável pela codificação da enzima 5-alfa-redutase predominante no CaP. Esta enzima atua na conversão da testosterona em dihidrotestosterona (DHT), que é o principal receptor androgênico na próstata (CHENG et al. 1993). Portanto variantes genéticas codificadas pelo gene *SRD5A2* e outras enzimas associadas ao metabolismo de andrógenos podem ter um papel importante na predisposição e progressão do CaP (ROSS et al. 1998).

Em adição, estudos cromossômicos tem revelado a presença ganhos envolvendo os cromossomos 7, 8q, 17p, 17q e Xq e perdas em 5q, 8q, 10p, 13q, 16q, 17p e Y (BROTHMAN et al. 1991; LUNDGREN et al. 1992; MICALE et al. 1992; ARPS et al. 1993; ALCARAZ et al. 1994; CHER et al. 1994; MACOSKA et al. 1994; TAKAHASHI et al. 1994; ZENKLUSEN et al. 1994; CHER et al. 1995; QIAN et al. 1995; VISARKOPI et al. 1995; CHER et al. 1996; ITTMAN 1996; KÖNIG et al. 1996; MATSUURA et al. 1996; TRYBUS et al. 1996; WEBB et al. 1996; ZITZELSBERGER et al. 1996; KASAHARA et al. 2002; STEINER et al. 2002; WOLTER et al., 2002a; CHU et al. 2003; EELES et al. 2008; AGRAWAL e DUNSMUIR 2009).

Análises genômicas em larga escala, como CGH-array, permitiram a identificação de uma alta frequência de desequilíbrios no número de cópias de DNA,

incluindo principalmente ganhos em 8q22-q24 (*c-MYC*) e perdas em 8p11-p23 (*NKX3.1*), 10q23 (*PTEN*), 12p13 (*CDKN1B*), e 13q14 (*RBI*) (LAPOINTE et al. 2007; SANTOS et al. 2008; ISHKANIAN et al. 2009).

Alterações cromossômicas específicas foram associadas a estágios específicos do carcinoma de próstata (ELO e VISARKOPI 2001; DEMARZO et al. 2003; VISARKOPI 2003). Em tumores primários, as perdas genômicas são relatadas como cinco vezes mais freqüentes que os ganhos, sugerindo que a inativação de genes supressores é um evento importante nas etapas iniciais da carcinogênese prostática (VISARKOPI et al. 1995; ELO et al. 1999). A inativação de genes supressores tumorais é freqüentemente observada em metástases e lesões refratárias, sugerindo o envolvimento destes genes também na progressão da doença (BOOKSTEIN et al. 2001).

1.3 GENES ASSOCIADOS AO CÂNCER DE PRÓSTATA

Vários métodos permitiram a identificação de alterações de número de cópias do DNA em CaP nos últimos 20 anos. No entanto, as diferentes resoluções dos métodos testados, o tamanho amostral, o tipo histológico e material utilizado (tumores primários/localizados, tumores metastáticos/recorrentes e linhagens celulares) tornam difícil a compreensão e a interpretação dos resultados e, conseqüentemente, sua aplicação na prática clínica. Contudo, vários candidatos a biomarcadores moleculares têm sido revelados nestes estudos e alguns deles apresentam potencial para aplicação no diagnóstico, prognóstico e resposta a tratamento. Estes estudos identificaram diversas regiões freqüentemente alteradas no

genoma que continham importantes oncogenes e genes supressores tumorais. Alguns exemplos incluem perdas em 10q23, 16q22 e 13q21, onde estão localizados os genes *PTEN* (LI et al. 1997), *ATBF1* (SUN et al. 2007) e *KLF5* (CHEN et al. 2003); e ganhos em Xq12 e 8q24.1, contendo os genes *AR* (VISARKOPI et al. 1995) e *c-MYC* (NESBIT et al. 1999), respectivamente.

Especificamente, as regiões de ganho foram relacionadas com a agressividade do tumor (SATO et al. 1999). A amplificação do gene *c-MYC* foi relacionada com pior prognóstico (SATO et al. 1999; GUREL et al. 2008; ISHKANIAN et al. 2009), enquanto níveis elevados de seu transcrito também foram observados em CaP (MENG et al. 2002; LIU et al. 2008; NAGY et al. 2008). O gene *PSCA* (8q24.2), mapeado próximo ao *c-MYC*, codifica uma proteína de superfície celular que se apresenta com expressão elevada nos tumores de próstata e, por este motivo, tem sido investigado como um potencial alvo terapêutico no CaP (GU et al. 2000; REITER et al. 2000). Recentemente estudos de associação genômica (GWASs) confirmam uma forte ligação da região gênica 8q24 em tumores de próstata. Esses achados evidenciam que o oncogene *c-MYC* é principal gene mapeado nesta região (GUDNUNDSSON et al. 2007; GORLOV et al. 2009; AL OLAMA et al. 2009; WITTE 2009).

Uma variedade de genes foram correlacionados com o CaP, como o *HER2*, *PAIL* e *RAFI*, (VOGEL et al. 2001; FU et al. 2006; NISHIO et al. 2006; JORGENSEN et al. 2007); o *RB*, envolvido em aproximadamente 50% dos CaPs (COONEY et al. 1996; MELAMED et al. 1997; LI et al. 1998; HILL et al. 2005); o *APC*, descrito em 20% dos tumores avançados (BREWSTER et al. 1994); *TP53*; *CHEK2* (YANG et al. 2005; ZHENG et al. 2006); *BRC1* (ARASON et al. 1993;

LANGSTON et al. 1996; FAN et al. 2006) ou genes distais a ele (CHER et al. 1994; VISARKORPI et al. 1995); o *TP27* (MACRI e LODA, 1999; TSIHLIAS et al. 1999; SHAPIRA et al. 2006); o *TP16* (JARRAD et al. 1999; ZHANG et al. 1998); o *AR* (VISAKORPI et al. 1995; HAAPALA et al. 2001); genes relacionados à atividade da telomerase (SOMMESFELD et al. 1996; ZHANG et al. 1998); reguladores de apoptose, como o *BCL2* (MCDONNEL et al. 1997; REVELOS et al. 2005), entre outros. Entretanto, apesar dos esforços em identificar marcadores tumorais úteis ao diagnóstico, seleção de tratamento e prognóstico, ainda não há dados suficientes que possam contribuir para a sua aplicação na prática clínica.

1.4 ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS EM CARCINOMAS DE PRÓSTATA DE PACIENTES BRASILEIROS

Estudos prévios do grupo utilizando CGH cromossômico de alta resolução (HR-CGH) (GAMBARINI-PAIVA 2009) e CGH-array (SANTOS 2008) em carcinomas de próstata e suas metástases revelaram alterações cromossômicas consistentes envolvidas em perdas e ganhos de DNA. Dentre os genes candidatos ou regiões genômicas consideradas como relevantes nestes estudos, estão incluídos o *c-MYC* (*myc proto-oncogene protein*), *NKX3.1* (*NK3 homeobox 1*), *SRF* (*serum response factor*) e o *SRC* (*v-src sarcoma viral oncogene homolog*).

A região 8q24 foi originalmente descrita por dois grupos utilizando metodologias de mapeamento genômico distintas, porém ambos confirmaram que esta região estava associada a um risco genético elevado para o desenvolvimento tumoral (AMUNDADOTTIR et al. 2006; SCHUMACHER et al. 2007). Análises de

mapeamento genômico em tumores de próstata, cólon e mama (EASTON et al. 2007; HAIMAN et al. 2007a; b) demonstraram alterações nos mesmos alelos.

Ganhos ou amplificações em 8q24 foram relatados em carcinomas de próstata (CREIGHTON et al. 2008; GALLUCCI et al. 2008; GHOUSSAINI et al. 2008; GUREL et al. 2008; SALINAS et al. 2008). O proto-oncogene *c-MYC* localizado nesta região, é um potencial marcador tumoral (JENKINS et al. 1997; CREIGHTON, 2008). A proteína codificada foi associada a promoção da biogênese ribossômica (RUGERRO 2009). Recentes achados sugerem fortemente que a sinalização do oncogene *c-MYC* pode monopolizar a maquinaria de tradução para extrair efeitos cooperativos sobre o crescimento celular, a progressão do ciclo celular e a instabilidade genômica como um mecanismo de iniciação do câncer (RUGERRO 2009).

O gene *c-MYC* está fortemente implicado na tumorigênese de próstata (LIU et al. 2008). Análises de linhagens tumorais demonstraram que a regressão do fenótipo tumoral pode ser determinada pelo bloqueio deste oncogene (NAGY et al. 2008). Estudos confirmaram que a sua expressão *in vivo* depende de elementos distais denominados *enhancer* (LAVENU et al. 1994) e que alguns desses elementos estão mapeados na região *upstream* a 37kb do gene *c-MYC* (HALLIKAS et al. 2006). Esses achados permitiram propor o envolvimento desta região no controle da transcrição e que o aumento de seqüências *usptream* a 50kbp de *c-MYC* é necessário para este controle (WIERSTRA e ALVES 2008). Segundo SOTELLO et al. (2010) muitos elementos *enhancer* em 8q24 estão presentes nas regiões geneticamente associadas ao câncer e que eles podem regular a transcrição de *c-MYC*. O aumento de expressão deste oncogene nos CaPs já foi confirmado por vários autores, como

também o aumento de expressão protéica nuclear nestes tumores (FLEMING et al. 1986; GUREL et al. 2008). O aumento de expressão de *c-MYC* talvez seja um fator crítico que contribui para o início do adenocarcinoma prostático (IWATA et al. 2010). Estes resultados acrescidos de dados das análises de CGH-*array* revelando ganho em 8q24.21 em CaP que evoluíram para metástase, confirmaram o papel deste oncogene nestes tumores (LAPOINTE et al. 2007; ZANKE et al. 2007; ZHENG et al. 2007; LIU et al. 2008; ISHKANIAN et al. 2009).

O *NKX3.1*, mapeado em 8p21, tem sido relatado como importante no desenvolvimento da próstata normal, na gênese e progressão da doença (BIEBERICH et al 1996; COOK et al. 1998; BATHIA-GAUR et al. 1999; BOWEN et al. 2000; QUO e BERNIS 2001; SEIDMAN 2002; GONZALGO e ISAACS 2003; JU et al. 2006; HORNSTEIN et al. 2008; POSSNER et al. 2008; ZHANG et al. 2008; ISHKANIAN et al. 2009; SHEN et al. 2009). Foi também associado com estágios precoces da tumorigênese prostática (SONG et al. 2009). Este gene é regulado por receptores androgênicos e é expresso especificamente em células epiteliais prostáticas. BOWEN et al. (2000) relataram perda alélica nesta região em aproximadamente 80% dos CaP. Vários autores confirmaram a perda de heterozigose desta região na maioria das lesões e tumores de próstata (BOVA et al. 1993; MACOSKA et al. 1995; HE et al. 1997; ASATIANIE et al. 2005) e correlacionaram o achado com o avanço da doença, aumento do grau histológico e estadio (VOCKE et al. 1996; BETHEL et al. 2006).

A perda de expressão da proteína NKX3.1 foi observada em 40% de tumores prostáticos humanos e 20% de focos de PIN (neoplasia intra-epitelial prostática) (ZHANG et al. 2010). GUREL et al. (2010) avaliaram o papel do NKX3.1 como um

marcador de metástase em CaP utilizando os níveis de expressão protéica em CaP e outros tecidos tumorais. Os autores relataram 100% de marcação desta proteína em próstata normal, 85% de positividade nos tumores primários e 99% nos casos de metástase de CaP enquanto nenhum tecido metastático de outros tumores apresentou marcação para esta proteína. Estes achados sugeriram que esta proteína é um marcador específico de tecido prostático.

A função precisa da NKX3.1 no desenvolvimento e progressão do câncer ainda é controversa. A proteína foi relatada como sendo um fator transcricional de ligação ao DNA (ZHANG et al. 2010). Nos estudos prévios do nosso grupo, as análises de HR-CGH revelaram perda da região onde se mapeia o gene NKX3.1 (8p21) em dois casos de tumores de próstata primários e suas metástases em testículo. No grupo de amostras formado por diferentes biópsias de um mesmo paciente, também foram encontrados dois casos apresentando perda nesta região. A análise de redes biológicas resultantes do conjunto de genes alterados por CGH-array revelaram esta região como central indicando um papel relevante na carcinogênese de próstata.

As análises prévias de alterações genômicas significantes por CGH-array em carcinomas de próstata e suas metástases do nosso grupo demonstraram que os genes *SRF* e *SRC* eram centrais em redes biológicas. O gene *SRF* é caracterizado como um importante co-fator de miocardina no controle da expressão de genes na musculatura. Além desta função, o *SRF* também possui um papel fundamental na inflamação, com efeito na destruição celular pela ação do fator de transcrição NF- κ B (p65) (TANG et al. 2008). YEMELYANOV et al. (2007) descreveram o papel do gene *SRF* como um supressor tumoral no CaP. Os autores observaram que este gene está relacionado à

inibição de múltiplas vias de sinalização e fatores de transcrição envolvidos na proliferação e transformação celular. Segundo JU et al. (2009) há um mecanismo de interação entre os genes *SRF* e *NKX3.1* na predisposição ao CaP. Com análises de recombinação protéica, foi observado que *SRF* atua na modificação de resíduos necessários para manter a estabilidade de domínios ácidos presentes na estrutura molecular de *NKX3.1*, e que modificações na estrutura desses domínios podem ser um fator de risco genético para a predisposição do CaP.

O gene *SRC* é um proto-oncogene tirosina quinase que atua em vários processos neoplásicos invasivos e metastáticos ósseos. Tem sido identificado como um candidato a terapia alvo em pacientes com tumores sólidos. Vários inibidores de SRC estão em desenvolvimento, mas o mais explorado é o dasatinib. Estudos pré-clínicos em uma variedade de tumores, incluindo próstata, mama e gliomas, demonstraram que esta droga atua como agente citostático inibindo os processos de proliferação celular, invasão e metástase. Mais especificamente, esta molécula atua inibindo a atividade de osteoclastos, que tem papel fundamental no desenvolvimento da metástase óssea (ARAÚJO e LOGOTHETIS 2010). Segundo EDWARDS (2010), *SRC* e a família SRC-quinases (SFKs) estão envolvidos em múltiplas vias de sinalização centrais para o desenvolvimento, progressão e metástase do CaP, porém o tratamento com inibidores desta molécula ainda está em fase de investigação.

A análise de redes biológicas revelou uma conexão entre o gene *SRF* e *TIMP3* (*TIMP metalloproteinase inhibitor 3*) e *NCOA1* (*nuclear receptor coactivator 1*) (Tabela 1).

A proteína TIMP3 atua como um inibidor de metaloproteases, que são peptidases envolvidas na degradação da matriz extracelular; na indução da apoptose

e na inibição do crescimento de células tumorais, sendo assim considerado um supressor tumoral (GU et al. 2008). Recentemente, foi analisado o padrão de metilação deste gene em tumores gástricos e esofágicos, no entanto, não são bem estabelecidas as implicações clínicas associadas à perda de expressão de TIMP3 nos processos carcinogênicos (BROCK et al. 2003; SCHULMANN et al. 2005; CLÉMENT et al. 2006). CROSS et al. (2004) relataram uma expressão elevada do transcrito *TIMP3* no componente estromal de hiperplasias benignas e carcinomas de próstata.

Em 1995 o receptor de esteróide co-ativador 1 denominado *NCOA1* ou *SRC1*, foi clonado como o primeiro autêntico NR co-ativador (ONATE et al. 1995). O aumento de expressão deste gene foi detectado em um grupo de tumores de mama e a correlação com ERBB2 foi positiva indicando piores níveis de sobrevida livre da doença (XU et al. 2010). Vários estudos têm demonstrado que o aumento dos níveis de expressão gênica e protéica de NCOA1, estão correlacionados com características de agressividade da doença tanto nos tumores primários quanto nas metástases dos CaPs (GREGORY et al. 2001; AGOULNIK et al. 2005). Foi também relatada uma correlação significativa entre os níveis de mRNA deste gene e a progressão dos tumores de próstata (MORI et al. 2008). O aumento de expressão de *NCOA1* nos tumores de próstata é confirmado por vários autores, mas a frequência exata deste evento ainda não foi bem esclarecida (XU et al. 2009).

Na análise das redes biológicas dos dados prévios por CGHarray, foi observado que os genes *DAB2* (*disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein*), *ATF1* (*activating transcription factor 1*), *ETV6* (*ets variant 6*) e o *ICAM1* (*intercellular adhesion molecule 1*) estão associados ao *SRC* (Tabela 1).

O *DAB2* é um supressor tumoral com baixa expressão em tumores de próstata metastáticos (KONG et al. 2010). Há relatos demonstrando a perda da expressão protéica em 80-90% dos tumores de ovário e mama (BAGADI et al. 2007). Análises de expressão desta proteína por imunistoquímica demonstraram ausência da expressão em tecidos tumorais de mama enquanto que em tecidos normais ela estava presente (BAGADI et al. 2007). Esta proteína é caracterizada como um antagonista de receptores de andrógenos mediados pelo crescimento celular em CaP, na via de interação com a proteína c-SRC. Esta interação causa a inativação de Erk e Akt que são proteínas críticas para a proliferação e sobrevivência das células prostáticas tumorais. ZHOUL et al. (2005) concluíram que a proteína DAB2 pode modular receptores de andrógenos que irão mediar o crescimento celular tanto nos tecidos prostáticos normais como nos tumorais. Este marcador tem sido caracterizado como um possível alvo para predizer o risco de agressividade dos CaPs (KONG et al. 2010).

A proteína ATF1 é um membro da família de fatores de transcrição b-Zip que inclui CREB e elementos moduladores de resposta cAMP (MAYR e MONTMINY 2001). Estes fatores de transcrição b-Zip regulam genes alvo pela formação de homodímeros ou heterodímeros com outros fatores de transcrição da família, como JUN e FOS (HAI e CURRAN 1991; MAYR e MONTMINY 2001). A expressão de ATF1 está aumentada em linfócitos (HSUEH e LAI 1995) e células metastáticas de melanoma (JEAN et al. 2000) e pode contribuir para o crescimento potencial destas células. *ATF1* atua como um ativador transcricional ou repressor de genes envolvidos na proliferação celular, no entanto ainda é desconhecido o mecanismo molecular que controla a diversidade de ações desses genes alvos (IWASAKI et al. 2007). Há

descrições de translocação deste gene com *EWRS1*, t(12;22)(q13;q12), em melanoma e histiocitoma angiomatóide fibroso (WANG et al. 2009; TANAS et al. 2010). Apesar da presença do gene *ATF1* nas análises das redes biológicas no estudo prévio do grupo e a ligação com o gene central *SRC*, não há, para o nosso conhecimento, relatos da associação desse gene com CaP.

O gene *ETV6* mapeado em 12p13 foi descrito como um gene alvo presente em doenças linfóides e mielóides (KIBEL et al. 2002). Eventos de translocação deste gene normalmente resultam em uma fusão gênica, que determina a ativação da função ou expressão de *ETV6* (PARK et al. 2009). Alterações no gene *ETV6* estão presentes em carcinomas mamários *in situ* e invasivo (LAÉ et al. 2009). Em adição, a deleção envolvendo o gene *ETV6* está intimamente relacionada a carcinomas prostáticos, sugerindo assim o papel de supressor tumoral (KIBEL et al. 2002).

A molécula de adesão intracelular ICAM1 é uma glicoproteína de transmembrana pertencente à super família de moléculas de adesão (DYMICKA-PIEKARSKA e KEMONA 2009). Está expressa em baixos níveis em vários tipos celulares incluindo fibroblastos, células endoteliais e alguns leucócitos. Durante a resposta inflamatória e imune, o mecanismo de ação deste gene facilita a invasão e o dano ao tecido pelas células imunes (YANG et al. 2005). Embora sua importância esteja relacionada à resposta imune, a proteína ICAM1 também está implicada na progressão e no prognóstico de vários tipos de câncer (HEMMERLEIN et al. 2000; TEMPIA-CALIERA et al. 2002; CHOI et al. 2004; LIN et al. 2006; DYMICKA-PIEKARSKA e KEMONA 2009). Tem sido proposto que ICAM1 está envolvida no processo metastático, facilitando a progressão das células metastáticas para os sítios secundários (LIN et al. 2006; WANG et al. 2006; BROOKS et al. 2008; LIANG et

al. 2008). HAYES e SEIGEL (2009) investigaram a imunorreatividade de ICAM1 em tecido prostático normal, maligno e metastático. Os resultados dessas análises demonstraram que a intensidade de marcação foi ausente no tecido prostático normal, enquanto que nos CaPs a intensidade de marcação apresentou-se moderada.

Tabela 1 - Descrição dos genes associados aos genes centrais *SRF* e *SRC* após análises de redes biológicas em tumores de próstata, incluindo a referência do clone (plataforma HB68 BAC platform (6K) Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, USA) em que foi detectado como alterado no estudo prévio do grupo (SANTOS 2008) localização cromossômica, tipo de amostra na qual a alteração foi encontrada, função do gene e dados da literatura.

<i>Genes associados ao SRF</i>					
<i>Gene</i>	<i>BAC</i>	<i>Região</i>	<i>Casos</i>	<i>Função</i>	<i>Referências em literatura</i>
<i>TIMP3</i>	<i>RP11-70F2</i>	22q12.3	CaP I	Apoptose	Inibição do crescimento tumoral e metástase, efeito inibitório da invasão celular (tumor de mama) (HAN et al. 2004).; expressão elevada do transcrito no componente estromal de hiperplasias benignas e câncer de próstata (CROSS et al. 2004); promotor de apoptose em células de melanoma (AHONEN et al. 2003). Nível de transcrito reduzido em amostras de carcinomas de células escamosas do pulmão sugerindo assim um papel de supressor tumoral importante na tumorigênese humana (MACHKOVA 1991).
<i>NCOA1</i>	<i>RP11-169L20</i>	2p23	CaP II	Regulação da transcrição	Alterações na regulação deste gene são importantes para o desenvolvimento tumoral (WACHTEL et al. 2004).
<i>Genes associados ao SRC</i>					
<i>Gene</i>	<i>BAC</i>	<i>Região</i>	<i>Casos</i>	<i>Função</i>	<i>Referências em literatura</i>
<i>DAB2</i>	<i>RP11-44D11</i>	5p13	CaP II	Proliferação celular	Expressão diminuída deste gene foi associada a várias neoplasias. A expressão positiva deste gene foi associada a inibição do crescimento do CaP e também apresenta regulação negativa. Este gene tem função relacionada a manutenção do complexo de homeostase celular (WANG et al. 2002); modulação do crescimento celular mediado por receptores androgênicos tanto nas células normais quanto nas malignas. Em adição também foi descrita a relação com o complexo cSRC em CaP ; (ZHOUL et al. 2005); Candidato a supressor tumoral em câncer de ovário (ANUPAM et al. 2006).
<i>ICAM1</i>	<i>RP11-197O4</i>	19p13.3-p13.2	CaP I e Meta	Adesão celular	Análises de SNPs mostraram associação deste locus com o risco de CaP em homens com história familiar (CHEN et al. 2006). Expressão diminuída em nódulos de câncer de mama positivos (MADHAVAN et al. 2002); responsável pela adesão de células tumorais no endotélio, passo crucial para o processo de metástase (FINZEL et al. 2004); expressão deste gene em células endoteliais pela indução do TNF (ZHOU et al. 2007).
<i>ATF1</i>	<i>RP11-533J15</i>	12q13	CaPI	Regulação da transcrição	Associação com sarcoma de células claras e envolvido no rearranjo cromossômico t(12;22)(q13;q12) (SOMERS et al. 2006); regulador de linfócitos T (VAN DER STOEP et al. 2002).
<i>ETV6</i>	<i>RP11-418C2</i>	12p13	CaP I e Meta	Regulação da transcrição	Deleção da região 12p12-p13 envolvendo o gene <i>ETV6</i> em carcinomas prostáticos, sugerindo suposto papel de supressor tumoral (KIBEL et al. 2002); mutações neste gene foram associadas a câncer de mama (TOGNON et al. 2002), leucemia mielóide aguda (BARJESTEH VAN WAALWIJK VAN DOORN-KHOSROVANI et al. 2005) e carcinomas de células acinares (REIS-FILHO et al. 2008).

CaP I: tumores primários que evoluíram para metástase; Meta: metástase; CaPII: tumores primários que não evoluíram para metástase.

OBJETIVOS

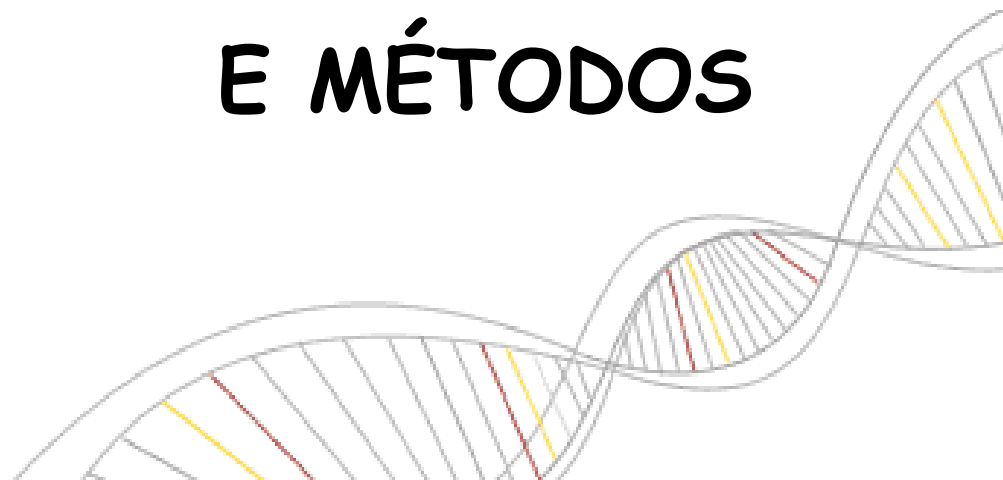


2 OBJETIVOS

Baseados em resultados de estudos anteriores utilizando HR-CGH e CGH-array foram selecionados dez genes para confirmação dos achados e seu envolvimento em carcinomas de próstata esporádicos. Assim, este estudo tem como objetivos:

- Avaliar a expressão dos transcritos *c-MYC*, *NKX3.1*, *SRF*, e *SRC* e das suas proteínas;
- Avaliar a expressão protéica de TIMP3, NCOA1, DAB2, ATF1, e ETV6 e ICAM1.
- Comparar os achados de expressão gênica e proteica com os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes com CaP.

MATERIAL E MÉTODOS



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas nesse estudo foram obtidas do banco de amostras do Laboratório NeoGene, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP, com a colaboração do Dr. José Carlos Souza Trindade Filho, Departamento de Urologia e do Dr João Lauro Vianna de Camargo, Departamento de Patologia. Amostras adicionais foram obtidas do Banco de Amostras do Hospital AC Camargo, São Paulo, SP sob supervisão do Dr Fernando Augusto Soares e Banco de Biomoléculas sob a responsabilidade da Dra Dirce Carraro. Todas as amostras desse estudo foram coletadas previamente ao tratamento hormonal ou radioterápico. Este projeto foi aprovado pelo CONEP (Parecer 304/2000) e pelo CEP do Hospital AC Camargo (Processo nº1024/07). A Tabela 2 apresenta os dados clínicos, tempo de seguimento e achados histopatológicos das amostras utilizadas neste estudo.

No presente estudo a avaliação de genes candidatos, selecionados a partir de estudos prévios utilizando CGH-*array* foi realizada por análise de expressão gênica pela metodologia de RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) para os genes *c-MYC*, *SRF*, *SRC* e *NKX3.1* e protéica de c-MYC, NKX3.1, SRF, SRC, TIMP3, NCOA1, DAB2, ATF1, ETV6 e ICAM1 usando a técnica de imunoistoquímica em amostras organizadas em microarranjos de tecidos (TMA).

Para a análise de qRT-PCR foram utilizadas tecidos coletados e armazenados a fresco (-80°C), incluindo 95 carcinomas de próstata (provenientes de

prostatectomia radical), nove tecidos normais adjacentes ao tumor (margem cirúrgica) e duas amostras de tecido prostático coletadas em necropsia de pacientes que vieram a óbito por causas não relacionadas a afecções prostáticas, confirmada por análise histopatológica (pacientes com idades de 42 e 49 anos). Para análise proteica foram utilizadas duas plataformas de TMA. A primeira, composta de 62 CaP e 23 hiperplasias prostáticas benignas (HPB), nove amostras de tecidos não neoplásicas adjacentes (TecAdj) e duas amostras de tecidos prostáticos normais (SVO). A segunda plataforma contém 133 CaP e 23 hiperplasias prostáticas benignas. Em ambas as plataformas, selecionou-se a área do tumor que representasse o grau de Gleason, atribuído ao exame histopatológico. Para as reações imunoistoquímicas e foram utilizadas os dois microarranjos de tecidos.

Sessenta e dois CaP e 9 amostras de tecido adjacente foram avaliados pelas duas metodologias, qRT-PCR e imunoistoquímica.

Tabela 2 - Caracterização clínica, dados de seguimento dos pacientes cujas amostras foram utilizadas no estudo e características histopatológica das amostras de CaP.

Variáveis	Expressão gênica qRT-PCR		IHQ TMA6		IHQ TMA7	
	CaP (n=95)	Tec Adj* (n=9)	CaP (n=62)	Tec Adj* (n=9)	CaP (n=133)	HPB (n=23)
Idade (anos)	62	65	60	65	61,6	60
Mediana (min-máx)	(43-79)	(52-71)	(46-74)	(52-71)	(46-76)	(41-73)
Seguimento Clínico						
(meses)	52,9	19	48,1	19	68,7	-
Mediana (min-máx)	(2-94,5)	(3,1-45,9)	(6,7-119,8)	(3,1-45,9)	(8,3-164,6)	
PSA pré-cirúrgico						
(ng/mL)	9,9	9,72	10,8	9,72	12,6	-
Mediana (min-máx)	(1,6-69)	(5,63-19,36)	(2,6-69)	(5,63-19,36)	(1,8-78)	
Escore Gleason						
4 – 6	39	3	17	3	85	-
7	42	5	34	5	32	-
8 – 9	14	1	11	1	15	-
História familiar						
Positiva	24	2	15	2	26	-
Negativa	67	7	41	7	106	-
Estadio patológico						
pT2	53	5	29	5	67	-
pT3	44	4	30	4	56	-
pT4	2	0	1	0	8	-
Invasão angiolinfática						
Positiva	16	2	14	2	30	-
Negativa	78	7	46	7	102	-
Extensão extra-prostática						
Positiva	20	2	20	2	21	-
Negativa	63	7	40	7	110	-
Margem comprometida						
Positiva	29	3	25	3	43	-
Negativa	66	6	35	6	89	-

Cont/ Tabela 2

Linfonodos comprometidos						
Positivo	-	-	4	-	6	-
Negativo	-	-	55	-	121	-
Recidiva Bioquímica						
Positiva	25	-	20	-	51	-
Negativa	69	-	39	-	37	-
Metástase						
Positiva	4	-	4	-	9	-
Negativa	50	-	51	-	119	-
Risco de recorrência*						
Baixo	25	-	10	-	36	-
Moderado	54	-	36	-	73	-
Alto	18	-	13	-	24	-

CaP: câncer de próstata; **Tec Adj:** tecido adjacente **HPB:** hiperplasia prostática benigna.

* **Risco de recorrência:** Adaptado de NCCN Clinical Practice Guidelines in OncologyTM: Prostate Cancer, 2010. *Os dados apresentados referem-se ao câncer de próstata do paciente em que foi possível a obtenção de tecido adjacente morfológicamente normal.

3.2 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE GENES CANDIDATOS

A partir de estudos prévios do grupo (hibridação genômica comparativa de alta resolução – HR-CGH e CGH-arrays) em amostras de pacientes com carcinoma de próstata e suas metástases, foram selecionados genes candidatos mapeados nas regiões genômicas alteradas para confirmar seu envolvimento em CaP. Os resultados das análises de HR-CGH demonstraram ganho da região 8q24 (gene candidato selecionado *c-MYC*) e perda em 8p21 (gene candidato selecionado *NKX3.1*). Nas análises de CGH-array, foi observado ganho nas regiões genômicas contendo os genes *c-MYC* e *SRF* mapeados em 8q24 e 6p21.1, respectivamente.

Para a seleção dos genes a serem considerados como candidatos a marcadores em CaP foram utilizados os seguintes critérios:

1) seleção de genes candidatos mapeados nas regiões alteradas: os genes foram primeiramente selecionados por estarem presentes nas regiões envolvidas em perda ou ganho genômico e, posteriormente, foram categorizados quanto à função, tipo de tecido onde se expressam e a possível associação destes genes com câncer de próstata ou outras neoplasias. Para isso foram utilizados o banco de dados *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>), *Pubmed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) e *OMIM* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>);

2) seleção dos genes candidatos envolvidos em redes biológicas: Os genes que estavam presentes nas regiões genômicas alteradas também foram analisados pelo estudo de redes biológicas. Estes genes candidatos foram investigados usando o banco de dados *Unified Human Interactome (UNIH)* (www.mdc-berlin.de/unihi) e o *software Cytoscape* (www.cytoscape.org), com o objetivo de identificar genes que mostrassem associações em redes biológicas. Foi também utilizado o banco de dados *HiMAP (Human Interactome Map)*, que possibilita a visualização das interações existentes entre os genes. A Tabela 3 apresenta um resumo dos dados obtidos nos estudos prévios do grupo e os genes candidatos. A Figura 1 apresenta as redes biológicas utilizadas para identificar os genes selecionados para confirmação dos dados prévios.

Tabela 3 - Alterações genômicas (perda ou ganho de sequência) detectadas por CGH cromossômico de alta resolução (HR-CGH) e/ou CGH-array e os genes candidatos selecionados para o presente estudo.

Região genômica	HR-CGH	CGH-array	Gene candidato	Função biológica
8p21	Perda	Não presente na plataforma**	<i>NKX3.1</i>	regulação do ciclo celular. Tem sido associados a eventos de apoptose, síntese de DNA e reparo a danos
8q24.21	Ganho	Ganho	<i>c-MYC</i>	progressão do ciclo celular, apoptose e transformação celular
20q12-q13	-	Não presente na plataforma**	<i>SRC*</i>	regulação do desenvolvimento embrionário e do crescimento celular
6p21.1	-	Ganho	<i>SRF*</i>	crescimento celular, apoptose e diferenciação celular

*Genes selecionados a partir da análise de redes biológicas; (-): alteração não identificada.

** Plataforma HB68 BAC platform (6K) (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, USA).

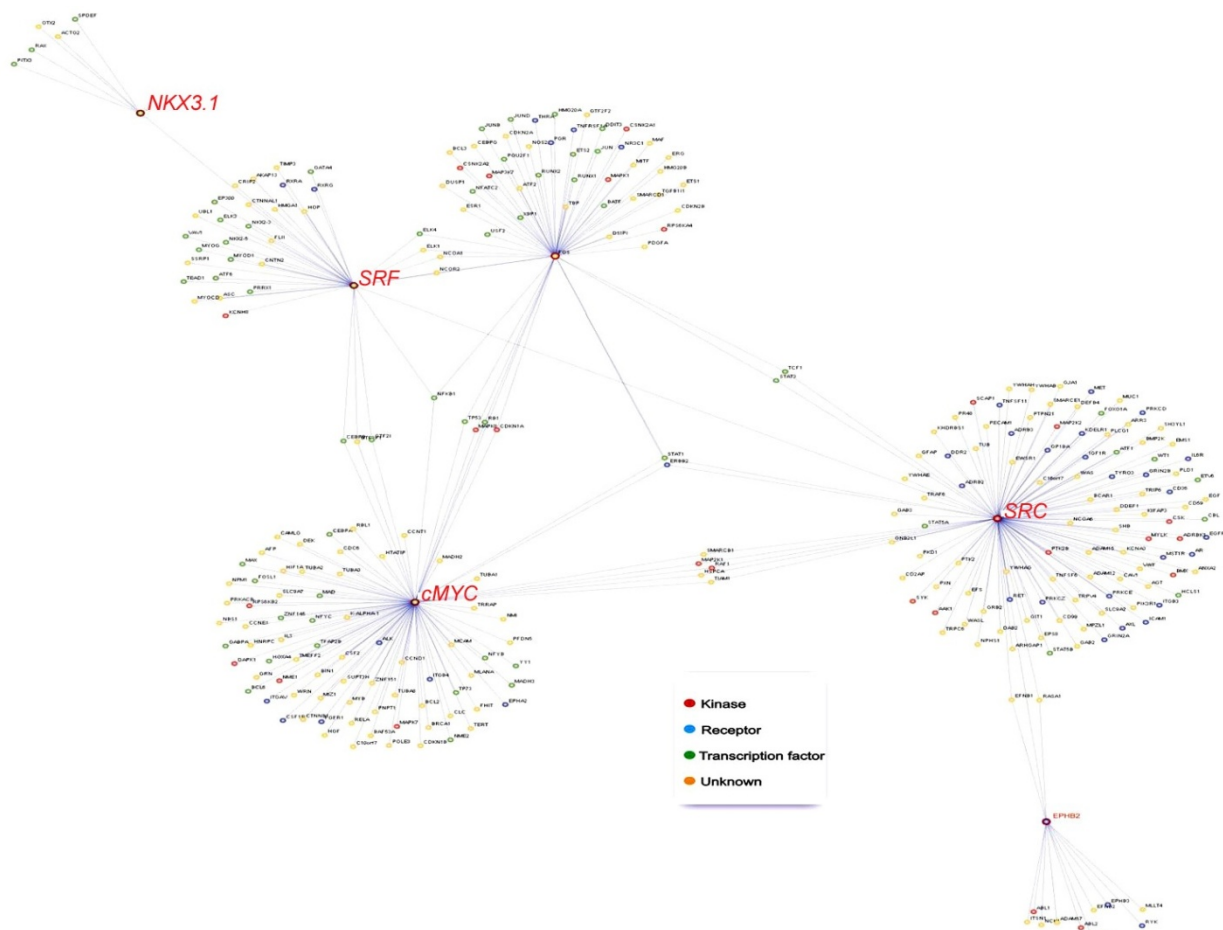


Figura 1 - Análise de redes biológicas, indicando os genes candidatos envolvidos no câncer de próstata após a análise dos genes significativos envolvidos em CaP por CGH-array. As linhas representam a conexão entre os genes. Os genes estão representados nas circunferências. Os genes que se encontram nas regiões centrais foram selecionados para o estudo.

3.3 PROCESSAMENTO DO TECIDO

As amostras a fresco de carcinomas prostáticos primários e não tratados, coletadas e armazenadas a -80°C foram macrodissecadas manualmente. A partir de cortes de congelação seqüenciais de 5 µm, realizado em criostato (*Leica*), foram preparadas lâminas como referência, sendo coradas com hematoxilina e eosina (*HE*). Utilizando-se microscópio óptico foi delimitada a área de maior concentração de células tumorais (>80%) e se procedeu a macrodissecção manual sob lupa estereoscópica. Para que o material permanecesse congelado, foi utilizado nitrogênio líquido durante o procedimento. A primeira e a última lâmina resultantes da porção da região macrodissecada foram coradas com hematoxilina-eosina para avaliação da concordância entre ambas em relação ao tecido isolado para estudo.

3.4 RT-PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Isolamento do RNA total

A extração de RNA total foi realizada com a utilização do *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante, nas amostras obtidas da Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP. Em resumo, aproximadamente 30mg de tecido tumoral foi pulverizado em cadinho com nitrogênio líquido. Após a pulverização, foram adicionados 600µL do tampão RLT para lise das células do tecido. Esse material foi transferido para um tubo de 2mL, agitado manualmente durante 1 minuto e centrifugado por 3 minutos a 13.200 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 350µL

de etanol 70% (preparado com água DEPC). Essa mistura foi transferida para a mini coluna acoplada em tubo coletor e centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Foram adicionados 700µL do tampão RW1 na mini coluna e centrifugou-se por 15 segundos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. A seguir, 500µL do tampão RPE foram adicionados na mini coluna e esta foi centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. A lavagem da mini coluna com o tampão RPE foi repetida mais uma vez. Após centrifugar a mini coluna por 2 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente, esta foi transferida para um tubo de 1,5mL e foram adicionados 15 a 25µL de água *RNase-free*, de acordo com a quantidade de amostra. A mini coluna acoplada ao tubo foi centrifugada por 1 minuto a 10.000 rpm em temperatura ambiente. O RNA foi incubado por 2 minutos a 65°C e em seguida colocado imediatamente em gelo. Para as amostras obtidas no Hospital AC Camargo, foram fornecidas alíquotas de RNA total do Biobanco do referido Hospital.

Obtenção de cDNA

Uma alíquota do RNA (1,5µL) de cada amostra foi avaliada em gel de agarose 2% acrescido com SYBR safe (Invitrogen) e as bandas de RNA, 18S e 28S, foram visualizadas em luz ultravioleta e quantificada por espectrofotometria (NanoDrop, MD – 1000, Spectrophotometer). As amostras foram diluídas a uma concentração final de 1µg/µL e a seguir tratadas com *DNaseI Amplification Grade* (Invitrogen - 1U/µL), antes da reação de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA).

A síntese do cDNA foi realizada em um volume final de 20µL contendo 5x *First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 10 mM de cada dNTP, 0,5µg/µL de Oligo (dT)₁₈, 0.1M ditioneitol (DTT) e 200U da transcriptase reversa *SuperScriptTM II* (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 60 min e a reação foi subsequentemente inativada por 15 min a 70°C. O cDNA foi estocado a -70°C.

RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

O desenho dos iniciadores para os genes alvo e endógeno foi realizado utilizando o *Software Primer Express 2.0* (*Applied Biosystems*). Primeiramente foi realizada uma análise *in silico* em bancos de dados públicos, como o *National Center for Biotechnology Information* (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) e o *Ensembl*, para verificar se estes genes se expressavam em tecido prostático e para avaliar a presença de possíveis isoformas. As seqüências *forward* e *reverse* dos iniciadores foram avaliadas pela ferramenta *BLAST* do site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), garantindo a especificidade dos iniciadores para cada gene a ser analisado pela qRT-PCR. Baseados em estudos prévios do grupo em carcinomas de próstata, três genes endógenos (*β-actina*, *GAPDH* e *HPRT*) foram testados para a normalização da expressão dos genes alvo, sendo selecionado o *HPRT* por ser mais estável. Para este propósito foi utilizado o programa *geNorm* (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). As seqüências dos iniciadores dos genes alvo e de referência estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Sequências de bases dos iniciadores utilizados nas qRT-PCR em tempo real dos genes *NKX3.1*, *c-MYC*, *SRC*, *SRF* e o gene endógeno *HPRT*.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
<i>NKX3.1</i>	5'-ACCGACCCAGAAAGGCACTT-3'	5'-GAGCGCTTCTGCGGCTG-3'
<i>c-MYC</i>	5'-GACTCTGAGGAGGAACAAGAAGATGAG-3'	5'-GCAGAAGGTGATCCAGACTCTGA-3'
<i>SRF</i>	5'-CGCTACACGACCTTCAGCAAG-3'	5'-CATAGGCCTTCTTGATGCC-3'
<i>SRC</i>	5'-CAAGGTGCCAAATTCAAAAT-3'	5'-GTCAGCAGGATCCCGAAGG-3'
<i>HPRT</i>	5' TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG3'	5' GGCCTCCCATCTCCTTCATC3'

As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços, contendo duplicatas de cada amostra e controle negativo, num volume final de 10µL para cada reação, sendo 5µL do reagente Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,2µL de cada iniciador 10µM (iniciadores *forward* e *reverse*) e 1 µL de cDNA (diluído 1:5).

Os genes alvos e o endógeno para cada amostra foram incluídos na mesma placa de reação. As condições de reação de amplificação para todos os iniciadores foram: 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15seg e 60°C por 1 min. Ao final de cada reação, a curva de dissociação para cada gene testado foi realizada de modo a observar a especificidade da reação por meio da identificação de um único pico referente a um único produto amplificado.

A fluorescência foi capturada e coletada a cada ciclo da PCR, sendo que a intensidade de fluorescência detectada foi diretamente proporcional à quantidade de cDNA da amostra. Os dados gerados foram analisados por um *software* específico (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência *versus* o número de ciclos. A análise de cada reação foi

realizada determinando primeiramente o *baseline*, que consiste na quantidade de fluorescência lida durante os ciclos iniciais da PCR, onde ocorre pouca alteração de sinal. O *software* desconta os valores dessa fluorescência basal. Em seguida, é determinado o *threshold*, que deve ser selecionado na fase exponencial da curva da PCR. O ponto em que ocorre a intersecção do *threshold* com a curva de amplificação é determinado como C_t , ou seja, o ciclo do *threshold*. Todas as amostras foram comparadas no mesmo *threshold*, porém o C_t varia de acordo com o ciclo em que a curva de amplificação cruza com o *threshold*. Assim, cada amostra apresenta um valor de C_t específico e que está relacionado com a quantidade de cDNA do gene em questão presente na amostra. A quantificação relativa (QR) é calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (C_t : ciclo do *threshold*; ΔC_t - C_t do gene alvo menos o C_t do gene endógeno (*HPRT*); $\Delta\Delta C_t$ - ΔC_t da amostra tumoral menos o ΔC_t da amostra normal). Para a análise dos dados foram considerados genes diferencialmente expressos nas amostras de CaP e tecido adjacente com ausência de neoplasia, aqueles que apresentaram QR (quantificação relativa) ≥ 2 (genes regulados positivamente) ou $QR \leq 0,5$ (genes regulados negativamente), em relação as amostras de próstata normais.

3.5 ELABORAÇÃO DA PLATAFORMA DE MICROARRANJOS DE TECIDOS (TMA)

Dois TMAs foram construídos contendo amostras de adenocarcinoma de próstata localizado. O primeiro (TMA6) foi elaborado com os mesmos casos de CaP que foram utilizados na análise de expressão gênica. Este TMA contém 31 amostras provenientes da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP e 33 do Hospital A.C.

Camargo, SP; como controle foram utilizados 23 casos de hiperplasia prostática benigna (HPB), nove tecidos adjacentes ao tumor e dois tecidos prostáticos normais. Este TMA foi montado com amostras em duplicata.

O segundo TMA (TMA7) contém 133 amostras de CaP e 23 HPB. Neste caso as duplicatas eram de diferentes blocos de parafina do mesmo caso. Os cortes foram extraídos de áreas previamente definidas, que representavam o escore de Gleason atribuído na avaliação histopatológica, utilizando um *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments[®], Silver Springs, USA).

Os cortes de tecidos com dimensão de 1.0mm de cada amostra foram colocados e organizados em blocos de parafina, com espaçamento de 0.2mm. Após a inserção de todos os casos, os blocos foram cortados em micrótomo, na espessura de 3µm e montados em lâminas convencionais com *organisilane* (3-aminopropyl triethoxy-silane) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA), mantidas em freezer a -20°C até o momento do uso.

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA POR IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ) EM MICROARRANJOS DE TECIDOS

A técnica de imunoistoquímica baseou-se no protocolo estabelecido pelo Laboratório de Imunoistoquímica do Hospital AC Camargo, SP, com o emprego de método indireto de visualização do anticorpo primário. Os protocolos da técnica de imunoistoquímica padronizados para cada anticorpo, seus clones e características estão apresentados na Tabela 5.

Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol e re-hidratados em álcool etílico em concentrações decrescentes e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0, em panela de pressão (Pascal). Em seguida, as lâminas foram resfriadas por 15 min a temperatura ambiente e lavadas em água corrente. As lâminas foram incubadas em três banhos de peróxido de hidrogênio 3% (10V) durante 5 min cada, para o bloqueio da peroxidase endógena e então lavadas em água corrente por 5 min. Os cortes foram submetidos ao bloqueio de proteínas inespecíficas com caseína (*Protein Block Serum-Free*, DakoCytomation, Carpinteria, USA) durante 20 min a temperatura ambiente.

Os cortes histológicos foram incubados com anticorpo primário (Tabela 5) durante 18 horas (*overnight*) horas em câmara úmida à 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em dois banhos com tampão PBS (do inglês, *phosphate buffer saline*) 1X, por 5 min cada. Em seguida foram incubadas com polímero Dextran para a detecção do sinal (Novocastra) e lavadas com PBS 3 vezes por 5 min cada. A coloração foi obtida utilizando-se 3,3' *diaminobenzidine tetrachloride* (DakoCytomation, Carpinteria, USA). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina Mayer e desidratados em concentrações crescentes de álcool e xilol. Em seguida, as lâminas foram montadas com resina e lamínula.

No controle negativo a incubação do anticorpo foi substituída por soro não imune e como controle positivo foi utilizado tecido recomendado pelo fabricante (Tabela 5). As análises da expressão proteica foram realizadas em microscópio óptico convencional equipado com câmara digital para o registro fotográfico, avaliando-se, de acordo com o anticorpo primário utilizado, a intensidade e/ou extensão das células positivas (Tabela 5).

Na avaliação da intensidade foram atribuídos escores de 1 a 3, sendo 1 reação de intensidade fraca, 2 intensidade moderada e 3 intensidade forte. Para a extensão utilizou-se escores de 1 a 3, sendo 1: 0 a 25% das células positivas; 2: 26 a 50% das células positivas; 3: > 50% das células positivas. Os dados foram analisados de acordo com o padrão de marcação de cada anticorpo, sua localização (citoplasmático ou nuclear) e tipos celulares imunomarcados (por exemplo: epitélio ou estroma).

Em casos de discordância entre os escores estabelecidos nas amostras em duplicata, uma segunda opinião foi obtida até obter um consenso nos resultados finais (patologistas envolvidas na análise: Dra. Renée Amorim e Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues). Para os oncogenes (c-MYC, SRC) atribuiu-se o maior escore de marcação de intensidade nuclear para o c-MYC e citoplasmática para o SRC. Como o ICAM1 é uma molécula de adesão, atribuiu-se o maior escore de marcação para a intensidade da membrana. Para os genes supressores atribuiu-se o menor escore de marcação de intensidade (TIMP3, DAB2, ATF1, NKX3.1, SRF e NCOA1) e extensão (ETV6, SRC). Para a análise estatística da expressão protéica foram feitos agrupamentos dos escores de acordo com o anticorpo primário utilizado e o padrão de imunomarcação obtido da análise da próstata normal.

Tabela 5 - Relação dos anticorpos primários utilizados na reação de imunoistoquímica, fornecedor, clone, tecido utilizado como controle positivo, padronização da técnica e tipo de avaliação dos resultados.

Anticorpo	Fornecedor	Clone	Controle Positivo	Tempo de Incubação	Temperatura	Diluição	Localização da Marcação	Avaliação feita	Escore da próstata normal
c-MYC	Neomarkers	Monoclonal 9E10.3	Linfoma de Burkitt's	18 horas	4°C câmara úmida	1:100	Nuclear	Intensidade	1
NKX3.1	Abcam	Policlonal	Câncer de Próstata	18 horas	4°C câmara úmida	1:25	Nuclear	Intensidade	2
SRF	Abcam	Policlonal	Câncer de Mama	18 horas	4°C câmara úmida	1:50	Nuclear	Intensidade	3
SRC	Abcam	Policlonal	Câncer de Mama	18 horas	4°C câmara úmida	1:200	Citoplasmática	Intensidade (E/S) Extensão (S)	E:1; S:2 S:4
TIMP3	Neomarkers	Policlonal	Placenta	18 horas	4°C câmara úmida	1:100	Citoplasmática	Intensidade	3
NCOA1	Life Span Bioscience	Policlonal	Próstata	18 horas	4°C câmara úmida	1:200	Citoplasmática	Intensidade	1
DAB2	Proteintech Group	Policlonal	Câncer de ovário	18 horas	4°C câmara úmida	1:100	Membrana	Intensidade	2
ICAM1	Abcam	Policlonal	Melanoma	18 horas	4°C câmara úmida	1:25	Membrana	Intensidade	0
ATF1	Abcam	Monoclonal EP1591(2)Y	Câncer de Mama	18 horas	4°C câmara úmida	1:400	Nuclear	Intensidade	2
ETV6	Abcam	Monoclonal	Placenta	18 horas	4°C câmara úmida	1:200	Nuclear	Extensão	4

E: Células epiteliais; S: Células estromais

Escores: Intensidade: 0- negativa, 1- fraca, 2 - moderada, 3 - intensa. Extensão: 1-0a 25% das células positivas, 2-26 a 50%, 3-51 a 75%, 4 ->76%

3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A gradação histológica dos tumores seguiu o sistema Gleason e o estadiamento foi dado pelo sistema TNM (EPSTEIN et al. 2005). Para fins de análise quanto ao risco de recorrência do tumor, os pacientes com CaP e submetidos a prostatectomia foram também estratificados em pacientes com risco baixo, moderado e alto de recorrência de acordo com os critérios sugeridos pelo *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*TM: *Prostate Cancer* (2010), apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Critérios considerados na análise de risco segundo características clínicas e morfológicas.

Risco de recorrência	Características clínicas e Morfológicas
Baixo	pT1-pT2a e escore de Gleason 2-6 e PSA < 10 ng/mL
Moderado	pT2b-pT2c ou escore de Gleason 7 ou PSA = 10 – 20 ng/Ml
Alto	pT3a ou pTxN1 ou pTx Nx M1 ou escore de Gleason 8-10 ou PSA > 20 ng/Ml

Fonte: Adaptado de *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*TM: *Prostate Cancer*, 2010.

Com relação ao escores de Gleason, as amostras de CaP com escore ≤ 7 (3+4) foram classificadas como de baixo grau e as com escore > 7 (4+3), como de alto grau (MCDONNELL et al. 2008). Os parâmetros invasão angiolinfática, margem cirúrgica comprometida e invasão de vesícula seminal foram obtidos após consulta dos laudos anatomo-patológicos. A extensão extra-prostática foi estabelecida com base no estadio pTNM. Os tumores pT2 (confinado ao interior da próstata) foram sub-classificados em pT2a (aqueles com 50% ou menos de envolvimento de um

lobo), pT2b (aqueles que envolvem mais de 50% de um lobo mas não os dois) ou pT2c (envolvem ambos os lobos). Os tumores foram classificados como pT2 quando apresentavam ausência de extensão extra-prostática (revisado por EPSTEIN et al. 2009). Os tumores pT3 (invasão extra-prostática) foram subdivididos em pT3a (com extensão extra-prostática uni ou bilateral) e pT3b (com invasão das vesículas seminais). Nos casos pT3 foi considerada a presença de extensão extra-prostática.

A utilização do PSA pós-cirúrgico para estratificação dos casos com e sem recorrência bioquímica baseou-se no uso potencial dos valores de PSA como indicadores prognósticos após prostatectomia radical. Para tanto, foi considerado como indicador de pior prognóstico o nível do PSA pós-cirúrgico maior ou igual a 0,2ng/mL em pelo menos duas análises, e que é utilizado na prática clínica dos dois serviços (Faculdade de Medicina de Botucatu e Hospital AC Camargo) em pacientes submetidos à cirurgia. A recorrência clínica foi considerada como o diagnóstico de metástase à distância.

Os resultados da expressão gênica e protéica foram comparados entre os diferentes tecidos analisados, e em relação aos parâmetros clínico-laboratoriais e anatomo-patológicos.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os valores de expressão gênica nos grupos amostrais e as variáveis clínicas e histopatológicas foram realizadas pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney* quando duas categorias foram avaliadas e pelo teste de *Kruskal-Wallis* quando três grupos foram comparados. As análises de correlação foram

realizadas pelo teste não paramétrico de *Spearman*. O teste de *qui-quadrado* ou *Fisher* foi aplicado para avaliar a força de associação entre as variáveis nas análises de expressão protéica. As probabilidades acumuladas de sobrevida livre de doença (SLD) foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier. Para a construção das curvas de sobrevida foi considerada como início do seguimento a data da prostatectomia, e como final do seguimento, a data da recidiva bioquímica para SLD. Para recidiva bioquímica foi considerada a data do primeiro exame de PSA com valor maior ou igual a 0,2ng/mL (persistente por mais de um exame) para o grupo que apresentou recidiva bioquímica e a data do último retorno para os pacientes sem recidiva bioquímica.

Todas as análises estatísticas consideraram o nível de significância de 5% e o *software* de análise utilizado foi o *Graphpad Prism* versão 3.0 e o SPSS versão 17.0.

RESULTADOS



4 RESULTADOS

Análises de expressão gênica nos tumores de próstata

Para a padronização das reações de cada gene foram construídas curvas-padrão a partir de diluições seriadas de um *pool* de cDNA obtido a partir de amostras de tumores e tecidos normais (SVO). A eficiência de reação dos genes alvo *c-MYC*, *NKX3.1*, *SRF* e *SRC* e do gene endógeno *HPRT* foram superiores a 90%. As curvas de amplificação e dissociação para esses genes estão apresentadas na Figura 2.

A expressão gênica de *c-MYC*, *NKX3.1*, *SRF* e *SRC* foi avaliada nos tumores de próstata (CaP), tecidos adjacentes não neoplásicos (TecAdj) em comparação com os tecidos prostáticos normais (N). Para todos os transcritos testados foi considerado aumento de expressão quando $QR \geq 2$ e diminuição quando $QR \leq 0,5$.

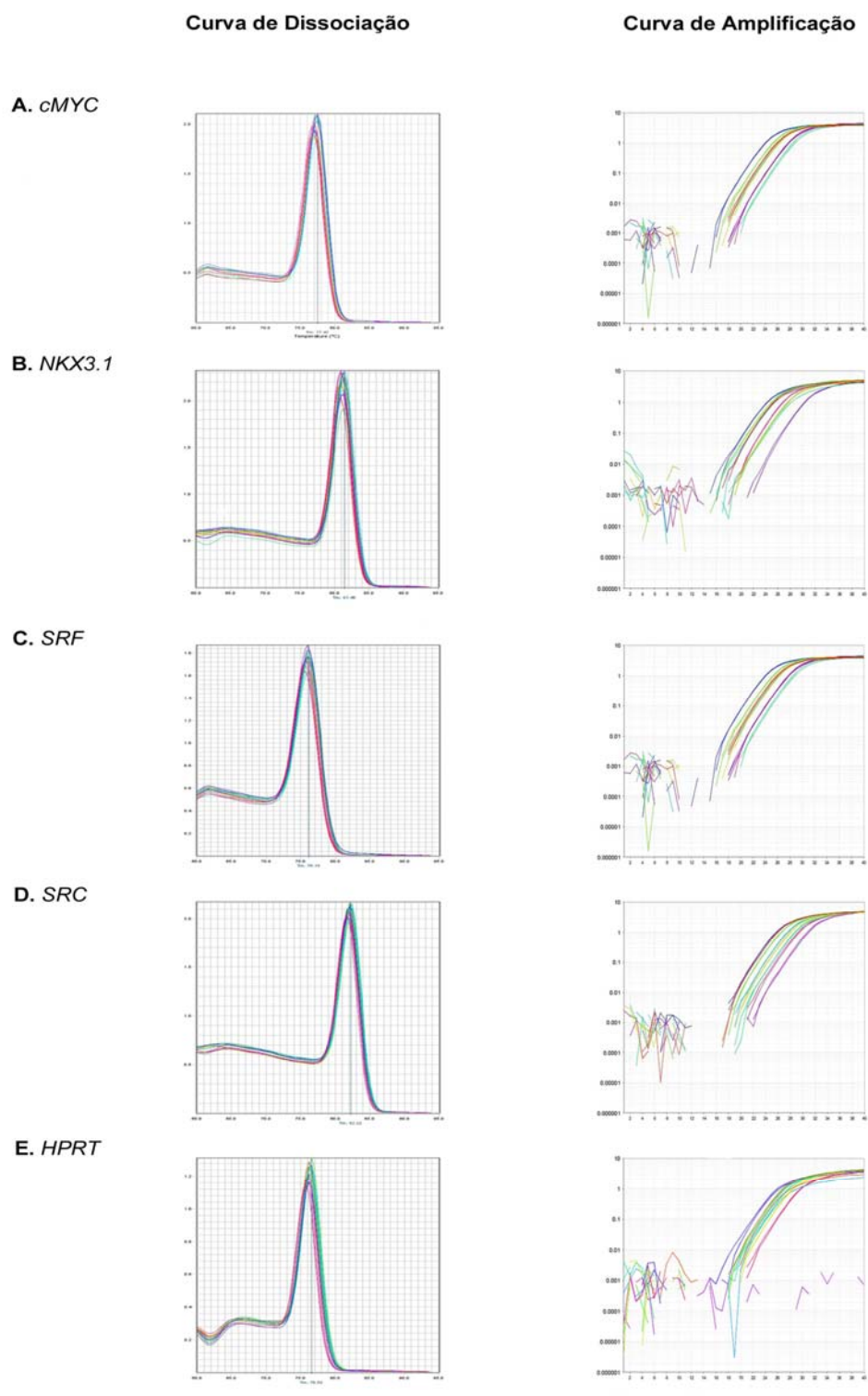


Figura 2 - Curvas de amplificação e dissociação para os genes alvo *c-MYC* (A), *NKX3.1* (B), *SRF* (C), *SRC* (D) e para o gene de referência *HPRT* (E).

c-MYC

Análises dos níveis de transcritos de *c-MYC* em tumores de próstata

O aumento de expressão do oncogene *c-MYC* foi detectado em 87% (83/95) das amostras de CaP e em 78% (7/9) das amostras de tecido não-neoplásico adjacente ao tumor (Tec Adj). Foi detectado aumento significativo da expressão de *c-MYC* nos tumores em comparação com os demais tecidos avaliados ($P=0,0029$, teste de *Kruskal-Wallis*). Foram detectados níveis mais altos de *c-MYC* nos CaP em comparação ao TecAdj ($P=0,0084$, teste de Mann-Whitney). A demonstração gráfica desses resultados está apresentada na Figura 3.

Em um caso pareado (caso 88) foi possível avaliar os níveis de expressão no tecido tumoral e no tecido não neoplásico adjacente deste mesmo tumor. Nesta comparação detectou-se aumento dos níveis de transcritos tanto no tumor (QR=5,61) quanto para no tecido adjacente (QR=4,57).

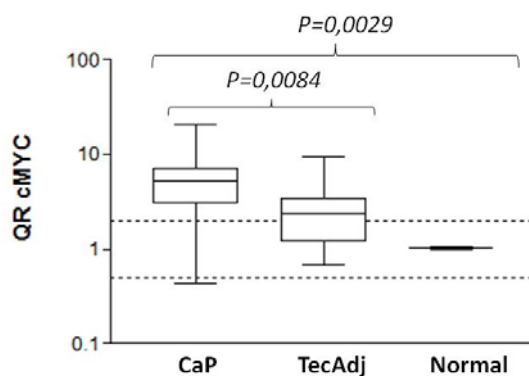


Figura 3 - Níveis de transcritos *c-MYC* em amostras de tumores de próstata (CaP), tecidos adjacentes não-neoplásicos (TecAdj) e próstatas normais (Normal). Foi detectada diferença significativa entre os níveis desses transcritos nos três grupos avaliados ($P=0,0029$, teste de *Kruskal-Wallis*) e na comparação entre CaP e TecAdj ($P=0,0084$, teste de Mann-Whitney).

Associação entre os níveis de expressão do gene *c-MYC* e as variáveis clínico-histopatológicas

A comparação entre os níveis de expressão do *c-MYC* e as variáveis clínico-histopatológicas revelou uma associação significativa com o estadió patológico. Níveis mais altos de *c-MYC* foram detectados nos tumores de pacientes com estadió pT2 em comparação com os tumores de estadió pT3/T4 ($P=0,0388$, Figura 4A). Foi detectada uma associação marginalmente significativa entre os níveis de transcritos mais altos e tumores com ausência de extensão extra-prostática ($P=0,0471$), porém observou-se uma grande dispersão nos níveis de QR dos tumores de pacientes com presença de extensão extra-prostática (Figura 4B). As demais variáveis clínicas e histopatológicas avaliadas não mostraram diferença significativa na comparação com os níveis de expressão do gene (Anexo I).

O grupo de 83 CaP (83/95 - 87%) com aumento de expressão gênica de *c-MYC* apresentou média de idade de 62 anos e ausência de história familiar de câncer de próstata foi detectada em 58/83 casos. A média do PSA pré-operatório foi de 9,8 ng/mL e 75% deles (62/83) apresentaram altos escores de Gleason [$\geq 7(4+3)$], 28% dos pacientes (23/83 pacientes) apresentaram recidiva bioquímica (PSA pós-operatório $\geq 0,2$ ng/mL). Destes 83 casos com aumento de expressão, apenas dois (220F1 e 207F1) evoluíram para metástase.

Um caso dentre os 95 avaliados apresentou diminuição de expressão do gene *c-MYC* (QR=0,43), este paciente de 61 anos com características clínicas e histopatológicas de pior prognóstico (PSA pré-cirúrgico=16,9ng/mL; Gleason 8(5+3); pT2c) não apresentou recidiva bioquímica em 21 meses de seguimento

clínico. Foi observada expressão normal em 11/95 casos, e entre estes, um caso (15T) apresentou recidiva bioquímica.

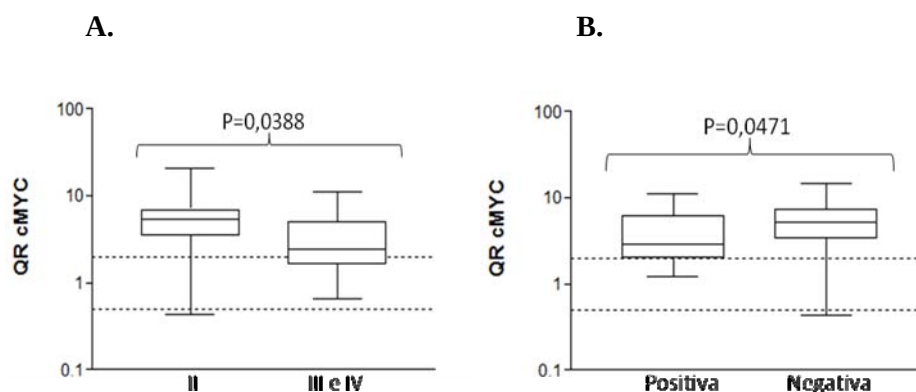


Figura 4 - Níveis de expressão do transcrito *c-MYC* nos tumores de próstata em relação: **A.** ao estadio patológico (II versus III e IV) ($P=0,0388$, teste de Mann-Whitney) e **B.** extensão extra-prostática (positiva versus negativa) ($P=0,0471$, teste de Mann-Whitney).

Análise de expressão da proteína c-MYC em tumores de próstata e a associação com as variáveis clínico-histopatológicas

O padrão imunomarcção da proteína c-MYC foi nuclear em todas as amostras testadas (próstata normal, HPB, carcinomas e TecAdj). Observou-se também imunomarcção citoplasmática em todas as amostras (Figura 5), que não foi considerada nas análises. A próstata normal apresentou marcação nuclear de intensidade fraca (escore 1). Considerou-se as intensidades moderada e forte (escores 2 e 3) como aumento de expressão protéica, em relação a próstata normal.

Noventa e um por cento dos CaP e HPB apresentaram aumento de expressão protéica. Já o TecAdj apresentou aumento de expressão protéica de c-MYC em 56% dos tecidos avaliados, com diferença estatística significativa em relação as afecções prostáticas avaliadas ($P<0,014$, Tabela 7). Os tumores apresentaram níveis de c-MYC significativamente aumentados em relação às amostras de Tec Adj ($P=0,002$). O mesmo foi observado em relação às amostras de HPB comparadas ao Tec Adj

($P=0,034$). Não foi observada diferença nos níveis de c-MYC entre CaP e HPB ($P=0,99$).

A correlação entre os escores de expressão protéica e variáveis clínico-histopatológicas não revelou resultados estatisticamente significativos para maioria das variáveis testadas (Tabela 8). As mesmas análises agrupando as intensidades moderada e intensa de c-MYC considerado como aumento de expressão protéica em relação à próstata normal também não apresentou resultados estatisticamente significativos. No entanto, menores níveis de c-MYC foram associados significativamente com o escores de Gleason mais altos ($P=0,02$, Tabela 8). A análise agrupando as intensidades moderada+intensa *versus* negativa+fraca confirmou que níveis mais baixos de c-MYC estavam associados com escores de Gleason mais altos ($P=0,008$).

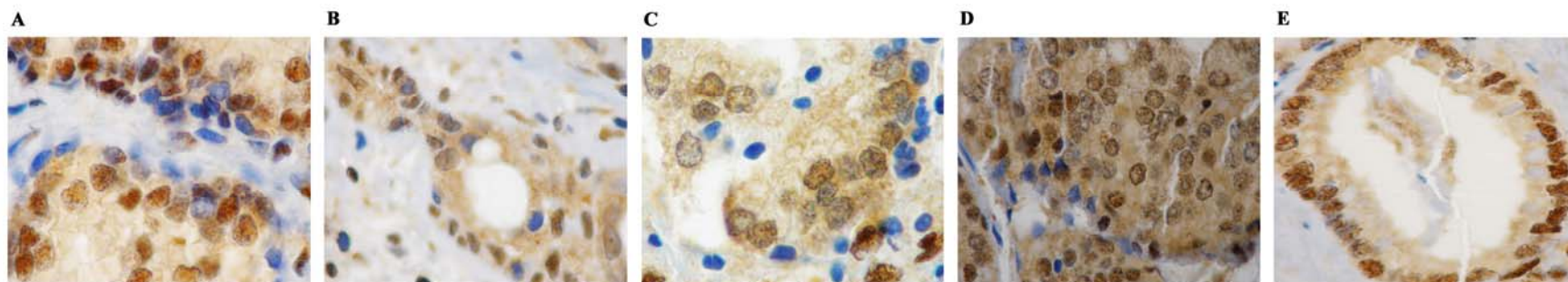


Figura 5 - Imunomarcaco nuclear da proteína c-MYC. **(A)** Próstata normal: epitélio glandular com núcleos positivos e discreta marcação. IMH100X; **(B)** HPB: epitélio glandular com núcleos positivos e moderada marcação citoplasmática; **(C)-(E)** Adenocarcinoma de próstata: **(C)** fraca marcação nuclear nas células epiteliais neoplásicas; **(D)** intensa marcação nuclear nas células epiteliais; **(D)** intensa marcação nuclear nas células epiteliais, além de moderada imunoreatividade citoplasmática; **(E)** cinos neoplásicos com marcação nuclear intensa e citoplasmática. (IMH 100X).

Tabela 7 - Resultados da análise da expressão da proteína c-MYC (nuclear) detectada pela técnica de imunoistoquímica em carcinomas de próstata (CaP), tecidos prostáticos não neoplásicos adjacentes (Tec Adj) e hiperplasias prostáticas benignas (HPB) avaliada pela intensidade de marcação nos tecidos.

Amostras	c-MYC (nuclear) n (%)			P *
	Fraca	Moderada	Intensa	
CaP (n=191) ^{a, b}	18 (9)	80 (42)	93 (49)	0,014
HPB (n=23) ^c	2 (9)	10 (43)	11 (48)	
Tec Adj (n=9)	4 (44)	4 (44)	1 (12)	

*Teste de Qui-quadrado

^a CaP *versus* HPB – $P=0,99$; ^b CaP *versus* Tec Adj – $P=0,002$; ^c HPB *versus* Tec Adj – $P=0,034$ (Teste de Qui-quadrado)

Tabela 8 - Comparação entre a intensidade de marcação nuclear de c-MYC detectada por imunohistoquímica (IHQ) nos carcinomas de próstata (CaP) e as variáveis clínico-histopatológicas.

Variáveis	N	c-MYC IHQ intensidade nuclear n (%)		P*
		Fraca	Moderada + Intensa	
Idade				0,80
≤ 60	83	7 (8)	76 (92)	
> 60	107	11 (10)	96 (90)	
História Familiar				0,86
Negativa	146	14 (10)	132 (90)	
Positiva	40	3 (8)	37 (92)	
PSA (ng/mL)				0,20
≤ 4.0	13	1 (8)	12 (92)	
4 -10	101	5 (5)	96 (95)	
>10	75	11 (15)	64 (85)	
Gleason				0,02
< 7 (3+4)	165	12 (7)	153 (93)	
≥ 7 (4+3)	25	6 (24)	19 (76)	
Estádio Patológico				0,96
II	94	8 (9)	86 (91)	
III e IV	94	9 (10)	85 (90)	
Risco de recorrência				0,61
Baixo	45	2 (5)	43 (95)	
Moderado	107	10 (9)	97 (91)	
Alto	36	5 (14)	31 (86)	
Margem				0,11
Negativa	121	7 (6)	114 (94)	
Positiva	68	10 (15)	58 (85)	
Extensão extra-prostática				0,30
Negativa	147	11 (7)	136 (93)	
Positiva	41	6 (15)	35 (85)	
Invasão angiolinfática				0,13
Negativa	146	10 (7)	136 (93)	
Positiva	43	7 (16)	36 (84)	

Cont/ Tabela 8

Invasão Vesicular					0,94
Negativa	167	15 (9)	152 (91)		
Positiva	22	2 (10)	20 (90)		
Recidiva bioquímica					0,71
Negativa	75	7 (10)	64 (90)		
Positiva	115	10 (9)	105 (91)		
Linfonodos comprometidos					0,25
Negativa	174	15 (9)	159 (91)		
Positiva	10	2 (20)	8 (80)		
Metástase					0,89
Negativa	172	15 (9)	157 (91)		
Positiva	18	2 (12)	16 (88)		
Invasão Vesicular					0,94
Negativa	167	15 (9)	70 (42)	82 (49)	
Positiva	22	2 (10)	10 (45)	10 (45)	
Recidiva bioquímica					0,71
Negativa	75	7 (10)	34 (45)	34 (45)	
Positiva	115	10 (9)	46 (40)	59 (51)	
Linfonodos comprometidos					0,25
Negativa	174	15 (9)	74 (43)	85 (48)	
Positiva	10	2 (20)	2(20)	6(60)	
Metástase					0,89
Negativa	172	15 (9)	72(42)	85 (49)	
Positiva	18	2 (12)	8 (44)	8 (44)	

* Teste de Mann-Whitney, comparação entre os grupos com escore de imunoistoquímica fraco versus moderado e intenso.

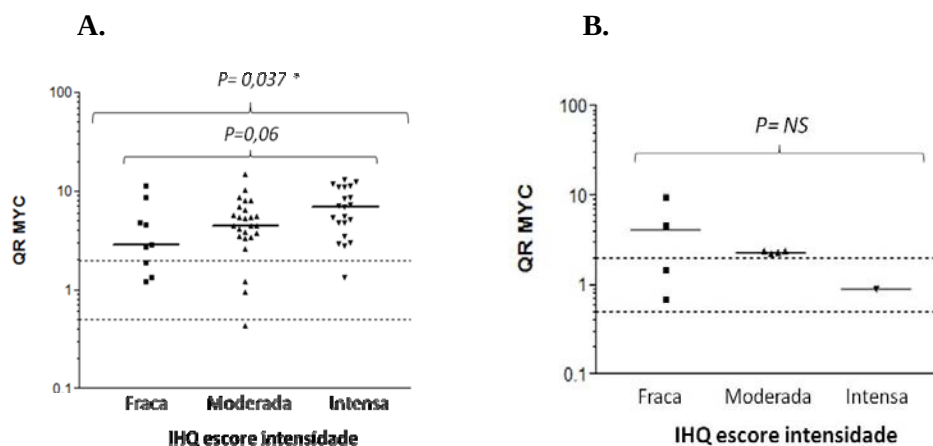
Obs.: As diferenças no número de indivíduos avaliados para cada parâmetro se devem à ausência de informações clínicas ou histopatológicas em alguns casos.

Correlação entre os resultados da expressão do transcrito e da proteína c-MYC

Foram comparados os resultados de expressão do transcrito e proteica em amostras pareadas de 58 CaP e 9 TecAdj, onde foi possível realizar os dois ensaios (Figura 6). No grupo CaP, foram detectados resultados concordantes em 83% das amostras, que apresentaram aumento de expressão gênica (QR>2,0) e proteica

(marcação nuclear moderada e intensa, escores 2 e 3). Observam-se níveis mais baixos de transcritos ($QR < 0,5$) nos tumores com expressão proteica fraca (escore 1) e foi observada diferença estatística entre os níveis de transcrito entre os grupos de intensidade de imunomarcação fraca e intensa ($P=0,037$, teste de Mann-Whitney, Figura 6A). Por outro lado, em 17% dos casos foi detectado resultado discordante entre o os resultados de expressão gênica e proteica. Em seis casos com marcação proteica fraca detectou-se aumento de expressão gênica, e apenas um caso com expressão do transcrito normal apresentava marcação intensa. O único caso com diminuição de expressão gênica apresentou intensidade de marcação moderada para c-MYC. Dois casos apresentavam expressão gênica normal e proteica moderada.

Não foi possível detectar uma associação entre os níveis de mRNA e de proteína nos tecidos adjacentes não neoplásicos (TecAdj) provavelmente pelo número pequeno de amostras avaliadas e pela dispersão dos valores de QR nestas amostras ($n=9$, Figura 6B).



A. Foi detectada diferença entre os níveis de transcritos nos três grupos de tumores avaliados de acordo com os níveis proteicos, porém sem diferença estatística ($P=0,06$, teste de Kruskal-Wallis). Diferença significativa foi observada entre tumores com escore fraco *versus* tumores com escore intenso ($P=0,037^*$, teste de Mann-Whitney).

B. Não foi observada diferença significativa entre os níveis de transcritos nos três grupos de TecAdj de acordo com os níveis de expressão proteica.

Figura 6 - Comparação entre os níveis de expressão gênica e proteica de c-MYC nos tumores de próstata (**A**) e tecidos adjacentes (TecAdj) não neoplásicos (**B**).

NKX3.1

Análises dos níveis de transcritos do gene *NKX3.1* em carcinomas de próstata

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis dos transcritos de *NKX3.1* na comparação entre CaP e Tec Adj ($P=0,133$, teste de Mann-Whitney, Figura 7). Níveis diminuídos de *NKX3.1* foram detectados em 34% (31/92) das amostras tumorais e em 67% (6/9) dos tecidos adjacentes. Em 61% (56/92) dos tumores foi detectada expressão normal. O aumento de expressão foi observado em apenas 5% (5/92) dos CaPs e em nenhuma amostra de Tec Adj. Na análise do gene *NKX3.1* nas qRT-PCR foi descartada a amostra de tecido prostático normal SVO1 pelo fato do DNA disponível estar degradado e ter sido observado produto de amplificação inespecífica.

O caso 88, pode ser avaliado para expressão de *NKX3.1* tanto no tecido tumoral quanto no tecido não neoplásico adjacente ao tumor e apresentou expressão normal em ambos os tecidos (QR= 0,68 e QR=0,69, respectivamente).

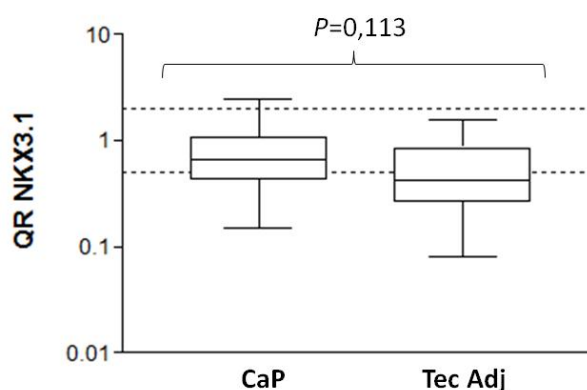


Figura 7 - Níveis de transcritos *NKX3.1* em amostras de tumores de próstata (CaP) e tecidos adjacentes não-neoplásicos (TecAdj). Não foi observada diferença significativa entre os níveis de transcritos detectados nos dois grupos CaP e TecAdj ($P=0,133$, teste de Mann-Whitney).

Associação entre os níveis de expressão gênica de *NKX3.1* e as variáveis clínico-histopatológicas.

Níveis reduzidos dos transcritos foram detectados nos tumores de pacientes com ausência de história familiar de câncer de próstata ($P=0,027$; Figura 8). As demais variáveis avaliadas não mostraram resultados estatisticamente significativos. O grupo de tumores com diminuição de expressão (34%) apresentou, em geral, valores altos de PSA pré-operatório (13/31 casos com $\text{PSA}>10\text{ng/mL}$), 48% (15/31) apresentaram estadios pT3 e pT4 e 23% (7/31) apresentaram recidiva bioquímica. Nenhum destes casos desenvolveu metástase durante o seguimento clínico.

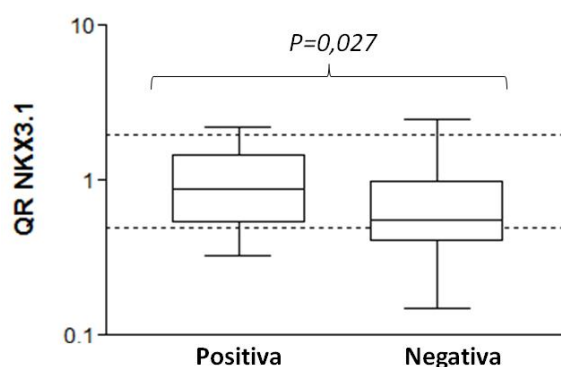


Figura 8 - Análise dos níveis de expressão do *NKX3.1* em tumores de próstata em relação à história familiar (positiva versus negativa) ($P=0,027$, teste de Mann-Whitney).

Análise de expressão da proteína *NKX3.1* em tumores de próstata e a associação com as variáveis clínico-histopatológicas

Na próstata normal a expressão de *NKX3.1* é nuclear de intensidade moderada (score 2). Foi considerado como diminuição da expressão proteica a intensidade de imunomarcacão fraca (score 1) ou ausente na comparação com a próstata normal. Foi observada marcação citoplasmática em casos sem marcação nuclear e naqueles com intensidade de marcação nuclear fraca (Figura 10). Seguindo

os mesmos critérios adotados em literatura para avaliação desta proteína (BETHEL et al. 2006), foi considerada para análise a marcação nuclear nos tecidos prostáticos.

A expressão intensa e moderada da proteína NKX3.1 (considerada como padrão de marcação normal baseado no observado em próstata normal) foi verificado em 7% dos CaP, sendo que 93% dos casos mostraram expressão ausente ou fraca. As amostras de HPB apresentaram ausência de imunomarcação em 30% dos tecidos e marcação de intensidade fraca em 70% delas (Tabela 9). Observa-se na Tabela 9 que todos os tecidos avaliados apresentam diminuição da expressão protéica, no entanto, diminuição significativa da expressão de NKX3.1 foi observada nos tumores em comparação com HPB ($P=0,003$) e nas amostras de Tec Adj em relação aos HPB ($P=0,027$). Por outro lado, não foi detectada diferença entre CaP e Tec Adj ($P=0,56$).

Foram comparados os níveis de expressão proteica detectados nos tumores com as características clínicas e histopatológicas dos pacientes e não foi observada diferença significativa nestas análises (Tabela 10). Foi detectada maior frequência de casos com marcação negativa entre os tumores com extensão extra-prostática (75%) em comparação com os tumores com ausência de extensão extra-prostática (55%), no entanto, sem significância estatística ($P=0,060$). Expressão protéica de intensidade moderada e intensa foi observada exclusivamente nos CaP ($n=13$), sendo que todos os casos apresentavam escore de Gleason baixo [$<7(3+4)$]. Estas análises foram refeitas reagrupando os escores ausente/fraca (expressão diminuída) e moderada/intensa (expressão aumentada) e novamente não se observou diferenças significativas.

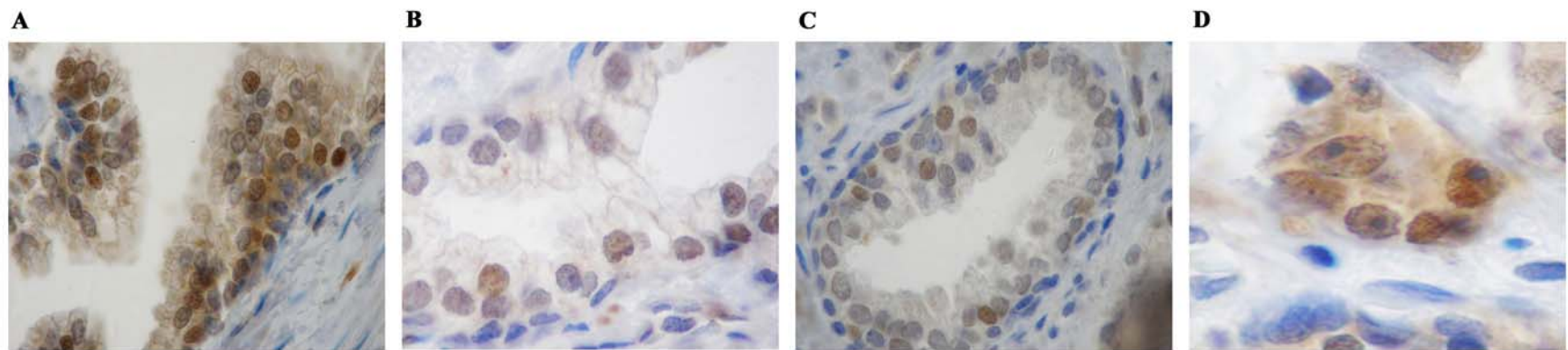


Figura 9 - Imunomarcção nuclear da proteína NKX3.1. **(A)** Próstata normal: marcação nuclear no epitélio glandular, presença de núcleo positivo; **(B)** Adenocarcinoma de próstata: marcação nuclear de intensidade fraca; **(C)** Adenocarcinoma de próstata: moderada marcação nuclear; **(D)** Adenocarcinoma de próstata: intensa marcação nuclear. (IMH 100X).

Tabela 9 - Expressão nuclear da proteína NKX3.1 detectada por imunoistoquímica (IHQ), em carcinomas de próstata (CaP), tecidos adjacentes prostáticos não neoplásicos (Tec Adj) e hiperplasias prostáticas benignas (HPB) de acordo com a intensidade de marcação.

Amostras	NKX3.1 (nuclear) n (%)			P *
	Negativa	Fraca	Moderada/ Intensa	
CaP (n=188) ^{a, b}	110 (59)	64 (34)	14 (7)	0,011
HPB (n=23) ^c	7 (30)	16 (70)	-	
Tec Adj (n=8)	6 (75)	2 (25)	-	

*Teste de Qui-quadrado.

^aCaP *versus* HPB – $P=0,003$; ^b CaP *versus* Tec Adj – $P=0,56$; ^c HPB *versus* Tec Adj – $P=0,027$ (Teste de Qui-quadrado)

Tabela 10 - Resultados da comparação entre os dados clínico-histopatológicos e da expressão da proteína NKX3.1 segundo a intensidade de marcação nuclear por imunoistoquímica (IHQ) nos carcinomas de próstata (CaP).

Variáveis	NKX3.1				P*
	N	IHQ intensidade n (%)			
Idade					0,80
≤ 60	82	48 (59)	29 (35)	5 (6)	
> 60	106	62 (58)	35 (33)	9 (9)	
História Familiar					0,32
Negativa	145	85 (59)	51 (35)	9 (6,2)	
Positiva	38	22 (58)	11 (29)	5 (13)	
PSA (ng/mL)					0,94
≤ 4.0	13	7 (54)	5 (38)	1 (8)	
4 -10	98	56 (57)	34 (35)	8 (8)	
>10	75	47 (63)	23 (30)	5 (7)	
Gleason					0,26
< 7 (3+4)	163	93 (57)	56 (34)	14 (9)	
≥ 7 (4+3)	25	17 (68)	8 (32)	-	
Estádio Patológico					0,19
II	94	49 (52)	37 (39)	8 (9)	
III e IV	92	60 (65)	26 (28)	6 (7)	
Risco de recorrência					0,18
Baixo	43	24 (56)	15 (35)	4 (9)	
Moderado	107	59 (55)	38 (36)	10 (9)	
Alto	36	27 (75)	9 (25)	-	
Margem					0,39
Negativa	119	66 (56)	44 (37)	9 (7)	
Positiva	67	44 (66)	19 (28)	4 (6)	
Extensão extra-prostática					0,06
Negativa	145	79 (55)	55 (38)	11(7)	
Positiva	40	30 (75)	8 (20)	2 (5)	
Invasão angiolinfática					0,12
Negativa	143	83 (58)	47 (33)	13 (9)	
Positiva	43	27 (63)	16 (37)	-	

Cont/ Tabela 10

<i>Invasão Vesicular</i>					0,38
Negativa	164	94 (57)	58 (35)	12 (8)	
Positiva	22	16 (73)	5 (23)	1 (4)	
<i>Recidiva bioquímica</i>					0,36
Negativa	72	45 (63)	24 (33)	3 (4)	
Positiva	115	65 (57)	39 (34)	11 (9)	
<i>Metastase</i>					0,94
Negativa	169	99 (59)	57 (34)	13 (7)	
Positiva	18	11 (62)	6 (33)	1 (5)	

* Teste de Qui-quadrado

Obs.: As diferenças no número de indivíduos avaliados para cada parâmetro se devem à ausência de informações clínicas ou histopatológicas em alguns casos.

Correlação entre a expressão do transcrito e da proteína NKX3.1

Não foi detectada diferença significativa quando se comparou os níveis de expressão gênica com o padrão de expressão da proteína NKX3.1 nas amostras pareadas de tumores (n=54) e tecidos adjacentes (n=8) (Figuras 10A e 10B, respectivamente).

A análise comparativa entre a expressão do transcrito e da proteína revelou um padrão normal em 55% (30/54) dos carcinomas de próstata, desses 23 casos (76%) mostraram marcação negativa para a proteína. Dentre os tumores com aumento de expressão dos transcritos (n=4), dois casos apresentaram marcação nuclear negativa e dois casos marcação positiva (um com intensidade fraca e um com intensidade moderada/intensa). Foram detectados resultados concordantes entre a expressão diminuída dos transcritos e da proteína, onde 70% dos casos com diminuição de expressão gênica (14/20) apresentaram marcação negativa ou fraca da proteína.

Entre os TecAdj, 75% dos casos (6/8) apresentaram resultados concordantes, confirmando a diminuição dos níveis dos transcritos como também a redução da expressão protéica (negativa/fraca). Apenas dois casos (2/8) apresentaram expressão gênica normal, sendo um com expressão protéica negativa e outro com expressão proteica de intensidade moderada.

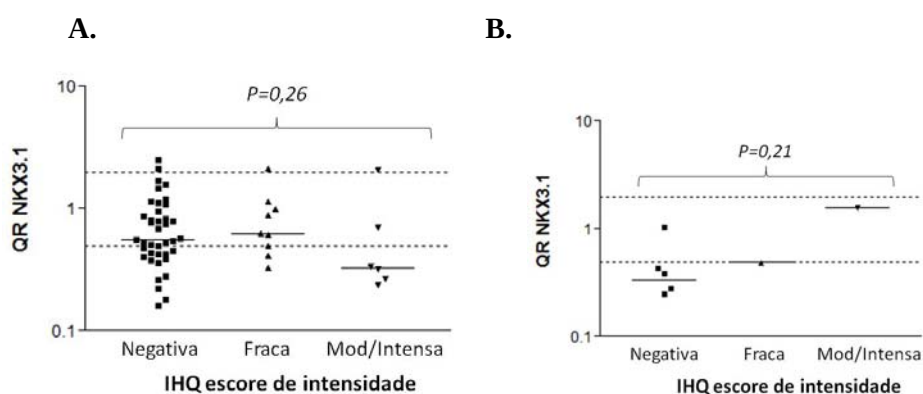


Figura 10 - Comparação entre os níveis de expressão gênica e da proteína NKX3.1 nos tumores de próstata (A) e tecidos adjacentes não neoplásicos (B). Não foram observadas diferenças significativas nestas comparações $P=0,26$ (A) e $P=0,21$ (B), teste de *Kruskal Wallis*.

SRF

Análises dos níveis de transcritos do gene *SRF* em carcinomas de próstata

Os CaP e os TecAdj apresentaram níveis semelhantes do transcrito *SRF* quando comparados com os níveis detectados nos tecidos prostáticos normais, como evidenciado pelas medianas de QRs detectadas nos três grupos ($P=0,8239$, Figura 11).

A diminuição de expressão deste gene foi observada em 25% (24/95) dos CaPs e aumento em 11%(10/95) dos casos. O restante dos casos (64%) apresentou níveis de expressão normal para *SRF*.

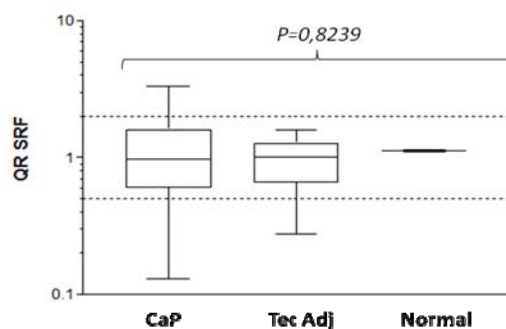


Figura 11 - Níveis de transcritos do gene *SRF* em amostras de adenocarcinomas de próstata (CaP), tecidos adjacentes não-neoplásicos (TecAdj) e tecidos normais (Normal). Não foram observadas diferenças significativas nesta comparação ($P=0,8239$, teste de Kruskal-Wallis).

Associação entre os níveis de expressão do transcrito *SRF* e as variáveis clínico-histopatológicas

Níveis significativamente diminuídos de *SRF* foram detectados nos tumores com estadios mais avançados (pT3 e pT4) em comparação com tumores com estadio pT2 ($P=0,0325$; Figura 12A). Observou-se ainda que níveis menores dos transcritos de *SRF* estavam associados com tumores com extensão extra-prostática ($P=0,0355$; Figura 12B). As demais variáveis avaliadas não apresentaram associações estatisticamente significativas (Anexo I).

Entre os tumores com aumento de expressão gênica (10/95 casos, 11%) observou-se que: a) 90% apresentavam escore de Gleason baixo; b) 100% tinham ausência de extensão extra-prostática e invasão vesicular; c) 30% apresentaram recidiva bioquímica, porém nenhum evoluiu para metástase.

Vinte e cinco por cento dos casos (24/95) apresentaram recidiva bioquímica, sendo que dentre eles, diminuição de expressão gênica foi detectada em 33% dos tumores (8/24) e apenas um caso (200F1) evoluiu para metástase.

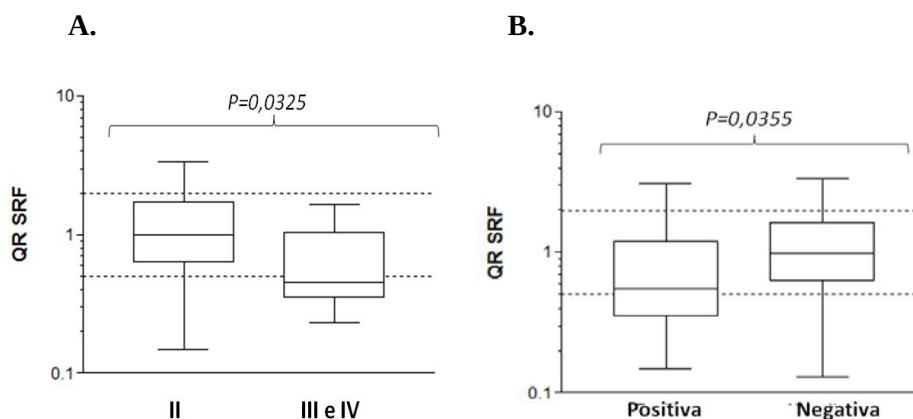


Figura 12 - Níveis de expressão do gene *SRF* em tumores de próstata em relação: **A.** ao estadiopatológico (II *versus* III e IV); e **B.** à extensão extra-prostática (positiva *versus* negativa).

A. Foi detectada diferença estatística entre os níveis de transcritos na avaliação do estadiopatológico II *versus* III e IV ($P=0,032$, teste de Mann-Whitney).

B. Diferença significativa foi observada entre tumores com extensão extra-prostática positiva *versus* negativa ($P=0,035$, teste de Mann-Whitney).

Análise de expressão protéica para o gene *SRF* em tumores de próstata e a associação com as variáveis clínico-histopatológicas

Na próstata normal a proteína SRF mostrou padrão de imunomarcacão citoplasmática com intensidade forte (escore 3), sendo considerado diminuicão da expressão protéica deste supressor tumoral em relacão ao padrão da próstata normal os casos com intensidades fraca e moderada. Altos níveis de SRF foram detectados tanto nos tecidos tumorais quanto nos tecidos não neoplásicos (Tec Adj e HPB), sem diferenças significativas entre eles (Figura 13, Tabela 11). Não foi observada qualquer associação entre o padrão de expressão da proteína e as variáveis clínicas e histopatológicas (Tabela 12).

Correlação entre a expressão gênica e protéica

As análises estatísticas para a comparação entre expressão gênica e proteica de SRF não foram realizadas, uma vez que 100% dos casos pareados de tumores e

Tec Adj (58 CaP e 8 TecAdj) mostraram expressão proteica intensa. Níveis de expressão gênica normais foram detectados em 60% dos tumores, expressão diminuída em 31% e aumentada em 9%. Expressão gênica normal foi detectada em 88% dos Tec Adj e aumentada em 12%. Esses resultados demonstram que houve concordância entre a expressão gênica (normal e aumentada) e a proteica (intensa marcação) em 69% das amostras de CaP e 100% dos TecAdj.

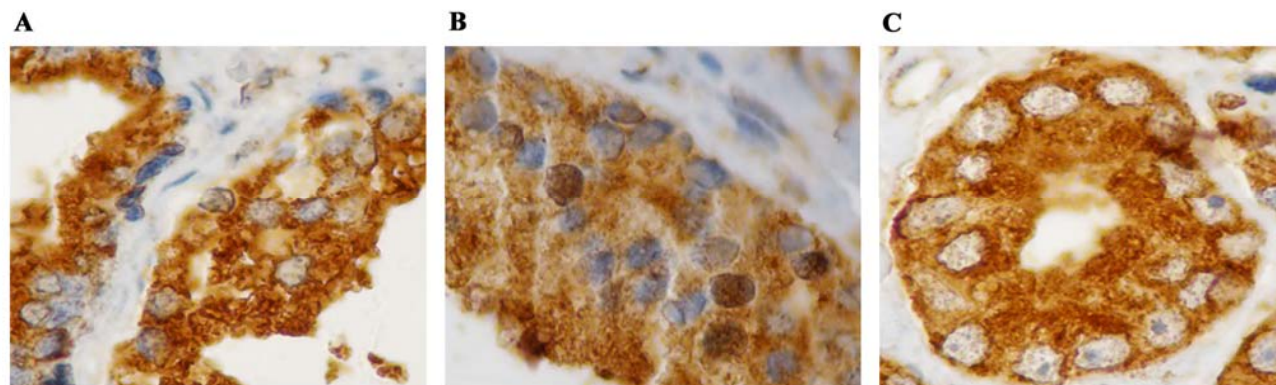


Figura 13 - Imunomarcção citoplasmática da proteína SRF. Nota-se intensa marcação citoplasmática em todos tecidos avaliados. (A) Próstata normal; (B) HPB; (C) Adenocarcinoma de Próstata. (IMH 100X).

Tabela 11 - Expressão protéica de SRF detectada pela técnica de imunoistoquímica (IHQ), em carcinomas de próstata (CaP), tecidos adjacentes prostáticos não neoplásicos (Tec Adj) e hiperplasias prostáticas benignas (HPB) de acordo com a intensidade de marcação.

Amostras	SRF (citoplasmática) n (%)		P *
	Fraca/Moderada	Intensa	
CaP (n=192) ^{a, b}	14 (7)	178 (93)	0,16
HPB (n=23) ^c	4 (17)	19 (83)	
Tec Adj (n=8)	-	8 (100)	

*Teste de Qui-quadrado

^a CaP *versus* HPB – $P=0,10$; ^b CaP *versus* Tec Adj – $P=1,00$; ^c HPB *versus* Tec Adj – $P=0,54$ (Teste Exato de Fisher)

Tabela 12 - Associação entre os dados clínico-histopatológicos com a intensidade de marcação citoplasmática da proteína SRF, detectados por imunistoquímica (IHQ) em adenocarcinomas de próstata (CaP).

Variáveis	Expressão proteica			
	SRF			P
	N(%)	Fraca/Moderada	Intensa	
Idade				0,96
≤ 60	83	6 (7)	77 (93)	
> 60	108	8 (7)	100 (93)	
História Familiar				0,12
Negativa	146	8 (6)	138 (94)	
Positiva	40	5 (13)	35 (87)	
PSA (ng/mL)*				0,45
≤ 4.0	13	2 (15)	11 (85)	
> 4.0 – 10	101	6 (6)	95 (94)	
>10	75	6 (8)	69 (92)	
Gleason				0,69
< 7 (3+4)	166	13 (8)	153 (92)	
≥ 7 (4+3)	25	1 (4)	24 (96)	
Estádio Patológico				0,24
II	94	9 (10)	85 (90)	
III e IV	94	4 (4)	90 (96)	
Risco de recorrência				0,85
Baixo	45	4 (9)	41 (91)	
Moderado	107	8 (8)	99 (92)	
Alto	36	2 (6)	34 (94)	
Linfonodos comprometidos				1,00
Negativo	174	13 (7)	161 (93)	
Positivo	10	□	10 (100)	
Margem				0,09
Negativa	121	12 (10)	109 (90)	
Positiva	68	2 (3)	66 (97)	
Extensão extra-prostática				0,30
Negativa	147	12 (8)	135 (92)	
Positiva	41	1 (2)	40 (98)	

Cont/ Tabela 12

<i>Invasão angiolinfática</i>				0,19
Negativa	146	13 (9)	133 (91)	
Positiva	43	1 (2)	42 (98)	
<i>Invasão Vesicular</i>				0,21
Negativa	167	11 (6)	156 (94)	
Positiva	22	3 (14)	19 (86)	
<i>Recidiva bioquímica</i>				0,25
Negativa	75	3 (4)	72 (96)	
Positiva	115	11 (10)	104 (90)	
<i>Metástase</i>				0,13
Negativa	172	11 (6)	161 (94)	
Positiva	18	3 (17)	15 (83)	

* Teste de Qui-quadrado

Obs.: As diferenças no número de indivíduos avaliados para cada parâmetro se devem à ausência de informações clínicas ou histopatológicas em alguns casos.

Análise da expressão protéica para os genes ligados à via do SRF

Nas análises de redes biológicas o gene *SRF* encontrava-se em posição central e conectado a dois genes descritos em literatura como relevantes em tumores de próstata, o *TIMP3* e *NCOA1*. Por esta razão, as proteínas codificadas por estes genes foram selecionadas para serem avaliadas em tecidos prostáticos por imunoistoquímica.

O padrão de expressão da proteína TIMP3 nos tecidos normais foi citoplasmática com imunomarcacão intensa, portanto foi considerado como diminuição de expressão os tecidos que apresentaram marcação de intensidade fraca e moderada (Figura 14). Diminuição de expressão (intensidade fraca e moderada) foi detectada em 83% das amostras de HPB e em 78% dos TecAdj. Por outro lado, expressão normal (marcação intensa) foi detectada em 55% dos tumores e expressão diminuída em 45% (fraca e moderada) em relação ao tecido normal. Não foram

observadas diferenças significativas entre o TecAdj e as HPB ($P=0,73$) quanto a intensidade de expressão da proteína TIMP3 avaliada por imunistoquímica. Porém níveis significativamente diminuídos de TIMP3 foram detectados nas HPB ($P<0,001$) e nos TecAdj ($P<0,0001$) quando comparados aos tumores (Tabela 13).

A diminuição de expressão de TIMP3 foi associada significativamente com escore de Gleason alto ($P=0,0009$) (Tabela 14). Dentre os tumores com Gleason alto ($n=25$), 8% (2 casos) apresentaram expressão fraca da proteína, sendo que nenhum caso com Gleason baixo apresentou este padrão de marcação. Dois tumores apresentaram expressão fraca de TIMP3, sendo que um caso apresentava PSA elevado ($>10\text{ng/ml}$), Gleason alto, risco de recorrência alto, estadio II e invasão angiolinfática positiva. O outro caso apresentava Gleason alto e metástase em testículo. A comparação entre os níveis protéicos de TIMP3 com as outras variáveis clínicas e histopatológicas não mostraram associação significativa (Tabela 14).

O padrão de marcação para a proteína NCOA1/SRC-1 foi citoplasmático em todos os tecidos prostáticos avaliados, sendo que as próstatas normais apresentaram intensidade de marcação fraca (Figura 15). Sendo assim, os escores de intensidade moderada e intensa foram considerados como aumento da expressão proteica. Foi observada uma diferença significativa de expressão da proteína entre os grupos analisados (Tabela 13). Níveis aumentados de NCOA1/SRC-1 foram associados significativamente aos tumores em comparação com Tec Adj ($P<0,0001$). Embora tenha sido detectada maior frequência de casos com aumento de expressão nos tumores (81%) em comparação com as amostras de HPB (65%), esta diferença foi marginalmente significativa ($P=0,07$). Níveis mais altos da proteína foram detectados em HPB quando comparados aos Tec Adj ($P=0,015$).

Observou-se uma associação significativa entre o aumento de expressão de NCOA1/SRC-1 e recidiva bioquímica ($P=0,008$, $RR=1,21$, $IC95\%=1,03-1,42$). Surpreendentemente, o aumento da expressão proteica foi associado com ausência de extensão extra-prostática (84%) em comparação com os tumores com extensão positiva (68%) ($P=0,022$, Tabela 14).

Para avaliar se NCOA1/SRC-1 poderia ser um marcador prognóstico para recorrência bioquímica em carcinomas de próstata, curvas de sobrevida foram construídas de acordo com a sua expressão nos tumores. Esta análise demonstrou que o aumento de expressão de NCOA1/SRC-1 estava associado com pior prognóstico em comparação com os tumores com expressão fraca ($P=0,162$, Figura 16). A análise multivariada foi realizada pelo teste de regressão de Cox num modelo onde incluía todas as co-variáveis com valores de $P<0,20$ detectadas nas análises univariadas (NCOA1, níveis de PSA pré-cirúrgico, escore de Gleason, estadio, comprometimento de linfonodos, invasão angiolinfática, comprometimento de margem cirúrgica, invasão vesicular e risco de recorrência). A proteína NCOA1/SRC-1 se mostrou um marcador prognóstico independente para recorrência bioquímica. Pacientes cujos tumores apresentam aumento de expressão de NCOA1/SRC-1 têm risco aumentado de apresentar recorrência bioquímica ($P=0,010$; $HR=2,271$, $IC95\%=1,212-4,257$; Tabela 15). Envolvimento de linfonodos, comprometimento de margem cirúrgica e risco de recorrência também se mostraram como marcadores prognósticos independentes nesta análise (Tabela 15).

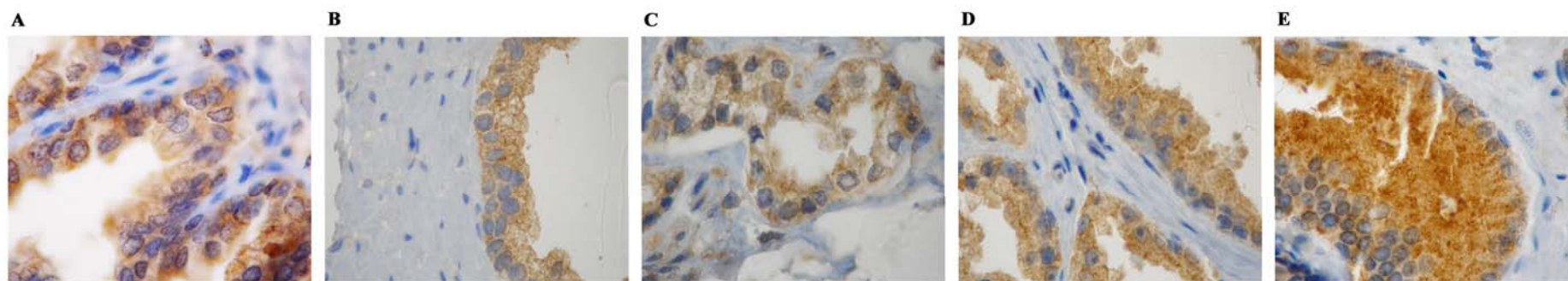


Figura 14 - Imunomarcacão citoplasmática da proteína TIMP3. **(A)** Próstata normal: marcação citoplasmática moderada nas células epiteliais; **(B)** HPB: marcação citoplasmática moderada nas células epiteliais; **(C)** Adenocarcinoma de próstata: marcação citoplasmática fraca; **(D)** Adenocarcinoma de próstata: marcação citoplasmática moderada; **(E)** Adenocarcinoma de próstata: marcação citoplasmática intensa. (IMH 100X).

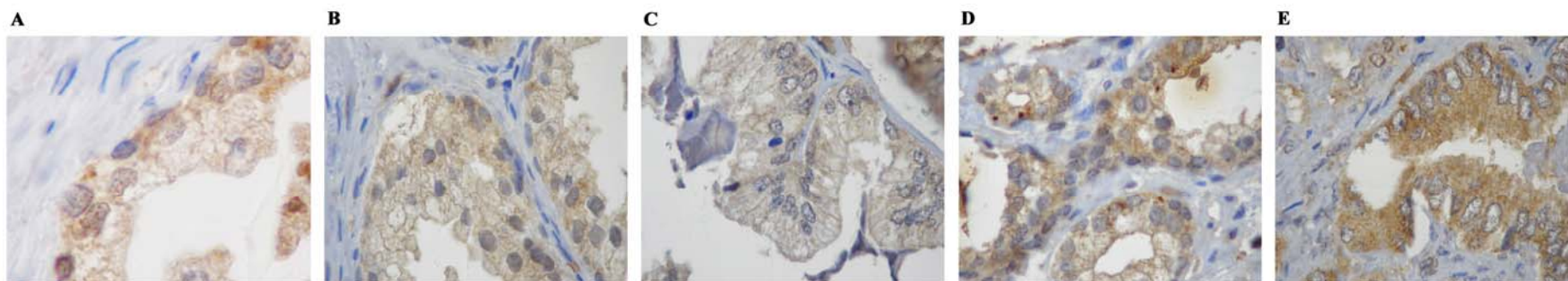


Figura 15 - Imunomarcacão citoplasmática da proteína NCOA1. **(A)** Próstata normal: marcação citoplasmática fraca nas células epiteliais; **(B)** HPB: marcação citoplasmática fraca nas células epiteliais hiperplásicas; **(C)** CaP: marcação citoplasmática fraca; **(D)** CaP: marcação citoplasmática moderada; **(E)** CaP: marcação citoplasmática intensa. (IMH100X).

Tabela 13 - Resultados da análise da expressão protéica de TIMP3 e NCOA1/SRC-1 (ligados à via do SRF) por imunoistoquímica em carcinomas de próstata (CaP), tecidos prostáticos adjacentes não neoplásicos (Tec Adj) e hiperplasias benignas prostáticas (HPB) de acordo com a intensidade de marcação citoplasmática.

Amostras	n(%)	TIMP3			P*	n(%)	NCOA1		P*
		Fraca	Moderada	Intensa			Fraca	Moderada/Intensa	
CaP^{a,b}	191	2 (1)	83 (44)	106 (55)	< 0,0001	190	36 (19)	154 (81)	< 0,0001
HPB^c	23	5 (22)	14 (61)	4 (17)		23	8 (35)	15 (65)	
Tec Adj	9	3 (34)	4 (44)	2 (22)		9	8 (89)	1 (11)	

*Teste de Qui-quadrado

TIMP3:^a CaP versus HPB – $P<0,001$; ^b CaP versus Tec Adj – $P<0,0001$; ^c HPB versus Tec Adj – $P=0,73$ (Teste de Qui-quadrado)

NCOA1:^a CaP versus HPB – $P=0,07$; ^b CaP versus Tec Adj – $P<0,0001$; ^c HPB versus Tec Adj – $P=0,015$ (Teste de Qui-quadrado)

Tabela 14 - Resultados da associação entre os dados clínico-histopatológicos com a intensidade de marcação citoplasmática dos genes TIMP3 e NCOA1 (ligados a via do SRF), detectados por imunoistoquímica nos carcinomas de próstata (CaP).

Variáveis	Expressão protéica							
	TIMP3				P	NCOA1		
	n (%)	Fraca	Moderada	Intensa		n (%)	Fraca	Moderada/Intensa
Idade					0,21			
≤ 60	82	-	32 (40)	50 (60)		83	15 (18)	68 (82)
> 60	108	2 (2)	51 (47)	55 (51)		106	21 (20)	85 (80)
História Familiar					0,86			
Negativa	146	1 (1)	64 (44)	81 (55)		145	25 (17)	120 (83)
Positiva	40	-	18 (45)	22 (55)		40	10 (25)	30 (75)
PSA (ng/mL)*					0,55			
≤ 4.0	13	-	7 (54)	6 (46)		13	3 (23)	10 (77)
> 4.0 – 10	100	-	46 (46)	54 (54)		101	21 (21)	80 (79)
>10	76	1 (1)	29 (38)	46 (61)		74	11 (15)	63 (85)
Gleason					0,0009			
< 7 (3+4)	165	-	71 (43)	94 (57)		164	29 (18)	135 (82)
≥ 7 (4+3)	25	2 (8)	12 (48)	11 (44)		25	7 (28)	18 (72)
Estádio Patológico					0,61			
II	95	1 (1)	41 (43)	53 (56)		94	18 (19)	76 (81)
III e IV	93	-	41 (44)	52 (56)		93	18 (19)	75 (81)

Cont/ Tabela 14

Risco de recorrência					0,32				0,52
Baixo	45	-	19 (42)	26 (58)		45	7 (16)	38 (84)	
Moderado	107	-	49 (46)	58 (54)		106	19 (18)	87 (82)	
Alto	36	1 (3)	14 (39)	21 (58)		36	9 (25)	27 (75)	
Linfonodos comprometidos					0,91				0,40
Negativo	174	1 (1)	77 (44)	96 (55)		173	32 (18)	141 (82)	
Positivo	10	-	5 (50)	5 (50)		10	3 (30)	7 (70)	
Margem					0,46				0,65
Negativa	122	1 (1)	56 (46)	65 (53)		121	22 (19)	99 (81)	
Positiva	67	-	26 (39)	41 (61)		67	14 (21)	53 (79)	
Extensão extra-prostática					0,35				0,022
Negativa	147	1 (1)	67 (46)	79 (53)		146	23 (16)	123 (84)	
Positiva	41	-	14 (34)	27 (66)		41	13 (32)	28 (68)	
Invasão angiolinfática					0,13				0,43
Negativa	146	-	66 (45)	80 (55)		145	26 (18)	119 (82)	
Positiva	43	1 (2)	16 (39)	26 (59)		43	10 (23)	33 (77)	
Invasão Vesicular					0,71				1,00
Negativa	167	1 (1)	74 (44)	92 (55)		166	32 (20)	134 (80)	
Positiva	22	-	8 (37)	14 (63)		22	4 (18)	18 (82)	
Recidiva bioquímica					0,15				0,008
Negativa	74	1 (1)	37 (50)	36 (49)		74	21 (28)	53 (72)	
Positiva	116	-	46 (40)	70 (60)		115	15 (13)	100 (87)	
Metástase					0,10				0,32
Negativa	172	1 (1)	77 (45)	94 (54)		171	31 (19)	140 (81)	
Positiva	19	1 (5)	6 (32)	12 (63)		18	5 (28)	13 (72)	

* Teste de Qui-quadrado

Obs.: As diferenças no número de indivíduos avaliados para cada parâmetro se devem à ausência de informações clínicas ou histopatológicas em alguns casos.

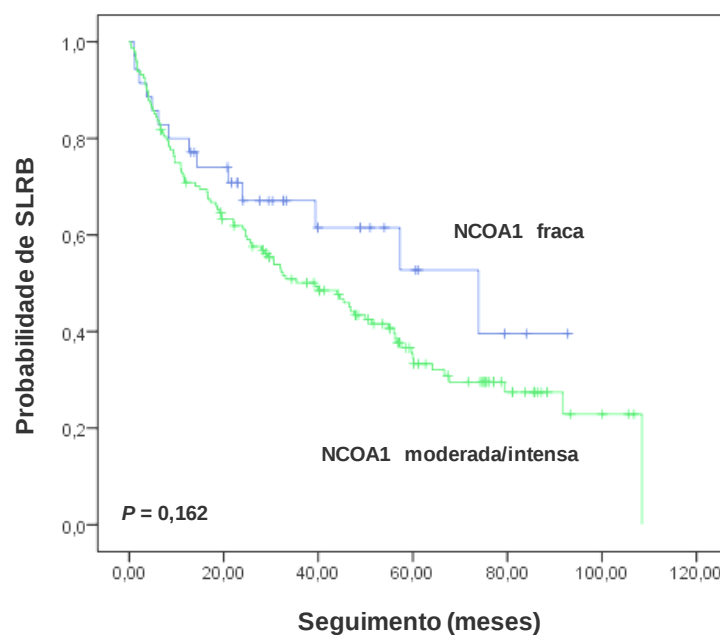


Figura 16 - Sobrevida livre de recorrência bioquímica (SLRB) de acordo com a expressão proteica de NCOA1/SRC-1 em carcinomas de próstata ($P=0,162$, NS).

Tabela 15 - Análise multivariada para sobrevida livre de recorrência bioquímica (SLRB) em pacientes com carcinoma de próstata (n=184).

Variáveis	Valor P	HR (IC _{95%})
NCOA1 (expressão proteica moderada/intensa <i>versus</i> fraca)	0,021	2,271 (1,212- 4,257)
Envolvimento de linfonodos (positivo <i>versus</i> negativo)	0,035	2,323 (1,062- 5,078)
Margem cirúrgica comprometida (positiva <i>versus</i> negativa)	0,047	1,550 (1,006- 2,389)
Risco de recorrência (baixo <i>versus</i> moderado <i>versus</i> alto)	<0,001	2,122 (1,448- 3,110)

HR – hazard ratio; IC_{95%} – intervalo de confiança de 95%.

SRC

Análises dos níveis de transcritos do gene SRC em carcinomas de próstata

A expressão do *SRC* foi detectada em todas as amostras de CaP e Tec Adj. Não foi observada diferença estatística entre os níveis de expressão nos diferentes grupos ($P=0,7861$, teste de Kruskal-Wallis, Figura 17). Dentre os CaP 14% (13/95)

apresentaram aumento de expressão e 8% (8/95) diminuição. Por outro lado, nas amostras de tecido adjacente, todos os casos apresentaram expressão dentro dos limites de normalidade em relação às próstatas normais.

Tanto os casos com aumento de expressão quanto aqueles com diminuição de expressão gênica apresentaram valores de PSA pré-operatório alto e 16% (5/31) apresentaram recidiva bioquímica. No entanto, nenhum desses casos evoluiu para metástase.

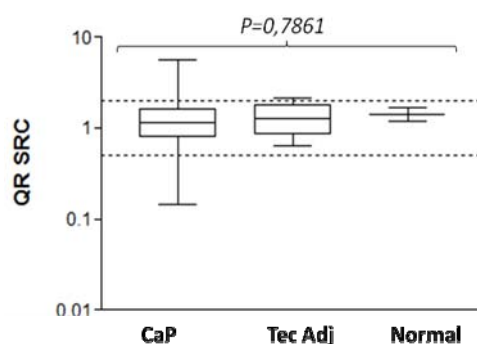


Figura 17 - Níveis de transcritos do gene *SRC* em amostras de tumores de próstata (CaP), tecidos adjacentes não-neoplásicos (TecAdj) e tecidos normais (N). Não foi observada diferença estatística para esta análise.

Associação entre os níveis de expressão gênica de *SRC* e as variáveis clínico-histopatológicas

Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de expressão do gene *SRC* e os parâmetros clínicos e histopatológicos (Anexo I).

Análise de expressão da proteína *SRC* e a associação com as variáveis clínico-histopatológicas

A proteína *SRC* mostrou imunomarcagem citoplasmática no epitélio glandular e no estroma das próstatas normais, CaP, HPB e Tec Adj (Figura 18). Desta forma, estes componentes foram avaliados separadamente e foi considerada a intensidade

citoplasmática no componente epitelial, e extensão e intensidade no componente estromal, em todos os tecidos prostáticos avaliados (próstata normal, Tec Adj, HPB e CaP). A próstata normal apresentou no epitélio glandular intensidade fraca de SRC (escore 1), e no estroma extensão de imunomarcacão com escore 3 (mais que 50% das células estromais positivas) e intensidade de marcação escore 2 (moderada).

Em 63% dos CaP foi observado aumento de expressão protéica (moderada e intensa) no epitélio tumoral em relação a próstata normal. Observou-se aumento de expressão protéica de SRC no componente epitelial das HPB e TecAdj em 87% e 78% dos casos, respectivamente. A expressão protéica de SRC no epitélio foi estatisticamente diferente entre os tecidos tumorais (CaP) e os tecidos não neoplásicos (Tec Adj e HPB) ($P=0,044$) (Tabela 16). Os tumores apresentaram em geral níveis mais baixos da proteína em comparação às amostras de HPB ($P=0,01$). Não foi observada diferença entre CaP e Tec Adj e entre HPB e Tec Adj.

Comparando a intensidade de marcação de SRC nas células epiteliais tumorais com as características clínicas e histopatológicas observou-se que 8% dos tumores com extensão extra-prostática positiva apresentavam intensidade forte (aumento de expressão em relação à próstata normal) comparado a 2% dos casos com mesmo padrão de marcação e ausência de extensão extra-prostática ($P=0,032$).

Em relação ao componente estromal, somente os CaP (48%) apresentaram extensão de imunomarcacão de SRC menor que a próstata normal, sendo esta estatisticamente diferente em relação aos tecidos não neoplásicos (HPB e TecAdj), ($P=0,0001$, Tabela 16). Já em relação à intensidade de marcação estromal, os CaP, HPB e TecAdj apresentaram 74%, 65% e 67% dos casos com intensidade semelhante à próstata normal (moderada), respectivamente. Porém, somente os CaP

apresentaram casos com intensidade fraca (13%) e menor número de amostras com imunomarcacão intensa (13%). Estes resultados foram significativamente diferentes ($P=0,014$, Tabela 16).

A comparacão entre a intensidade de expressão de SRC nas células do estroma tumoral e as variáveis clínicas e histopatológicas mostrou associacão significativa entre diminuicão de expressão proteica com recidiva bioquímica ($P=0,0002$). Por outro lado, 99% dos casos sem recidiva apresentavam aumento de expressão proteica no componente estromal. De maneira semelhante, quando avaliada a extensão de marcaçao no componente estromal observou-se uma frequência maior de casos (23%) com menor extensão de marcaçao (<20%, escore 1) associado com recidiva bioquímica quando comparado aos casos sem recidiva (16% com escore 1) ($P=0,033$).

Avaliando a intensidade de marcaçao no componente estromal e risco de recorrência observou-se maior frequência de casos (29%) com intensidade forte no grupo com alto risco de recorrência comparado com a frequência de casos com risco moderado (8%) e baixo (13%) ($P=0,006$).

Comparando a extensão de marcaçao no componente estromal e os níveis de PSA observou-se que há uma diminuicão gradual da frequência de casos com marcaçao semelhante à próstata normal (escore 3 - >50% células estromais) a medida que aumenta os níveis de PSA ($P=0,025$, Tabela 17). Observou-se escore 3 de extensão em 85% dos casos com PSA baixo ($\leq 4\text{ng/mL}$), 54% com PSA ($>4-10\text{ng/mL}$) e 43% com PSA $>10\text{ng/mL}$.

As demais variáveis não mostraram associacão com intensidade ou extensão da marcaçao de SRC no componente estromal.

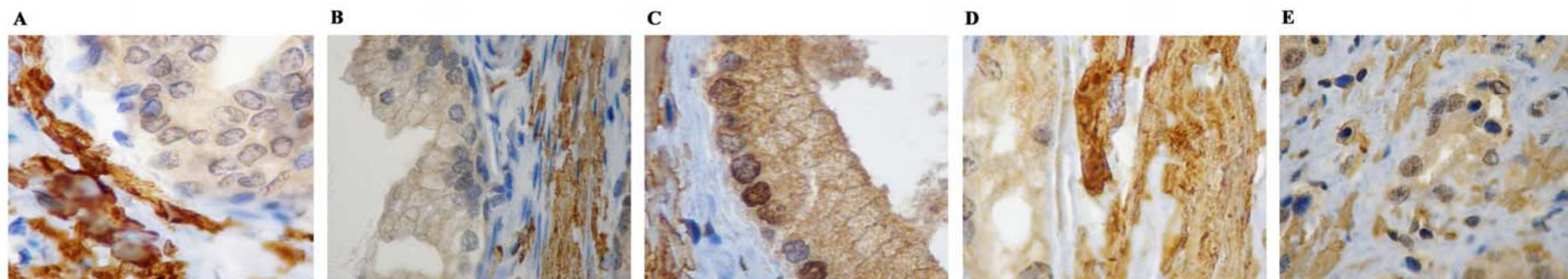


Figura 18 - Imunomarcacão citoplasmática e estromal da proteína SRC. **(A)** Próstata normal: fraca marcao citoplasmática do epitélio e intensa estromal; **(B)** HPB: marcao citoplasmática fraca das células epiteliais; **(C)** CaP: marcao citoplasmática moderada; **(D)** CaP: intensa marcao do estroma adjacente as células epiteliais tumorais; **(E)** CaP: marcao estromal e epitelial citoplasmática moderada. (IMH 100X).

Tabela 16 - Expressão protéica de SRC no componente epitelial e estromal detectada por imunoistoquímica (IHQ), em carcinomas de próstata.(CaP), tecidos adjacentes prostáticos não neoplásicos (Tec Adj) e hiperplasias benignas prostáticas (HPB) de acordo com a intensidade de marcao.

Amostras	SRC										P*	
	Componente epitelial			P*	Componente estromal							
	Intensidade n(%)				Intensidade n(%)			Extensão n(%)				
	Fraca	Moderada	Intensa		Fraca	Moderada	Intensa	P*	20%	20-50%		>50%
CaP (n=186) ^{a,b}	69 (37)	111 (60)	6 (3)	0,044	25 (13)	137 (74)	24 (13)	0,014	38 (20)	52 (28)	96 (52)	0,0001
HPB (n=23) ^c	3 (13)	17 (74)	3 (13)		-	15 (65)	8 (35)		-	1 (4)	22 (96)	
Tec Adj (n=9)	2 (22)	6 (67)	1 (11)		-	6 (67)	3 (33)		-	-	9 (100)	

* Teste de Qui-quadrado

Epitélio: ^a CaP *versus* HPB – P=0,01; ^b CaP *versus* Tec Adj – P=0,35; ^c HPB *versus* Tec Adj – P=0,81 (Teste de Qui-quadrado)

Estroma intensidade: ^a CaP *versus* HPB – P=0,007; ^b CaP *versus* Tec Adj – P=0,14; ^c HPB *versus* Tec Adj – P=1,00 (Teste de Qui-quadrado)

Estromal extensão: ^a CaP *versus* HPB – P=0,0003; ^b CaP *versus* Tec Adj – P=0,017; ^c HPB *versus* Tec Adj – P=0,40 (Teste de Qui-quadrado)

Tabela 17 - Associação entre os dados clínico-histopatológicos com a intensidade de marcação citoplasmática (componente epitelial) e a intensidade e extensão componente estromal de SRC detectados por imunoistoquímica nos carcinomas de próstata (CaP).

Variáveis	SRC														P
	Componente epitelial					Componente estromal									
	Intensidade				P	Intensidade				P	Extensão				
	n(%)	Fraca	Moderada	Intensa		n(%)	Negativa/Fraca	Moderada	Intensa		n(%)	20%	20-50%	>50%	
Idade					0,93					0,05					0,09
≤ 60	82	31 (37)	48 (59)	3 (4)		81	7 (9)	59 (73)	15 (18)		81	11 (14)	23 (28)	47 (58)	
> 60	104	38 (36)	63 (61)	3 (3)		104	18 (17)	77 (74)	9 (9)		104	27 (26)	29 (28)	48 (46)	
História Familiar					0,19					0,16					0,82
Negativa	144	47 (33)	92 (64)	5 (3)		144	18 (13)	110 (76)	16 (11)		144	30 (21)	41 (28)	73 (51)	
Positiva	37	18 (49)	18 (49)	1 (2)		37	6 (16)	23 (62)	8 (22)		37	6 (16)	11 (30)	20 (54)	
PSA (ng/mL)*					0,94					0,09					0,025
≤ 4.0	13	5 (38)	8 (62)	-		13	-	9 (69)	4 (31)		13	-	2 (15)	11 (85)	
> 4.0 – 10	97	36 (37)	57 (59)	4 (4)		97	13 (13)	76 (76)	8 (8)		97	22 (23)	22 (23)	53 (54)	
>10	74	27 (36)	45 (61)	2 (2)		74	11 (15)	51 (69)	12 (16)		74	14 (19)	28 (38)	32 (43)	
Gleason					0,62					0,37					0,80
< 7 (3+4)	161	60 (37)	95 (59)	6 (4)		161	21 (13)	121 (75)	19 (12)		161	33 (21)	44 (27)	84 (52)	
≥ 7 (4+3)	24	9 (38)	15 (62)	-		24	4 (17)	15 (62)	5 (21)		24	5 (21)	8 (33)	11 (46)	
Estádio Patológico					0,65					0,82					0,83
II	94	36 (38)	56 (60)	2 (2)		94	13 (14)	70 (74)	11 (12)		94	20 (21)	25 (27)	49 (52)	
III e IV	89	32 (36)	53 (60)	4 (4)		89	11 (12)	65 (73)	13 (15)		89	17 (19)	27 (30)	45 (51)	

Risco de recorrência					0,98	0,006					0,89		
Baixo	45	16 (36)	27 (60)	2 (4)	45	2 (5)	37 (82)	6 (13)	45	8 (18)	12 (27)	25 (55)	
Moderado	103	38 (37)	62 (60)	3 (3)	103	18 (17)	77 (75)	8 (8)	103	22 (21)	28 (27)	53 (52)	
Alto	35	14 (40)	20 (57)	1 (3)	35	4 (11)	21 (60)	10 (29)	35	6 (17)	12 (34)	17 (49)	
Linfonodos comprometidos					0,73	0,44					0,62		
Negativo	170	64 (38)	101 (59)	5 (3)	170	22 (13)	127 (75)	21 (12)	170	32 (19)	47 (27)	91 (54)	
Positivo	10	3 (30)	7 (70)	-	10	-	9 (90)	1 (10)	10	1 (10)	4 (40)	5 (50)	
Margem					0,34	0,37					0,62		
Negativa	121	42 (35)	76 (63)	3 (2)	121	15 (12)	93 (77)	13 (11)	121	22 (18)	36 (30)	63 (52)	
Positiva	63	27 (43)	33 (52)	3 (5)	63	9 (14)	43 (68)	11 (18)	63	15 (23)	16 (26)	32 (51)	
Extensão extra-prostática					0,032	0,10					0,07		
Negativa	144	49 (35)	92 (63)	3 (2)	144	22 (15)	106 (74)	16 (11)	144	33 (23)	43 (30)	68 (47)	
Positiva	39	19 (49)	17 (44)	3 (8)	39	2 (5)	29 (74)	8 (21)	39	4 (10)	9 (23)	26 (67)	
Invasão angiolinfática					0,73	0,25					0,13		
Negativa	142	55 (39)	82 (58)	5 (3)	142	16 (11)	109 (77)	17 (12)	142	26 (18)	37 (26)	79 (56)	
Positiva	42	14 (34)	27 (64)	1 (2)	42	8 (19)	27 (65)	7 (16)	42	11 (26)	15 (36)	16(38)	
Invasão Vesicular					0,21	0,65					0,26		
Negativa	163	61 (38)	98 (60)	4 (2)	163	20 (12)	122 (75)	21 (13)	163	33 (20)	43 (26)	87 (54)	
Positiva	21	8 (38)	11 (52)	2 (10)	21	4 (19)	14 (67)	3 (14)	21	4 (19)	9 (43)	8 (38)	
Recidiva bioquímica					0,15	0,0002					0,033		

Negativa	74	33 (45)	40 (54)	1 (1)		74	1 (1)	59 (80)	14 (19)		74	12 (16)	15 (20)	47 (64)
Positiva	111	36 (32)	70 (63)	5 (5)		111	23 (21)	78 (70)	10 (9)		111	25 (23)	37 (33)	49 (44)
Metástase					0,67					0,28				0,96
Negativa	168	64 (38)	99 (59)	5 (3)		168	20 (12)	127 (76)	21 (12)		168	34 (20)	47 (28)	87 (52)
Positiva	17	5 (29)	11 (65)	1 (6)		17	4 (23)	10 (59)	3 (18)		17	3 (18)	5 (29)	9 (53)

Obs.: As diferenças no número de indivíduos avaliados para cada parâmetro se devem à ausência de informações clínicas ou histopatológicas em alguns casos.

Correlação entre a expressão gênica e protéica do SRC

Embora tenham sido analisados por expressão protéica os dois componentes celulares separadamente (epitelial e estromal) e isto não ter sido realizado na análise de transcritos, foram comparados os achados nas amostras pareadas em que foi possível realizar as duas metodologias (n=65 casos). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas (Figuras 19). Tanto para as marcações protéicas citoplasmática e estromal, foi observado níveis de expressão gênica normal em 77,5% dos casos. Para intensidade citoplasmática nenhum caso apresentou marcação intensa. Porém na avaliação da intensidade do tecido estromal, 58,6% dos casos apresentaram marcação intensa e para extensão 20,6% mantiveram este padrão de marcação. Nos tecidos adjacentes não neoplásicos também não foi observado resultados significativos para nenhuma das marcações (Figura 19).

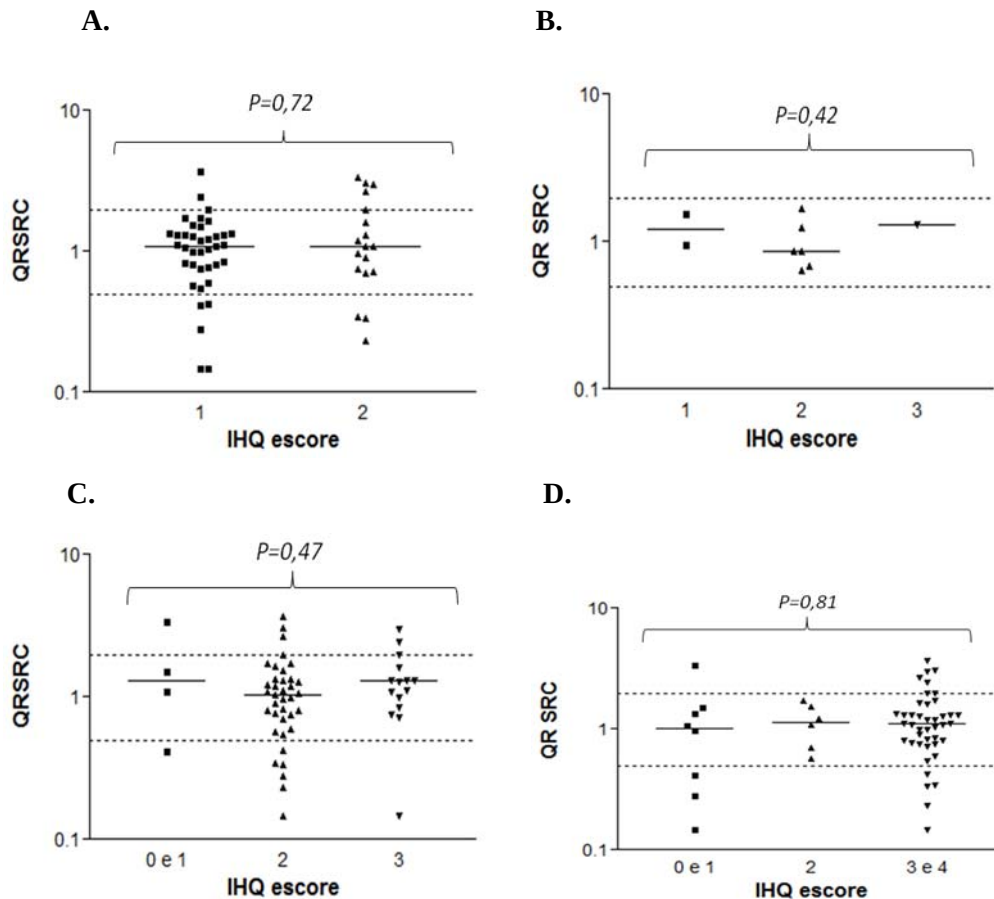


Figura 19 - Análise comparativa entre a expressão gênica e proteica de SRC nos tecidos tumorais e tecidos adjacentes não neoplásicos: **A.** intensidade citoplasmática nos CaPs; **B.** intensidade citoplasmática nos tecidos adjacentes não neoplásicos; **C.** extensão estromal nos CaPs; **D.** intensidade estromal no CaPs.

Análise da expressão proteica para os genes ligados à via do SRC e associação com as variáveis clínicas e histopatológicas

Nas análises das redes biológicas, o gene *SRC* foi central apresentando conexões com vários genes associados a processos tumorais, como *DAB2*, *ATF1*, *ICAM1* e *ETV6* e por este motivo as proteínas codificadas por estes genes foram avaliadas por imunoistoquímica nos tecidos prostáticos.

A proteína DAB2 apresentou marcação na membrana das células epiteliais dos tecidos prostáticos avaliados (Figura 20). A próstata normal apresentou predominantemente marcação de intensidade moderada. Portanto, para fins de análise foi considerado como escore negativo (amostras de intensidade fraca ou ausência de marcação) e positivo (marcação moderada e intensa). Foi observada diminuição significativa de expressão de DAB2 entre os tumores na comparação com tecidos tumorais e não neoplásicos ($P<0,0001$, Tabela 18). A expressão negativa foi detectada em 99% dos CaPs, 61% das HPB e 50% dos Tec Adj. Não foram observadas diferenças significativas na comparação entre a expressão de DAB2 nos tumores com as variáveis clínicas e histopatológicas (Tabela 19).

A proteína ATF1 mostrou um padrão de marcação nuclear com intensidade moderada na próstata normal (Figura 21). A comparação entre os grupos mostrou que 92% dos CaPs e 100% dos casos de HPB e tecidos adjacentes apresentaram marcação nuclear intensa, sem diferença estatística entre eles ($P=0,65$, Tabela 18). Não foi observada diferença entre a expressão de ATF1 nos tumores e as variáveis clínicas e histopatológicas (Tabela 19). No entanto, dentre os casos com história familiar positiva para CaP, 13% dos casos eram negativos para a proteína em comparação com 1% dos casos sem história familiar ($P=0,002$, Tabela 19).

Para a proteína ETV6 foi considerada a extensão de marcação nuclear nos tecidos prostáticos normais e tumorais (Figura 22). A próstata normal apresentou escore 3 de imunomarcação (mais de 50% das células positivas para esta proteína). Na comparação entre os grupos observa-se que 100% dos Tec Adj, 57% das HPB e 39% dos tumores mostraram padrão semelhante à próstata normal (>50% células positivas) ($P<0,001$). Diminuição da expressão proteica de ETV6 foi detectada em

61% dos CaP (escores 1 e 2, <50% das células marcadas) e foi estatisticamente diferente das HPB ($P=0,0008$) e dos Tec Adj ($P=0,002$) (Tabela 18). Nas análises de associação da expressão de ETV6 com as variáveis clínicas e histopatológicas não foram observados resultados estatisticamente significativos (Tabela 20).

A proteína ICAM-1 mostrou marcação na membrana das células epiteliais prostáticas e foi considerada para análise a intensidade de imunomarcação (Figura 23). A marcação na próstata normal foi negativa. Não foram observadas diferenças significativas no padrão de expressão de ICAM1 entre as amostras avaliadas ($P=0,36$). Ausência de marcação foi detectada em 93% dos CaP, 86% das HPB e 100% dos Tec Adj (Tabela 18). A comparação entre o padrão de expressão da proteína com as variáveis clínicas e histopatológicas, não apresentaram nenhum resultado significativo (Tabela 20).

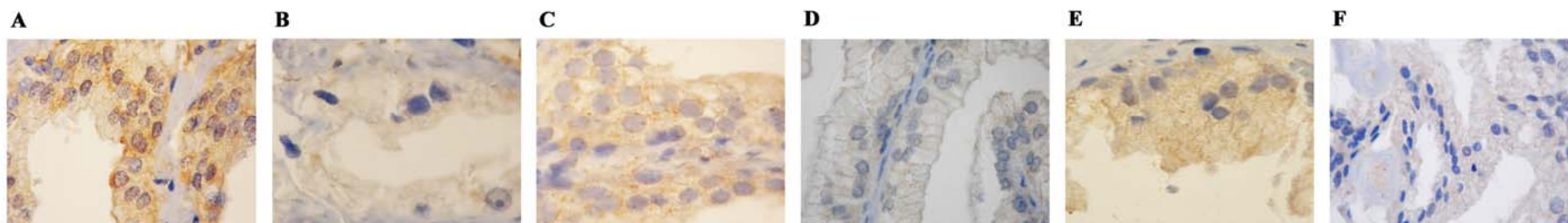


Figura 20 - Imunomarcção de membrana para a proteína DAB2. **(A)** Próstata normal: imunomarcção focal no tecido e parcial na membrana das células epiteliais, com moderada intensidade; **(B)** CaP: negativo na célula epitelial neoplásica; **(C)** CaP: imunomarcção fraca nas células epiteliais neoplásicas; **(D)** HPB: negativa nas células epiteliais; **(E)** HPB: imunomarcção fraca nas células epiteliais.; **(F)** Tecido adjacente não neoplásico: negativa nas células epiteliais. (IMH 100X).

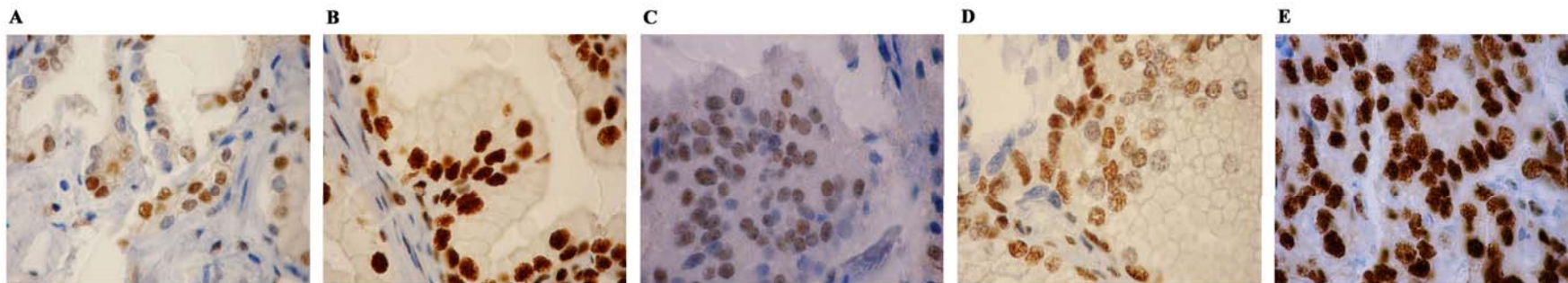


Figura 21 - Imunomarcção nuclear da proteína ATF1. **(A)** Próstata normal: marcação nuclear de intensidade moderada nas células epiteliais acinares e algumas estromais; **(B)** HPB: intensa marcação nuclear do epitélio secretor e células basais das glândulas estromais; **(C)** CaP: marcação nuclear de intensidade fraca nas células epiteliais acinares; **(D)** CaP: marcação nuclear de intensidade moderada nas células epiteliais acinar; **(E)** CaP: marcação nuclear de intensidade forte nas células epiteliais acinares. (IMH 100X).

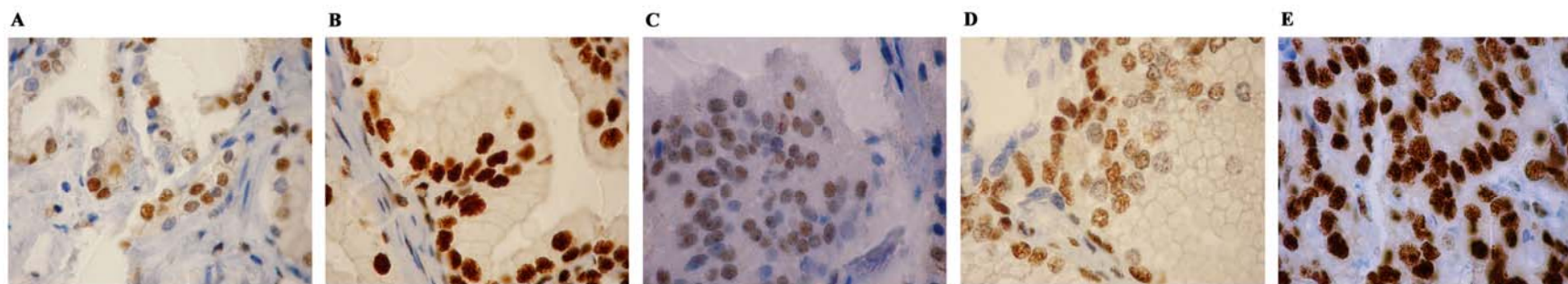


Figura 22 - Imunomarcção nuclear da extensão da proteína ETV6. **(A)** Próstata normal: escore 3 - > 50% das células positivas; **(B)** HPB: escore 3 (> 50% das células positivas); **(C)** CaP: marcação negativa ausência de células marcadas; **(D)** CaP: escore 2 (1-50% das células marcadas); **(E)** CaP: escore 3 (> 50% das células marcadas). (IMH 100X).

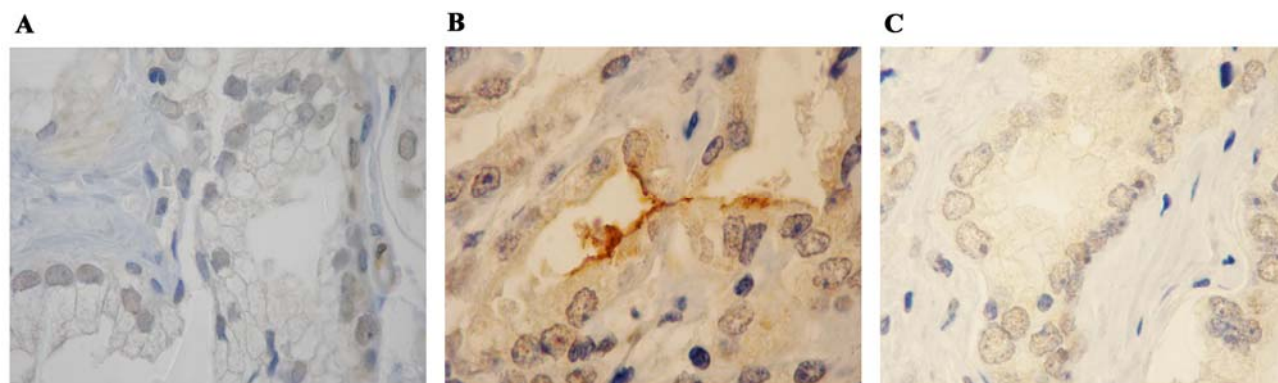


Figura 23 - Imunomarcção de membrana da proteína ICAM1. **(A)** Próstata normal: negativa; **(B)** CaP: imunomarcção positiva focal na membrana das células epiteliais; **(C)** CaP: imunomarcção negativa (IMH 100X).

Tabela 18 - Expressão das proteínas DAB2, ATF, ICAM1 e ETV6 (ligados à via do SRC) detectada pela técnica de imunistoquímica em carcinomas de próstata (CaP), tecidos adjacentes prostáticos não neoplásicos (Tec Adj) e hiperplasias benignas prostáticas (HPB) de acordo com a intensidade de marcação.

Amostras	DAB2		P*	n(%)	ATF1			P*
	Intensidade membrana				Intensidade nuclear			
	Negativa n (%)	Positiva n (%)			Negativa n (%)	Fraca/Moderada n (%)	Intensa n (%)	
CaP (n=192) ^{a,b}	190 (99)	2 (1)	<0,0001	n=190 ^{a,b}	7 (4)	7 (4)	176 (92)	0,65
HPB (n=23) ^c	14 (61)	9 (39)		n=23 ^c	-	-	23 (100)	
Tec Adj (n=8)	4 (50)	4 (50)		n=8	-	-	8 (100)	

Amostras	ICAM1**		P*	n(%)	ETV6			P*
	Intensidade membrana				Extensão nuclear			
	Negativa n (%)	Positiva n (%)			Negativa n (%)	1-50% n (%)	>50% n (%)	
CaP (n=191) ^{a,b}	178 (93)	13 (7)	0,36	n=191 ^{a,b}	3 (1)	114 (60)	74 (39)	<0,0001
HPB (n=22) ^c	19 (86)	3 (14)		n=23 ^c	3 (13)	7 (30)	13 (57)	
Tec Adj (n=8)	8 (100)	-		n=8	-	-	8 (100)	

*Teste de Qui-quadrado

DAB2: ^a CaP versus HPB – $P<0,0001$; ^b CaP versus Tec Adj – $P<0,0001$; ^c HPB versus Tec Adj – $P=0,69$ (Teste de Qui-quadrado)

ATF1: ^a CaP versus HPB – $P=0,40$; ^b CaP versus Tec Adj – $P=0,72$; (Teste de Qui-quadrado) ^c HPB versus Tec Adj – não realizado

ICAM1: ^a CaP versus HPB – $P=0,21$; ^b CaP versus Tec Adj – $P=1,00$; ^c HPB versus Tec Adj – $P=0,54$ (Teste de Qui-quadrado)

ETV6: ^a CaP versus HPB – $P=0,0008$; ^b CaP versus Tec Adj – $P=0,0026$; ^c HPB versus Tec Adj – $P=0,07$ (Teste de Qui-quadrado)

Tabela 19 - Associação dos dados clínico-histopatológicos com os padrões de marcação dos genes ligados a via do SRC (DAB2 e ATF1), detectados por imunistoquímica nos carcinomas de próstata (CaP).

Variáveis	DAB2				ATF1				
	N	Negativa	Positiva	P	N	Negativa	Fraca/Moderada	Intensa	P
Idade				1,00					0,73
≤ 60	82	81 (99)	1(1)		81	3 (4)	4 (5)	74 (91)	
> 60	109	108 (99)	1(1)		108	4 (4)	3 (3)	101 (93)	
História Familiar				1,00					0,002
Negativa	146	144 (99)	2(1)		145	2 (1)	6 (4)	137 (95)	
Positiva	40	40 (100)	-		39	5 (13)	-	34 (87)	
PSA (ng/mL)*				0,90					0,07
≤ 4.0	13	13 (100)	-		12	2 (17)	-	10 (83)	
> 4.0 – 10	100	99(99)	1(1)		100	1 (1)	4 (4)	95 (95)	
>10	76	75 (99)	1(1)		75	4 (5)	3 (4)	68 (91)	
Gleason				0,24					0,47
< 7 (3+4)	166	165 (99)	1(1)		164	5 (3)	6 (4)	153 (93)	
≥ 7 (4+3)	25	24 (99)	1(1)		25	2 (8)	1 (4)	22 (88)	
Estádio Patológico				1,00					0,65
II	95	94 (99)	1(1)		94	4 (4)	2 (2)	88 (94)	
III e IV	93	92 (99)	1(1)		92	3 (3)	4 (4)	85 (93)	
Risco de recorrência				0,47					0,46
Baixo	45	45 (100)	-		35	2 (6)	1 (3)	32 (91)	
Moderado	107	106 (99)	1(1)		105	2 (2)	5 (5)	98 (93)	
Alto	36	35 (97)	1(3)		36	3 (8)	1 (3)	32 (89)	
Linfonodos comprometidos									0,39
Negativo	174	172 (99)	2 (1)	1,00	172	5 (3)	7 (4)	160 (93)	
Positivo	10	10 (100)	-		10	1 (10)	-	9 (90)	
Margem				1,00					0,85
Negativa	122	121 (99)	1(1)		120	4 (3)	4 (3)	112 (93)	
Positiva	67	66 (99)	1(1)		67	3 (4)	3 (4)	61 (92)	
Extensão extra-prostática				1,00					0,68
Negativa	147	145 (99)	2(1)		146	5 (3)	4 (3)	137 (94)	
Positiva	41	41 (100)	-		40	2 (5)	2 (5)	36 (90)	

Cont/ Tabela 19

Invasão angiolinfática				0,40					0,87
Negativa	146	145 (99)	1(1)		144	5 (3)	5 (3)	134 (94)	
Positiva	43	42 (98)	1(2)		43	2 (5)	2 (5)	39 (90)	
Invasão Vesicular				1,00					0,95
Negativa	167	165 (99)	2(1)		165	6 (4)	6 (4)	153 (92)	
Positiva	22	22 (100)	-		22	1 (5)	1 (5)	20 (90)	
Recidiva bioquímica				0,52					0,25
Negativa	74	74 (100)	-		73	1 (1)	4 (6)	68 (93)	
Positiva	116	114 (98)	2(2)		115	6 (5)	3 (3)	106 (92)	
Metástase				0,18					0,15
Negativa	172	171 (99)	1(1)		170	5 (3)	7 (4)	158 (93)	
Positiva	18	17 (95)	1(5)		18	2 (11)	-	16 (89)	

Obs.: As diferenças no número de indivíduos avaliados para cada parâmetro se devem à ausência de informações clínicas ou histopatológicas em alguns casos.

Tabela 20 - Associação dos dados clínico-histopatológicos com os padrões de marcação das proteínas ligados a via do SRC (ETV6 e ICAM1), detectados por imunohistoquímica nos carcinomas de próstata (CaP).

Variáveis	N	Negativa	ETV6		P	N	ICAM1		P
			1-50%	>50%			Negativo	Positivo	
Idade					0,49				0,71
≤ 60	82	2 (2)	46 (56)	34 (42)		82	77 (93)	5 (7)	
> 60	108	1 (1)	68 (63)	39 (36)		107	99 (93)	8 (7)	
História Familiar					0,47				0,48
Negativa	145	2 (1)	85 (59)	58 (40)		144	135 (94)	9 (6)	
Positiva	40	1 (3)	27 (67)	12 (30)		40	36 (90)	4 (10)	
PSA (ng/mL)*					0,28				0,40
≤ 4.0	13	-	9 (69)	4 (31)		13	12 (92)	1 (8)	
> 4.0 – 10	100	-	60 (60)	40 (40)		98	89 (91)	9 (9)	
>10	75	3 (4)	44 (59)	28 (37)		76	73 (96)	3 (4)	
Gleason					0,46				0,22
< 7 (3+4)	165	2 (1)	97 (59)	66 (40)		164	151 (92)	13 (8)	
≥ 7 (4+3)	25	1 (4)	16 (64)	8 (32)		25	25 (100)	-	
Estádio Patológico					0,46				0,80
II	94	1 (1)	53 (56)	40 (43)		94	87 (93)	7 (7)	
III e IV	93	2 (2)	59 (63)	32 (35)		92	86 (93)	6 (7)	
Risco de recorrência					0,47				0,50
Baixo	45	-	28 (62)	17 (38)		44	41 (93)	3 (7)	
Moderado	106	2 (2)	59 (56)	45(42)		106	97 (91)	9 (9)	
Alto	36	1 (3)	25 (70)	10 (27))		36	35 (97)	1 (3)	
Linfonodos comprometidos					0,06				0,50
Negativo	173	2 (2)	105 (60)	66 (38)		172	161 (94)	11(6)	
Positivo	10	1 (10)	7 (70)	2 (20)		10	9 (90)	1 (10)	
Margem					0,49				0,14
Negativa	121	1 (1)	75 (62)	45 (37)		121	110 (90)	11 (10)	
Positiva	67	2 (3)	39 (58)	26 (39)		66	64 (97)	2 (3)	
Extensão extra-prostática					0,40				1,00
Negativa	146	2 (1)	85 (59)	59 (40)		145	135 (93)	10 (7)	
Positiva	41	1 (2)	28 (69)	12 (29)		41	38 (93)	3 (7)	

Cont/ Tabela 20

Invasão angiolinfática								
					0,08			1,00
Negativa	145	2 (1)	82 (57)	61 (42)		144	134 (93)	10 (7)
Positiva	43	1 (2)	32 (74)	10 (24)		43	40 (93)	3 (7)
Invasão Vesicular								
					0,64			0,37
Negativa	166	3 (2)	99 (60)	64 (38)		165	152 (92)	13 (8)
Positiva	22	□	15 (68)	7 (32)		22	22 (100)	-
Recidiva bioquímica								
					0,50			0,08
Negativa	74	1 (2)	41 (55)	32 (43)		73	65 (89)	8 (11)
Positiva	115	2 (2)	73 (63)	40 (35)		115	110 (96)	5 (4)
Metástase								
					0,25			0,61
Negativa	171	3 (2)	106 (62)	62 (36)		170	157 (92)	13 (8)
Positiva	18	-	8 (44)	10 (56)		18	18 (100)	-

Obs.: As diferenças no número de indivíduos avaliados para cada parâmetro se devem à ausência de informações clínicas ou histopatológicas em alguns casos.

DISCUSSÃO



5 DISCUSSÃO

Este estudo foi delineado para confirmar o envolvimento de genes previamente identificados como alterados quanto ao número de cópias de DNA por HR-CGH e CGH-array ou que estavam presentes em redes biológicas construídas a partir dos resultados da análise de CGH-array. Nestas análises prévias, foram utilizadas amostras de pacientes que tiveram um bom prognóstico (mais de 10 anos de seguimento clínico) (grupo I) e casos que evoluíram para metástases (testículo, linfonodos, ossos) (grupo II) em curto período de tempo (inferior a 3 anos). Para avaliar ganhos e perdas genômicas por CGH-array foi utilizada a plataforma BACs HB68 (6k - *Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, USA*). Nos casos de bom prognóstico foram detectados 36 BACs envolvidos em ganhos e 171 em perdas; no grupo II foi observado 157 BACs envolvidos em ganhos e 160 em perdas. Os BACs inseridos nesta plataforma continham em geral, um a oito genes conhecidos ou putativos. Os genes avaliados no presente estudo foram selecionados a partir desta análise prévia.

Foram avaliados os níveis de expressão dos transcritos *C-MYC*, *NKX3.1*, *SRF* e *SRC* por RT-PCR quantitativa em tempo real usando o método baseado em *SYBR Green*. Foram utilizados controles de qualidade para todos os procedimentos como proposto pelo MIQE Guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*, descrito por BUSTIN et al. (2009). Como recomendado, só foram utilizados no presente estudo os pares de iniciadores que não apresentaram nas análises de curvas de dissociação produtos amplificados contendo dímeros de iniciadores ou produtos inespecíficos. Além disso, os tamanhos dos amplicons de cada gene gerados pela qRT-PCR foram rotineiramente checados por eletroforese em gel de

agarose. Como observado na seção de Resultados, as curvas de dissociação dos genes testados mostraram picos únicos, indicando a presença de produtos amplificados específicos para cada gene avaliado.

Níveis elevados dos transcritos do oncogene *c-MYC* foram detectados em 87% dos carcinomas de próstata, mostrando-se significativamente aumentados em relação às próstatas normais e aos tecidos não neoplásicos adjacentes (TecAdj). Esses resultados corroboram os dados da literatura, que também reportaram aumento de expressão de *c-MYC* em CaP quando comparados com tecidos prostáticos normais adjacentes (GUREL et al. 2008; JIA et al. 2009; IWATA et al. 2010).

Apesar dos altos níveis de *c-MYC*, os tumores com estadio pT3/T4 apresentaram níveis significativamente mais baixos de expressão ($P=0,0388$) em comparação com os tumores com estadio pT2. Em contraste, há relato de que o aumento de expressão deste gene está associado com fatores determinantes de pior prognóstico nos CaPs (GALLUCCI et al. 2008). Por outro lado, PROWATKE et al. (2007) hipotetizaram que o aumento de expressão de *c-MYC* em tumores de próstata favoreça a proliferação celular e alterações nas vias apoptóticas, mas não nas etapas de manutenção e progressão do tumor, o que pode explicar a diminuição de expressão do *c-MYC* nos CaP de estadio III-IV. Os dados obtidos no presente estudo corroboram a hipótese de que o aumento do transcrito seja relevante nos estágios iniciais do processo tumoral.

Os resultados da expressão da proteína *c-MYC* demonstram que 91% dos tumores, 91% das HPB, 56% dos tecidos adjacentes não neoplásicos e tecido prostático normal apresentaram marcação nuclear positiva. Há controvérsias em literatura quanto o padrão de imunomarcção de *c-MYC*, sendo que alguns estudos consideraram a marcação citoplasmática (JENKINS et al. 1997; YANG et al. 2005; PROWATKE et al. 2007), o que é surpreendente uma vez que as funções da proteína *c-MYC* se relacionam

com o núcleo celular (PERSSON et al. 1984). Semelhante ao observado no presente estudo, GUREL et al. (2008) avaliaram a imunolocalização nuclear desta proteína e verificaram marcação de c-MYC significativamente maior nos casos de CaP quando comparados ao tecido adjacente normal.

No presente estudo foi também demonstrado que a intensidade de marcação da proteína c-MYC por IHQ foi semelhante entre as amostras de HPB e CaP; porém tanto os carcinomas quanto as HPBs apresentaram expressão protéica aumentada na comparação com o tecido adjacente normal ($P=0,002$ e $P=0,03$, respectivamente), confirmando assim que a atividade proliferativa das hiperplasias (HPB) é semelhante a dos tecidos tumorais e que o oncogene c-MYC está envolvido em lesões proliferativas da próstata. ROYUELA et al. (2000) descreveram positividade citoplasmática em casos de HPB e CaP, como o observado em nosso estudo, com imunomarcação nuclear de c-MYC semelhante nestes dois grupos de amostras.

Um diferencial do nosso estudo é a comparação entre os níveis de expressão de cMYC no tecido adjacente não neoplásico e na próstata normal (proveniente de necropsia e sem qualquer alteração histopatológica) tanto na análise de expressão gênica quanto proteica. Níveis elevados de *c-MYC* foram detectados nos TecAdj em relação à próstata normal, porém inferiores aos CaP, sugerindo que alterações moleculares possam ocorrer no tecido adjacente à área tumoral, sem que se observem alterações morfológicas, mesmo microscópicas. Um exemplo é o resultado da expressão gênica em um caso pareado de tecido tumoral e TecAdj (caso 88), em que se observou altos níveis de transcritos nos dois tecidos, gerando um questionamento se o tecido prostático adjacente às lesões pode ser considerado como padrão de normalidade na comparação de biomarcadores prognósticos e preditivos. GUREL et al. (2008) relataram que apesar dos níveis elevados de c-MYC nos CaP primários de alto grau de Gleason (4-5) e nas

lesões metastáticas, estes foram menores do que os tumores com menor grau de Gleason (3). De maneira semelhante, em nosso estudo, menores níveis proteicos de c-MYC foram associados significativamente com o escore de Gleason mais alto ($P=0,02$). PROWATKE et al. (2007) relataram uma correlação negativa entre positividade para c-MYC e escore de Gleason. Porém, neste estudo não foi considerada a intensidade de imunomarcção. Os autores sugeriram que o aumento de expressão de c-MYC em tumores de próstata contribui para a proliferação e início da hiperplasia celular, mas possivelmente não seja relevante na manutenção e progressão do tumor. Os autores argumentam que como cMYC atua em diferentes vias, incluindo a via de apoptose; a regulação negativa de cMYC durante a progressão do tumor pode ser um mecanismo de evasão tumoral da apoptose. Uma das vias envolvidas na regulação da apoptose é a ativação do p53 pelas células que apresentam aumento de expressão de MYC, com conseqüente indução da morte celular (ALBIHN et al. 2010).

Embora não tenha sido detectada associação significativa entre níveis protéicos diminuídos de cMYC e tumores com extensão extra-prostática ($P=0,30$), como observado na análise dos transcritos de *cMYC*, observou-se maior frequência de casos com expressão fraca da proteína entre os tumores com extensão extra-prostática (15%, 6/41) comparado aos tumores sem extensão (7%, 11/147). Não foi detectada associação significativa entre níveis mais baixos dos transcritos com tumores com escore de Gleason alto [$>7(+3)$], como observado na análise proteica. No entanto, observou-se maior frequência de tumores com expressão normal ou diminuída de cMYC (16%) dentre os tumores com escore de Gleason alto comparado aos tumores com escores de Gleason baixo (11%), sendo que os níveis mais baixos de transcritos foram detectados nos tumores com maiores graus de Gleason (Gleason 8-9).

Em resumo, estes dados reforçam a hipótese que a expressão de cMYC é regulada durante a carcinogênese prostática, com expressão aumentada nos tumores de maneira geral, porém níveis ainda mais altos são detectados nos tumores menos agressivos.

Os mecanismos envolvidos no aumento de expressão de c-MYC nos tumores prostáticos não estão completamente estabelecidos. Segundo ALERS et al. (2001), ganho em 8q é um evento precoce na carcinogênese prostática. JENKINS et al. (1997) relataram que nos CaP há maior marcação citoplasmática da proteína c-MYC devido ao ganho do número de cópias do cromossomo 8, que por sua vez está relacionado com metástase em linfonodos. Mais recentemente, PROWATKE et al. (2007) sugeriram que a expressão protéica de c-MYC não é primariamente dependente de alterações no número de cópias do cromossomo 8 ou do gene *c-MYC*, o que indica que a expressão de *c-MYC* nos CaP não é regulada simplesmente por um efeito de dosagem gênica.

No presente estudo foi demonstrado aumento dos transcritos e da expressão da proteína por qRT-PCR e IHQ. A análise por aCGH e HR-CGH dos estudos prévios do grupo revelou um aumento do número de cópias do gene ou da região cromossômica em 3/12 e 1/8 casos, respectivamente. Considerando o número limitado de casos com ganhos envolvendo *c-MYC*, é possível que o mecanismo envolvido no aumento do transcrito e da proteína, pelo menos em um significativo número de casos, não seja por efeito de dosagem gênica. GALLUCCI et al. (2009) relataram que apenas 1,6% (2/117) dos CaP analisados apresentavam amplificação de *c-MYC*. O gene *c-MYC* é considerado um regulador chave da proliferação, embora a amplificação deste oncogene seja variável em casos com aumento de expressão em tumores de próstata (BOUCHARD et al. 2001; REITER et al. 2000; SAVINAINEN et al. 2004). Nas células prostáticas *in vitro*, o gene *c-MYC* parece ser capaz de imortalizá-las em uma única etapa, sem a

necessidade aparente de ativação de outros oncogenes ou inativação de genes supressores (IWATA et al. 2010).

Há relatos de que eventos de translocações cromossômicas, como nos casos de linfoma de Burkitt, podem ativar o *locus* de *c-MYC* (GARDNER et al. 2002). Este poderia ser um mecanismo alternativo para explicar o aumento de transcritos e da proteína. Além disso, uma pequena proteína produzida como resultado de tradução alternativa do gene *MBP1/ENO1* localizada no núcleo tem sido relatada como um elemento de ligação ao promotor do gene *c-MYC* regulando sua expressão. A proteína MBP1 (*c-myc promoter binding protein*) regula a expressão de vários outros genes alvo envolvidos em processos tumorais. Recentemente, STEELE et al. (2010), demonstraram que a expressão exógena de MPB1 inibe o crescimento de carcinomas de próstata e que esta proteína é modulada pela expressão de miRNAs envolvidos na regulação do crescimento das células tumorais. O resultado do estudo indicou que a expressão exógena do *miR-29b* inibe Mcl-1, COL1A1, COL4A1 e MMP2 em células de carcinoma de próstata. Outros miRNA podem atuar diretamente na regulação da expressão do gene *c-MYC*, como o *miR-145*. Em análise de citometria de fluxo de células de câncer de cólon em modelos murinos, SACHDEVA e MO (2010) observaram que o miR145 induz a parada do ciclo celular nas fases G0-G1 e diminui o tempo da fase S, sugerindo que sua expressão ocorre em células menos proliferativas. Esta inibição da proliferação celular é mediada pela ação direta do miR-145 no oncogene c-Myc, por ligação na porção 3'-UTR. Este mesmo miRNA age em genes como Ciclina D1 e *elF4E*, também envolvidos na regulação do ciclo celular. A diminuição deste miRNA poderia explicar a expressão aumentada de *c-MYC* nestes tumores. Há relatos de diminuição do *miR-145* em câncer de próstata (COPPOLA et al. 2010). Regulação de *c-MYC* pelo miRNA *let-7a* foi demonstrado em linfoma de Burkitt

(SAMPSON et al., 2007) e em carcinoma de pulmão (HE et al. 2010), sendo que a expressão de *let-7a* também está alterada nos carcinomas prostáticos (COPPOLA et al. 2010). Em resposta ao dano de DNA, o *MYC* é negativamente regulado pelo miR-34c, para que haja a limitação da síntese protéica. A manutenção da replicação celular em condições de estresse pode ser um dos mecanismos em que o *MYC* promoveria instabilidade genética, atingindo seu potencial oncogênico (CANNEL e BUSHELL 2010).

No presente estudo foi observada uma alta concordância entre os achados de expressão gênica e protéica de c-MYC; 83% dos CaP mostraram concordância entre a expressão gênica aumentada (QR>2,0) e expressão proteica intensa. Dezesete por cento dos casos mostraram resultados discordantes. GUREL et al. (2008) relataram que a presença do mRNA de *c-MYC* não necessariamente se correlaciona com a presença da proteína c-MYC e que fatores pós-transcricionais e de tradução podem interferir no nível protéico. O controle da expressão de c-MYC é altamente regulada. A transcrição de *c-MYC* é controlada por diversas vias de sinalização, como *Wnt*, *Notch*, *tirosina quinase*, *TGF- β* (*transforming growth factor - beta*), vias estas que se encontram alteradas em diversos tumores. Em nível de pós-tradução, a expressão de c-MYC pode ser controlada por fosforilação reversível e sequencial em dois sítios conservados da proteína que levam a ubiquitinação e degradação proteossômica da proteína. Alterações em várias proteínas envolvidas nestas vias são relatadas em tumores sólidos e parecem contribuir para expressão estável de c-MYC nestes tumores (ALBIHN et al. 2010).

IWATA et al. (2010) questionaram se a expressão aumentada de *c-MYC* de forma isolada é suficiente para que ocorra a transformação maligna. A resposta da ação desregulada de *c-MYC* depende de seus níveis de expressão. Segundo os autores, baixos níveis de expressão, que ocorrem fisiologicamente durante a proliferação celular em

vários tipos celulares, são normalmente tolerados pelas células sem ativação dos mecanismos de supressão tumoral, enquanto altos níveis de expressão normalmente induzem a apoptose e outras vias de “vigilância” tumoral. Isto indica que em certos tipos celulares o *c-MYC* precisa cooperar com outros genes associados à sobrevivência celular que podem ser ou não oncogenes clássicos ativados ou genes supressores inativados para que haja a transformação celular.

O gene *NKX3.1* está localizado em 8p21, região cromossômica que apresenta perda de heterozigose (LOH) em aproximadamente 50% a 85% dos casos de CaP (BETHEL et al. 2006). Este gene funciona como um “*gatekeeper*”, que previne outras alterações genéticas que iniciariam o processo carcinogênico da próstata, uma vez que ele regula a taxa de proliferação das células epiteliais lumbais (SONG et al. 2009). BHATIA-GAUR et al. (1999) sugeriram que a perda de *NKX3.1* seria um evento inicial na carcinogênese prostática, a partir de uma lesão pré-neoplásica; eventos genéticos subsequentes poderiam atuar na progressão para carcinoma.

No presente estudo foi observado uma diminuição de expressão do transcrito *NKX3.1* em 34% das amostras tumorais e em 67% dos tecidos adjacentes em relação ao controle (próstata normal). Foi detectado o aumento de expressão de *NKX3.1* em 5% dos CaP. As comparações entre níveis de transcritos e as variáveis clínicas e histopatológicas demonstraram que níveis reduzidos dos transcritos foram associados significativamente com ausência de história familiar de CaP. Este achado é inédito, e por isso deve ser melhor investigado.

Os resultados da expressão protéica de *NKX3.1* mostraram que 93% dos CaP e 100% dos Tec Adj e HPB apresentavam redução dos níveis proteicos. O presente estudo corrobora os achados de BETHEL et al. (2006), tanto para análises de expressão gênica quanto protéica, que demonstraram níveis reduzidos dos transcritos em 50% dos CaP

(6/12) utilizando como controle amostras pareadas de Tec Adj. Os autores também relataram a diminuição da expressão protéica de NKX3.1 nos CaP em relação ao Tec Adj.

Utilizando linhagens celulares de câncer de próstata, IWATA et al. (2010) observaram aumento nos transcritos de *NKX3.1* após o silenciamento do gene *c-MYC* por siRNA. Apesar de serem necessários mais estudos para se determinar se este efeito é diretamente transcricional ou pós-transcricional, os resultados apresentados pelos autores indicam que o *c-MYC* regula o nível de expressão de *NKX3.1* em focos de PIN. Porém, já em carcinomas prostáticos maiores e invasivos, várias células podem apresentar altos níveis de *c-MYC* e *NKX3.1*, o que sugere que a regulação eficiente do *c-MYC* sobre o *NKX3.1* observado nos focos de PIN, pode estar perdida nas lesões mais invasivas. Em nosso estudo os resultados da avaliação da expressão dos transcritos de *NKX3.1* apresentaram apenas cinco casos com aumento de expressão, destes cinco casos 80% (4/5) também tiveram aumento dos transcritos *c-MYC*. Apesar de um número pequeno de casos avaliados, esses achados dão evidências adicionais sugerindo a associação entre o *NKX3.1* e o oncogene *c-MYC*.

O modelo prevalente da expressão de NKX3.1 no câncer prostático humano sugere que há uma diminuição progressiva desta proteína em focos de PIN, em carcinomas invasivos, culminando em perda total nos adenocarcinomas metastáticos (SONG et al. 2009). GUREL et al. (2010) sugeriram recentemente que a proteína NKX3.1 é um marcador específico de tecido metastático de adenocarcinomas de próstata. Os autores relataram que 99% dos tecidos metastáticos avaliados eram positivos para expressão desta proteína, embora a mediana dos escores de imunomarcção fosse menor que nos carcinomas primários prostáticos não metastáticos. Entre os 18 casos que evoluíram para metástase avaliados no nosso

estudo, apenas 38% (7/18) mostraram-se positivos para a expressão de NKX3.1. A frequência de casos negativos foi semelhante entre os tumores não metastáticos e os metastáticos.

Assim, outros estudos são necessários para avaliar a associação de NKX3.1 com metástase nos tumores prostáticos. No entanto, alguns estudos mostram a redução de NKX3.1 em PIN e em alguns adenocarcinomas, enquanto em quase todos os adenocarcinomas invasivos foi observada uma diminuição relativamente menor mantendo níveis significativos de NKX3.1 (KORKMAZ et al. 2004; BETHEL et al. 2006). ASATIANI et al. (2005), revisaram a questão da expressão protéica de NKX3.1 em CaP e relataram que a ausência desta proteína é rara (aproximadamente 5% dos casos), porém a intensidade de marcação era reduzida nos CaP em relação ao epitélio prostático normal. Os resultados apresentados no nosso estudo concordam parcialmente com esses autores. Se por um lado, foi mostrado diminuição de expressão nos CaP (expressão fraca em 34%) em comparação com a marcação de intensidade moderada nas células epiteliais da próstata normal, por outro lado, observamos que 59% dos CaP, 30% das HPB e 75% dos TecAdj apresentaram ausência de expressão proteica, não sendo portanto um evento raro. Vale ressaltar que a maior frequência de casos negativos foi observada no grupo de TecAdj (75%), reforçando que estes tecidos não-neoplásicos também apresentam alterações de expressão importantes e devem ser questionados como controles normais utilizados nos diferentes estudos.

LEI et al. (2006) mostraram que é necessária a presença de NKX3.1 para a atuação da via do p53, indicando que a redução na expressão desta proteína pode por si só anular a sinalização do p53, gene que tem a importante função de “guardião do genoma” e ativador da apoptose. Tal achado tem suporte nos resultados obtidos por estes autores em próstata de camundongos, onde a redução dos níveis protéicos de

NKX3.1 foi observada pela indução do c-MYC, que previne a apoptose induzida pelo p53, facilitando a habilidade do c-MYC em transformar as células epiteliais em malignas. Em nosso estudo não foi avaliada a expressão de p53, nem o índice apoptótico, porém a imunomarcação fraca ou ausente de NKX3.1 em 93% dos CaP nos faz inferir sobre a influência dessa proteína na carcinogênese prostática e desenvolvimento da HPB (100% das amostras apresentaram expressão fraca ou ausente), em comparação com o tecido prostático normal (que apresentou marcação moderada) uma vez que a presença de NKX3.1 é necessária para a ativação da via do p53, que permitiria a correção de danos no DNA ou a indução da apoptose.

No presente estudo não foi observada correlação entre os níveis de expressão proteica e gênica de NKX3.1 nos CaP, já que estes tiveram expressão gênica diminuída em menos da metade dos casos, em comparação a proteica, que foi diminuída para grande parte dos casos avaliados. Apesar de não apresentarem resultados significativos foram observados alguns achados concordantes para os CaP e TecAdj. Nos tumores 70% apresentaram níveis diminuídos tanto para os transcritos quanto para a proteína, o mesmo foi observado em 75% dos tecidos adjacentes não neoplásicos. KORKMAZ et al. (2004) mostraram uma alta correlação entre os resultados de expressão de transcritos e níveis protéicos (IHQ) de NKX3.1 em próstata normal e CaP. Os autores encontraram que 74% dos casos avaliados apresentavam níveis de expressão mRNA e proteína concordantes nos dois tecidos avaliados. A mesma correlação entre os níveis de expressão gênica e proteica foi descrita por BETHEL et al. (2006) em focos de PIA (atrofia inflamatória proliferativa) (cinco de sete casos). Porém nesta mesma lesão, os autores encontraram três situações diferentes: mRNA em níveis normais e proteína diminuída; níveis similares de mRNA e proteína; e nível de mRNA aumentado e expressão protéica diminuída. Os autores sugeriram que a regulação dos níveis protéicos

de NKX3.1 deve ocorrer de uma forma sequencial, em múltiplas etapas, incluindo os níveis de tradução e/ou estabilidade protéica, como por exemplo o papel central da tirosina quinase serina (CK2) na estabilidade proteica de NKX3.1, por protegê-la da degradação proteossômica.

Uma variedade de relatos em literatura sugere que a perda da expressão de *NKX3.1* é um evento inicial na carcinogênese prostática, resultando em lesão pré-neoplásica e que eventos genéticos subseqüentes promoveriam a progressão para carcinoma (VOELLER et al. 1997; BHATIA-GAUR et al.1999; DE MARZO et al. 1999; NELSON et al. 2003). Metilação anormal e perda de um alelo *NKX3.1* levam a expressão diminuída dos níveis da proteína. Uma mutação inativadora foi também identificada como relacionada a fator de risco precoce de aparecimento do câncer de próstata (ZHENG et al. 2006). Ainda não são conhecidas as conseqüências moleculares desta perda como evento precoce da carcinogênese prostática, incluindo em que momento ela ocorre durante a progressão maligna, bem como seu papel no comportamento tumoral, mas os resultados em literatura indicam que terapias baseadas em promover o aumento dos níveis protéicos de NKX3.1 para normais poderiam ser importantes para suprimir o processo tumoral da próstata.

O gene *SRF* é considerado um supressor tumoral e tem sido descrito como envolvido em carcinomas de próstata (YEMELYANOV et al. 2007). No presente estudo, foram observados níveis semelhantes de expressão do transcrito *SRF* entre os grupos de amostras tumorais e tecidos adjacentes. Entretanto, foram observadas diferenças significativas entre os níveis menores do transcrito com estadiamento alto (III+IV) e presença de extensão extra-prostática. A diminuição de expressão deste gene foi observada em 25% dos casos de CaP e aumento em 11% dos casos. A maioria dos casos apresentou níveis de expressão normal para *SRF*. Embora em um pequeno número

de casos (10/95 casos), foi observado que os tumores com aumento de expressão gênica apresentavam baixo escore de Gleason (90%) ausência de extensão extra-prostática e invasão vesicular (todos os casos) e apesar de três deles apresentarem recidiva bioquímica nenhum evoluiu para metástase, até o momento. Estes dados são compatíveis com a função de supressor tumoral. A identificação do SRF como um mediador da ação do andrógeno FLH2 estabelece a existência de um novo mecanismo indireto da ação de andrógenos e dá a primeira indicação que o SRF é importante no desenvolvimento dos carcinomas prostáticos (HEERMERS et al. 2007).

Altos níveis protéicos de SRF foram encontrados em 93% dos tecidos tumorais e em todos os tecidos adjacentes não neoplásicos, semelhante ao padrão observado no tecido prostático normal, que apresentou intensidade forte de imunomarcção desta proteína. Estes achados foram semelhantes aos obtidos na análise de expressão do transcrito (64% dos casos mostraram expressão normal e 25% aumentada entre os tumores). As hiperplasias prostáticas benignas apresentaram aumento de expressão protéica em 83% dos casos avaliados.

Resultados contraditórios foram apresentados em carcinomas de tireóide e em colorretais. Em carcinoma da tireóide, KIM et al. (2009) detectaram forte marcação nuclear e citoplasmática de SRF. A proteína estava expressa em 50 dos 63 casos de carcinoma papilar (79%) e em 6 dos 9 casos de carcinoma anaplástico (67%). Os autores verificaram que o aumento de expressão de SRF estava associado com aumento da motilidade e a invasividade celular. Semelhante a estes achados, CHOI et al. (2009) demonstraram que o aumento de expressão de SRF no carcinoma colorretal tem um papel crucial na progressão do tumor e na metástase para o fígado.

JU et al. (2009) avaliaram a estabilidade da proteína NKX3.1 com o intuito de aumentar os seus níveis protéicos para desenvolver uma terapia alvo-específica dirigida

aos tumores prostáticos que apresentassem diminuição desta proteína. Os autores mostraram que interações entre o domínio ácido e a região de *motifs* do NKX3.1 o qual interage com SRF (no homeodomínio de NKX3.1) estabiliza e promove aumento da proteína NKX3.1 favorecendo a ligação deste fator de transcrição com o DNA. É sabido que a fosforilação do domínio ácido leva a degradação proteossômica lenta de NKX3.1 em células prostáticas, sendo assim a estabilização da proteína é importante na manutenção das funções desta proteína. Em nosso estudo, quando foram comparados os baixos níveis de expressão das duas proteínas, SRF e NKX3.1 (total 10 casos), foi observado que oito casos apresentaram estadios pT3/T4 e oito mostraram um risco de recorrência moderado a alto; um destes pacientes apresentou a doença aos 43 anos. Estes achados sugerem que a expressão baixa concomitante das duas proteínas poderia ser um indicador de pior prognóstico em carcinomas de próstata.

Foram avaliados neste estudo o padrão de expressão das proteínas TIMP3 e NCOA1, por mostrarem-se ligados ao SRF nas análises de redes biológicas.

Inibidores endógenos de metaloproteinases, como a proteína TIMP3, tem um papel crítico na homeostase e remodelamento da matriz extracelular. A perda da regulação desses mecanismos contribui para o desenvolvimento de metástases (BAKER et al. 1999).

No presente estudo, foi observada diminuição da expressão de TIMP3 em 45% dos CaP, 83% das amostras de HPB e em 78% dos TecAdj. RIDDICK et al. (2005) relataram a diminuição da expressão de TIMP3 em CaP e em HPB. A expressão de TIMP3 foi relatada também como diminuída ou perdida em vários tumores como câncer de mama (HELLEMAN et al. 2008), colorretal (BAI et al. 2007) e carcinoma de pulmão (MASHKOVA et al. 2006). STAMEY (2001) relatou níveis reduzidos de TIMP3 por análises de expressão gênica em larga escala comparando CaP *versus* HPB.

Nossos achados corroboram com os dados descritos em literatura revelando diminuição da expressão da proteína TIMP3 em carcinomas de próstata.

Foi também verificado no presente estudo uma associação entre a diminuição de expressão de TIMP3 com altos escores de Gleason ($P=0,0009$), sugerindo uma correlação com carcinomas mais agressivos, já que esta proteína inibe a ação das metaloproteinases, que colaboram com a invasão estromal das células neoplásicas (Gu et al., 2008). Quando comparados os baixos níveis de expressão de TIMP3 com os baixos níveis de expressão da proteína SRF detectado em apenas oito casos, verificou-se que cinco apresentavam altos escores de Gleason, seis mostraram recidiva; cinco tinham alto a moderado risco de recorrência; quatro tinham idade inferior a 57 anos e dois casos evoluíram para metástase.

Alguns mecanismos podem estar envolvidos na redução da expressão desta proteína incluindo a hipermetilação da região promotora de TIMP3 ou a regulação via microRNAs. Vários estudos demonstraram metilação aberrante em vários tumores incluindo carcinomas de próstata (HOQUE et al. 2005; SMITH et al. 2008; KWABI-ADDU et al. 2010). Recentemente, SONG et al. (2010) relataram que os níveis de expressão da proteína TIMP3 foram inversamente associados com a expressão do miR-21, sugerindo que este microRNA pode estar envolvido no mecanismo de regulação do gene *TIMP3* em linhagens celulares e tumores primários de mama.

O gene *TIMP3* foi sugerido como um candidato a ser usado em terapia gênica em carcinomas de próstata. ZHANG et al. (2010) demonstraram que a expressão aumentada induzida de TIMP-3 na linhagem celular de próstata PC-3M promove a inibição da invasão e a proliferação de células de câncer de próstata *in vitro* assim como a inibição do crescimento tumoral *in vivo*. Em conjunto, esses dados reforçam o envolvimento do gene *TIMP3* em carcinomas de próstata.

Neste estudo foi avaliada a expressão da proteína NCOA1/SRC-1. Um dos grupos melhor descritos de co-ativadores receptores de esteróides é a família p160, que consiste das proteínas NCOA1/SRC-1, TIF2/SRC-2 and RAC3/AIB1/SRC-3. O NCOA1/SRC-1 tem sido descrito como importante na regulação da atividade transcricional das células de câncer de próstata. O câncer de próstata é uma doença andrógeno-dependente e, conseqüentemente, a terapia baseada em deprivação de andrógenos é o tratamento primário para a doença metastática. Os andrógenos agem por meio do receptor de andrógeno (AR) e a expressão aumentada dessa proteína tem sido associada com pior prognóstico em CaP (LI et al. 2004). O SRC-1 é um co-ativador do AR.

Aqui, relatamos o aumento dos níveis protéicos de NCOA1/SRC-1 em 81% dos CaP e em 65% das HPB. Os tecidos adjacentes não neoplásicos mantiveram o padrão de marcação semelhante ao da próstata normal em 89% dos casos avaliados. Em adição, após análise multivariada dos dados obtidos foi verificado que a proteína NCOA1/SRC-1 é um marcador prognóstico independente para recorrência bioquímica. Dados em literatura confirmam o papel da proteína NCOA1/SRC-1 com características de agressividade tumoral. GREGORY et al. (2001), demonstraram o aumento desta proteína em tumores de próstata hormônio-refratários quando comparados com HPB ou tumores andrógenos dependentes. AGOULNIK et al. (2005) demonstraram que altos níveis de SRC-1 estão associados a tumores mais agressivos (estadiamento clínico, comprometimento de linfonodos, extensão extracapsular, invasão em vesícula seminal e escores de Gleason). Inversamente, TIEN et al. (2009) utilizando um modelo *in vivo* demonstraram que o SRC-1 não é um co-ativador essencial para dirigir a carcinogênese da prostata ou a promoção para metástases em camundongos.

O mecanismo que leva a aumento da expressão do gene *NCOA1/SRC-1* não é bem estabelecido (MAKI et al. 2006), entretanto, vários estudos demonstraram que os níveis de expressão gênica e protéica estão positivamente correlacionados com os tumores de próstata mais agressivos (FUJIMOTO et al. 2001; GREGORY et al. 2005; AGOULNIK et al. 2005) assim como em outros tumores. Em uma recente revisão, XU et al. (2009) relataram que 19 a 29% dos carcinomas mamários apresentam níveis aumentados de SRC-1 e que este aumento tem sido positivamente correlacionado com os níveis de expressão de ERBB2, metástase em linfonodos, recorrência da doença e pior sobrevida livre da doença. Um estudo recente também demonstrou que aumento dos níveis de SRC-1 é um excelente preditor prognóstico de recorrência do câncer de mama após terapia (REDMOND et al. 2009).

Assim, os dados do presente estudo confirmam o envolvimento do gene *NCOA1/SRC-1* com características de pior prognóstico em carcinomas de próstata.

A tirosina quinase, SRC atua em vários processos neoplásicos invasivos sendo o primeiro oncogene a ser descrito. O gene *SRC* está envolvido no processo de invasividade tumoral e medeia a sinalização de receptores oncogênicos como EGFR, HER2, PDGFR, FGFR e VEGFR (ARAUJO e LOGOTHETIS, 2010), além de ter sido descrito como gene principal na patogênese de metástases ósseas. No presente estudo, foi observado que apenas 14% dos CaP apresentavam aumento de expressão do transcrito *SRC*. Segundo ARAUJO e LOGOTHETIS (2010), a expressão de SRC em linhagens de células prostáticas neoplásicas é dependente do estadio da doença e se associa com a progressão dos tumores prostáticos dependentes à independentes de andrógenos. Como não foi possível avaliar o status hormonal destes casos, não é possível relacioná-los com aumento de expressão de *SRC*. As variáveis clínicas, que indicariam que o aumento de expressão pudesse estar relacionado ao pior prognóstico,

não confirmaram esta possibilidade, pois nenhum dos 13 casos com aumento de expressão evoluiu para metástase e 30% (4/13) deles apresentaram recidiva bioquímica. Altos níveis deste transcrito em CaPs normalmente são detectados em células em estágios metastáticos e osteoclastos maduros, o que confirma o envolvimento deste gene na evolução da doença para metástase óssea (EDWARS 2010). O mecanismo de amplificação e aumento de expressão foi primariamente descrito em tumores de mama e ovário (ANZICK et al. 1997; LIST et al. 2001). Nos tumores de mama foi descrito o envolvimento do oncogene *SRC* com a regulação da transcrição de ciclina D1 e que a expressão deste gene pode promover o crescimento do tumor (PLANAS-SILVA et al. 2001). Esse achado levou à hipótese que *SRC* é um importante regulador da proliferação e sobrevivência das células tumorais. Altos de níveis de *SRC* foram detectados em células prostáticas tumorais durante a progressão direcionada aos estágios de malignidade (CHUNG et al. 2007).

MAYER e KROP (2010) relataram que a ação desregulada do *SRC* pode ocorrer por eventos não genéticos, como a manutenção da atividade de fosforilação, associação com ligantes de proteínas estimulatórias e aumento de sinalização nos receptores tirosina quinases. Apesar da proteína *SRC* ter um importante regulador da proliferação e sobrevivência dos CaPs, os níveis de transcritos podem estar normais e sua ação ser mediada por um dos mecanismos acima descritos.

Diferentemente do que foi observado para as demais proteínas avaliadas neste estudo, a proteína *SRC* mostrou um padrão de imunomarcacão importante tanto nas células epiteliais quanto no estroma de todos os tecidos prostáticos avaliados, por este motivo foi avaliada no citoplasma das células epiteliais (intensidade) e no estroma adjacente (intensidade e extensão). Os CaP, HPB e TecAdj apresentaram aumento de expressão no componente epitelial, em relação a próstata normal, o que corrobora seu

papel oncogênico (ARAUJO e LOGOTHETIS, 2010), sendo que os tecidos não neoplásicos tiveram maior expressão do que os tumores. Outro fator que pode contribuir para essa diferença é a função do SRC em ativar receptores de andrógeno (AR) (DAI et al. 2010). As neoplasias andrógeno-independentes podem necessitar de menor concentração de SRC do que as lesões proliferativas dependentes de hormônio, como as HPB. Além disso, outros receptores não tirosina quinases, como o ETK, podem regular a fosforilação de AR, com correlação mais forte do que o SRC (DAI et al. 2010) .

O crescimento e a progressão dos carcinomas não dependem exclusivamente das células epiteliais transformadas, mas da efetiva participação do estroma, que sofre alterações como ativação de fibroblastos, remodelação da matriz extracelular e angiogênese, que tornam esse componente tecidual num microambiente que dá suporte à metástase (CASEY et al. 2010). Sendo assim, a expressão protéica de SRC foi verificada no estroma do tecido prostático normal e avaliada nas diferentes lesões. A extensão de imunomarcção de SRC no estroma dos CaP foi menor em 48% deles, em relação ao tecido prostático normal, HPB e TecAdj, sendo que estes dois últimos tiveram resultados semelhantes a próstata normal. Em relação à intensidade de marcação estromal, 13% dos CaP, 35% das HPB e 33% dos TecAdj apresentaram maior expressão, o que pode ser justificado pela ativação de receptor de estrógeno (ER) e AR, que por sua vez, ativa o SRC, que irá mediar a proliferação celular (MAYER e KROP 2010), evento que pode ser observado em maior ou menor grau, dependendo da lesão avaliado ou seu estágio de desenvolvimento. No entanto, para confirmar esta hipótese seria necessário avaliar a expressão destes receptores nos tecidos prostáticos (CaP, HPB e TecAdj) e correlacioná-los com a expressão da SRC.

ZHOU et al. (2005) relataram que a maioria dos casos apresentava aumento de expressão protéica nuclear de SRC e não detectaram marcação desta proteína no

estroma das células tumorais. XU et al. (2009), relataram que altos níveis protéicos de SRC estavam expressos em células estromais e basais e a expressão era ausente nas células epiteliais luminais. Estes dados sugerem que a expressão desta proteína no estroma das células tumorais pode ser tão relevante quanto sua expressão nas células epiteliais. Tendo em vista o papel de SRC em ativar o receptor de andrógeno (AR) já relatado em literatura e discutido anteriormente, o aumento da expressão protéica de SRC no estroma deve estar envolvido no desenvolvimento de HPBs e no início de tumores bem diferenciados dependentes de andrógeno. Porém, nos tumores mais agressivos andrógeno-independentes seriam necessários menores níveis SRC. Corroborando esta hipótese, neste estudo detectamos que tumores com menores níveis de SRC estromal estavam associados com recidiva bioquímica e níveis mais altos de PSA pré-cirúrgico.

Este oncogene tem sido identificado como um candidato a terapia alvo para pacientes com tumores sólidos (OKAMATO et al. 2010). Moléculas inibidoras de SRC estão em desenvolvimento para o tratamento de uma variedade de tumores, como próstata, mama e gliomas (SAAD e LIPTON, 2010). O mecanismo de atuação desta droga está envolvido na inibição dos processos de proliferação celular, invasão e metástase pelo fato desta molécula atuar como um agente citostático durante estes processos celulares (ARAUJO e LOGOTHETIS 2010).

Dos quatro genes ligados a SRC na análise das redes biológicas (*DAB2*, *ETV6*, *ATF1* e *ICAM 1*), três deles parecem se comportar de forma regulada pelo gene central *SRC*. Apenas o supressor *ATF1* não revelou envolvimento com o gene central.

A proteína DAB2 é responsável pela mediação de antagonistas de receptores androgênicos que medeiam o crescimento celular no CaP por interagir com a proteína SRC. Esta interação causa a inativação de ERK e AKT que são proteínas críticas nos

processo de proliferação e sobrevivência dos CaP (ZHOUL et al. 2005). Vários relatos em literatura evidenciam o envolvimento de DAB2 na supressão da atividade de SRC na proliferação de linhagens celulares de CaP (ZHOU et al. 2003; ZHOUL et al. 2005; ZHOU et al. 2006). Os resultados de ZHOU et al. (2003) demonstraram que a interação entre DAB2 e SRC pode liderar a inibição da fosforilação da tirosina 416 de SRC, uma molécula chave para a modulação da atividade quinase em CaP tratadas com EGFR. Esta interação pode resultar na inativação do efector ERK. Segundo os autores este é um mecanismo regulatório alternativo da atividade de SRC mediado por um potente fator negativo, DAB2.

No presente estudo foi avaliada a intensidade de marcação imunoistoquímica de DAB2 na membrana das células epiteliais dos CaP e nos tecidos não neoplásicos, e verificou-se a diminuição de expressão em 99% dos CaP, em mais da metade dos HPB e em 50% dos Tec Adj. A diminuição da expressão de DAB2 inibe o crescimento dos CaP, dando evidências que esta proteína atua no controle de vias de sinalização do crescimento celular (ZHOU et al. 2003). Para o nosso conhecimento não há relatos de análises da expressão protéica de DAB2 em tumores de próstata, porém a perda de expressão deste gene foi associada a vários tumores como mama, cólon e coriocarcinoma. BAGADI et al. (2007) relataram a diminuição da expressão protéica em 74% (67/91) dos tumores de mama enquanto todos os tecidos normais (10) apresentavam aumento de expressão desta proteína. Nos tumores de ovário a perda de expressão desta proteína foi descrita como um evento precoce (MOK et al. 1994; MOK et al. 1998). Diferentemente desses achados, o aumento da expressão protéica foi relatado em tumores pancreáticos primários, porém os níveis eram reduzidos nas metástases (HUANG et al. 2001). TONG et al. (2010) relataram a diminuição da expressão de DAB2 em 72% dos tumores nasofaríngeos (33/46 casos) resultante de

hipermetilação da região promotora do gene. Assim, os resultados do presente estudo concordam com os descritos em literatura em outros tumores que relataram uma alta frequência perda da expressão da proteína DAB2. Estes achados também parecem evidenciar esta perda de expressão ocorre precocemente no desenvolvimento de lesões prostáticas também pelo fato de ter sido detectada uma frequência elevada de perda de expressão entre as hiperplasias prostáticas (61% dos casos).

A proteína ATF1 é um membro de família de fatores de transcrição b-Zip que inclui CREB e elementos moduladores de resposta a cAMP. Estes fatores de transcrição b-Zip regulam genes alvo formando homodímeros ou heterodímeros com membros da família assim como com outros fatores de transcrição b-Zip como com membros da família JUN e FOS (para revisão, IWASAKI et al. 2007). A ATF1 parece agir como um ativador transcricional (ATLAS et al. 2001) ou repressor (DONG et al. 2002) de genes envolvidos na proliferação celular. O ATF1 também está relacionado a translocações formando produtos quiméricos em melanoma maligno de partes moles e em histiocitoma angiomatoide fibroso, EWS/ATF1 - t(12;22)(q13;q12). A expressão de ATF1 é aumentada em linfócitos transformados (HSUEH e LAIM 1995) e em células metastáticas de melanoma (JEAN et al. 2000). Neste estudo a análise da intensidade de marcação nuclear nos tumores e tecidos não neoplásicos revelou a presença de altos níveis de expressão desta proteína em 92% dos tumores e 100% casos de HPB e tecidos adjacentes. A expressão aumentada em todos os casos testados quando comparados ao tecido prostático normal revelam que essa alteração deve ocorrer no início do processo de proliferação anormal da próstata. Para nosso conhecimento este é o primeiro relato sobre o envolvimento da proteína ATF1 em CaP. Achados semelhantes foram descritos em outros tumores incluindo linfomas (HSUEH e LAI 1995) e metástases de melanoma (JEAN et al. 2000).

Eventos de deleção em 12p12-13 onde está mapeado ETV6, estão relacionados com a progressão e metástase nos CaP (KIBEL et al. 2002). Os autores relataram mutação do gene *ETV6* em dois de 19 pacientes com CaP, os quais estavam associados também com a perda de heterozigose neste locus. Estes achados são compatíveis com a hipótese clássica de inativação gênica em duas etapas para supressores tumorais. No presente estudo, a avaliação da extensão de imunomarcção nuclear de ETV6 revelou que 39% dos CaP, 57% dos HPB e 100% dos Tec Adj apresentavam mais de 50% das células marcadas. A diminuição da expressão protéica de ETV6 foi detectada em 61% dos CaP (escores 1 e 2) e foi estatisticamente diferente das HPB ($P=0,0008$) e dos Tec Adj ($P=0,002$) o que corrobora com o papel de supressor tumoral. Interessantemente, apenas o ETV6 apresentou um padrão diferente de marcação entre CaP e HPB quando comparado com as proteínas c-MYC, NKX3.1, SRF e SRC (marcadores de proliferação celular) os quais apresentaram um padrão semelhante de imunomarcção entre as lesões neoplásicas e não neoplásicas. Embora análises de expressão proteica de ETV6 ainda não tenham sido investigadas nos CaP, análises de LOH demonstraram a perda desta região em 23% dos tumores primários, 30% das metástases em linfonodos e 47% das metástases a distância (KIBEL et al. 2002). LAÉ et al. (2009) investigaram o evento de translocação entre ETV6 e NTRK3 em células secretoras de tumores mamários por hibridação fluorescente *in situ* (FISH), e detectaram que este evento pode influenciar nas características gênicas e protéicas destas células diferenciando-as dos demais tumores mamários.

A translocação ETV6/NTRK3 formando o produto químerico tem sido relacionado a via de SRC por ativar o gene que é responsável por codificar um receptor de transmembrana, envolvido no crescimento, transformação e sobrevivência celular. JIN et al. (2007), demonstraram alguns aspectos dos mecanismos moleculares da

regulação da ativação de ETV6/NTRK3 dependente das vias RAS-ERK1/2 e PI3K-AKT. Estas análises permitiram concluir que ETV6/NTRK3 está associado com SRC, de maneira que a inibição deste oncogene bloqueia completamente a atividade de transformação de ETV6/NTRK3. Não foram observadas diferenças significativas entre a expressão de ETV6 (que mostrou expressão moderada a alta na maioria dos CaP e HPB) entre as amostras testadas. Além disso, esse evento estava presente tanto nos carcinomas *in situ* quanto nos invasivos, demonstrando similaridade genética dessas lesões em carcinomas secretórios de mama. Em tumores renais, fibrossarcoma infantil e leucemia mielóide aguda também há descrição desta fusão gênica (SKOTHEIM et al. 2009).

A molécula de adesão ICAM1 está envolvida no processo metastático, facilitando a progressão das células metastáticas para os sítios secundários (LIANG et al. 2008). No presente estudo avaliamos a intensidade de imunomarcação da membrana desta proteína tendo sido observado que 7% dos CaP e 14% dos HPB mostraram positividade. Em concordância com estes achados, HAYES e SEIGEL (2009) investigaram a imunorreatividade de ICAM1 em tecido prostático normal, maligno e metastático. Os resultados dessas análises demonstraram que a marcação foi ausente no tecido prostático normal, enquanto que nos CaPs a intensidade de marcação apresentou-se moderada, porém estes autores avaliaram a imunomarcação nuclear. Não foram observadas diferenças significativas entre a expressão positiva de ICAM1 nos CaP (13 de 191 casos) com características de invasividade ou metástase, entretanto, o seguimento clínico destes pacientes teve mediana de 74 meses e 10 destes casos mostraram um risco de recorrência de moderado a alto. Novos estudos são necessários para elucidar o papel do ICAM1 em tumores de próstata.

Estudos de variações da expressão gênica e alterações no número de cópias de DNA em linhagens celulares de CaP demonstraram que ICAM1 está associado com ganho no potencial de malignidade, pois permite a adesão da célula tumoral ao endotélio vascular (ZHAO et al. 2005). CONRAD et al. (2009) demonstraram que ICAM1 é diferencialmente expresso durante a transição de linhagens celulares hormônio sensíveis para hormônios refratárias em CaP, com um importante papel nas hormônios refratárias, contribuindo com a habilidade de invasão, e talvez sendo um importante alvo de intervenção terapêutica. No entanto, esses achados não permitem elucidar o papel do ICAM1 na progressão dos CaP (CONRAD et al. 2009). Já nos carcinomas de células escamosas orais, o papel do ICAM1 foi evidenciado como crucial na sinalização e migração celular associado a COX-2 que é um mediador crítico no microambiente tumoral para a atividade metastática (YANG et al. 2010). Tem sido relatado o envolvimento da molécula de adesão ICAM1 na invasão de células neoplásicas pulmonares (HUANG et al. 2004) e de mama (ROSETTE et al. 2005).

Esta proteína selecionada pelas análises de redes biológicas está relacionada a via do gene SRC. ALLIGHAN et al. (2007) demonstraram que ICAM1 é responsável pela ativação desta tirosina quinase em leucócitos e que a inibição endotelial deste oncogene, por drogas terapêuticas, pode bloquear a migração das células tumorais, tornando-se portanto um interessante alvo para tratamento.

A análise comparativa dos genes e proteínas avaliadas com os achados prévios de CGH-array realizada entre os casos com tumores de bom prognóstico *versus* aqueles cujos pacientes evoluíram para metástase revelou dois genes candidatos, SRC/NCOA1 e SRF que devem ser melhor avaliados utilizando um conjunto maior de casos que evoluíram para metástase para confirmar seu papel como marcadores prognósticos em carcinomas de próstata.

CONCLUSÕES



6 CONCLUSÕES

c-MYC

- Níveis mais elevados dos transcritos e da proteína foram detectados nos CaPs em relação às próstatas normais e aos tecidos adjacentes;
- Os níveis semelhantes de expressão protéica entre HPB e CaP sugere o envolvimento desta proteína em estágios iniciais de doenças prostáticas proliferativas;
- Níveis mais altos de c-MYC foram detectados nos tumores com características de menor agressividade (estádio pT2, ausência de extensão extra-prostática e menor grau de Gleason) tanto na análise gênica quanto protéica sugerindo que este gene tem papel relevante no início do processo de proliferação celular anormal

NKX3.1

- Houve diminuição da expressão gênica e protéica nos CaPs e Tec Adj em relação aos níveis de expressão dos tecidos prostáticos normais; as HPB também apresentaram baixos níveis de expressão protéica sugerindo que este gene pode estar associado com alterações prostáticas;
- Não foi observada associação entre os níveis de expressão dos transcritos e das proteínas com as características clínicas e histopatológicas.

SRF

- Níveis de expressão dos transcritos e das proteínas mostraram-se semelhantes nos CaPs, HPB, Tec Adj e próstatas normais.

- Diminuição da expressão dos transcritos foi associada significativamente com estadiamento alto e presença de extensão extra-prostática;
- Foi observada uma concordância entre os achados de expressão do transcrito e da proteína;
- A diminuição concomitante das proteínas SRF e NKX3.1 foi observada em casos com características de pior prognóstico, sugerindo que estes dois genes podem cooperar na geração de tumores mais agressivos.

TIMP3 e NCOA1: genes ligados ao SRF nas análises de redes biológicas

- A diminuição da expressão proteica de TIMP3 foi detectada nos tumores e nos tecidos prostáticos não neoplásicos (HPB e Tec Adj) quando comparado ao padrão de expressão na próstata normal;
- A diminuição de expressão de TIMP3 associou-se significativamente com altos escores de Gleason;
- O aumento significativo de expressão da proteína NCOA1/SRC-1 foi verificado em CaP e HPB em relação ao Tec Adj.
- NCOA1/SRC-1 foi identificado como um marcador prognóstico independente nos carcinomas de próstata apresentando um risco aumentado de 2,3 vezes para recidiva bioquímica nos casos com aumento de expressão.

SRC

- Não foi observada diferença nos níveis de expressão do transcrito *SRC* entre os tecidos prostáticos analisados, não havendo associação significativa com as variáveis clínicas e histopatológicas;

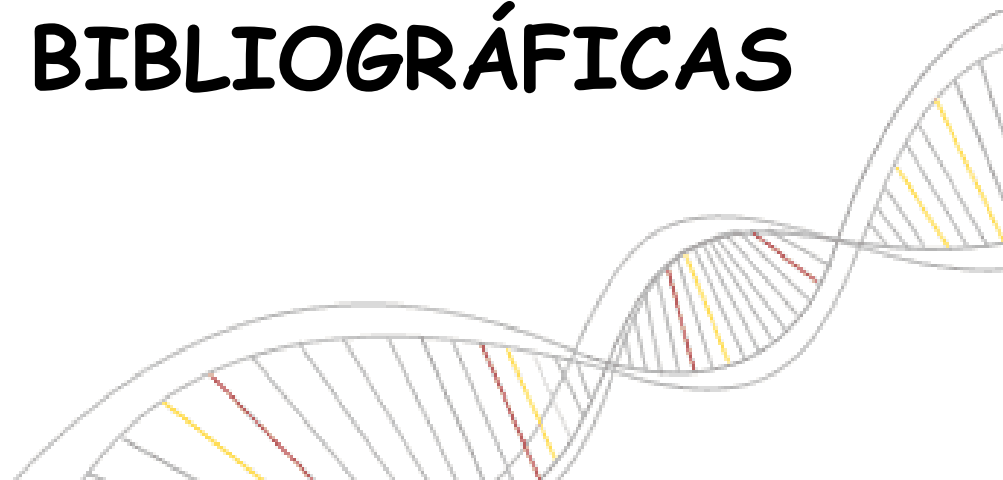
- A proteína SRC mostrou imunomarcacão citoplasmática tanto no ep t lio glandular quanto no estroma em todos os tecidos prostáticos avaliados, incluindo as próstatas normais.
- O aumento de expressão protéica foi detectado nas células epiteliais do tumor, das HPB e do TecAdj em relação a próstata normal, sendo que os tumores apresentaram níveis significativamente mais baixos da proteína em comparação com HPB e com TecAdj;
- O aumento de SRC foi detectado nas células epiteliais nos casos que apresentaram extensão extra-prostática;
- Somente os CaP (48%) apresentaram extensão de imunomarcacão no componente estromal menor que a próstata normal.
- Foi verificada associação significativa entre a diminuição da intensidade de expressão proteica no estroma tumoral com recidiva bioquímica;
- Níveis mais baixos de SRC no componente estromal (extensão de imunomarcacão) foram associados com altos níveis de PSA (>10ng/ml);
- Os dados sugerem que a expressão de SRC no estroma tumoral   tão relevante quanto nas células epiteliais.

DAB2, ICAM1, ATF1, e ETV6: genes ligados ao SRC nas análises de redes biológicas

- Foi detectada diminuição significativa de expressão de DAB2 nos tumores, HPB e TecAdj, sugerindo que este evento ocorre precocemente no desenvolvimento de lesões prostáticas;

- O aumento de expressão da proteína ATF1 foi detectado em todos os tecidos testados, sugerindo que essa alteração deve ocorrer no início do processo proliferativo das doenças prostáticas;
- Foi detectada diminuição da expressão proteica de ETV6 em CaP e em HPB, mas não nos TecAdj, porém a diminuição mais expressiva foi detectada nos tumores;
- A expressão de ICAM1 foi detectada em baixa frequência nos tumores e HPB, não sendo observadas diferenças significativas na comparação com os parâmetros clínicos e histopatológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ablin RJ, Soanes WA, Bronson P, Witebsaky E. Precipitating antigens of the normal human prostate. **J Reprod Fertil** 1970; 22:573-4.

AgoulNIK IU, Vaid A, Bingman WE 3rd, et al. Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. **Cancer Res** 2005; 65:7959-67.

Agrawal S, Dunsmuir WD. Molecular markers in prostate cancer. Part I: predicting lethality. **Asian J Androl** 2009; 11:14-21.

Ahonen M, Poukkula M, Baker AH, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. **Oncogene** 2003; 22:2121-34.

Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Giles GG, et al. Multiple loci on 8q24 associated with prostate cancer susceptibility. **Nat Genet** 2009; 41:1058-60.

Alberti C. Genetic and microenvironmental implications in prostate cancer progression and metastasis. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 2008; 12:167-75.

Alberti C. Hereditary/familial versus sporadic prostate cancer: few indisputable genetic differences and many similar clinicopathological features. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 2010; 14:31-41.

Albihn A, Johnsen JI, Henriksson MA. MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. **Adv Cancer Res** 2010;107:163-224.

Alcaraz A, Takahashi S, Brown JA, et al. Aneuploidy and aneusomy of chromosome 7 detected by fluorescence in situ hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. **Cancer Res** 1994; 54:3998-4002.

Alers JC, Krijtenburg PJ, Vis AN, et al. Molecular cytogenetic analysis of prostatic adenocarcinomas from screening studies: early cancers may contain aggressive genetic features. **Am J Pathol** 2001 158:399–406.

Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. **Nat Genet** 2006; 38:652-8.

Anupam K, Tusharkant C, Gupta SD, Ranju R. Loss of disabled-2 expression is an early event in esophageal squamous tumorigenesis. **World J Gastroenterol** 2006; 12:6041-5.

Anzick SL, Kononen J, Walker RL, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997;277(5328):965-8.

Arason A, Barkardottir RB, Egilsson V. Linkage analysis of chromosome 17q markers and breast-ovarian cancer in Icelandic families, and possible relationship to prostatic cancer. **Am J Hum Genet** 1993; 52:711-7.

Araujo J, Logothetis C. Dasatinib: A potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors. **Cancer Treat Rev** 2010 Mar 10. [Epub ahead of print]

Arps S, Rodewald A, Schmalenberger B, Carl P, Bressel M, Kastendieck H. Cytogenetic survey of 32 cancers of the prostate. **Cancer Genet Cytogenet** 1993; 66:93-9.

Asatiani E, Huang WX, Wang A, et al. Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer. **Cancer Res** 2005; 65:1164-73.

Atlas E, Stramwasser M, Mueller CR. A CREB site in the BRCA1 proximal promoter acts as a constitutive transcriptional element. **Oncogene** 2001; 20:7110-4.

Aus G, Damber JE, Khatami A, Lilja H, Stranne J, Hugosson J. Individualized screening interval for prostate cancer based on prostate-specific antigen level: results of a prospective, randomized, population-based study. **Arch Intern Med** 2005; 165:1857-61.

Bagadi SA, Prasad CP, Srivastava A, Prashad R, Gupta SD, Ralhan R. Frequent loss of Dab2 protein and infrequent promoter hypermethylation in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2007; 104:277-86.

Bai YX, Yi JL, Li JF, Sui H. Clinicopathologic significance of BAG1 and TIMP3 expression in colon carcinoma. **World J Gastroenterol** 2007; 13:3883-5.

Baker AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Newby AC. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. **Br J Cancer** 1999;79:1347-55.

Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Spensberger D, de Knecht Y, Tang M, Lowenberg B, Delwel R. Somatic heterozygous mutations in ETV6 (TEL) and frequent absence of ETV6 protein in acute myeloid leukemia. **Oncogene** 2005; 24:4129-37.

Bethel CR, Faith D, Li X, et al. Decreased NKX3.1 Protein Expression in Focal Prostatic Atrophy, Prostatic Intraepithelial Neoplasia, and Adenocarcinoma: Association with Gleason Score and Chromosome 8p Deletion. **Cancer Res** 2006; 66:10683-90.

Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, et al. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. **Genes Dev** 1999; 13:966-77.

Bieberich CJ, Fujita K, He WW, Jay G. Prostate-specific and androgen-dependent expression of a novel homeobox gene. **J Biol Chem** 1996; 271:31779-82.

Bookstein R, Bova GS, MacGrogan D, Levy A, Isaacs WB. Tumor-suppressor genes in prostatic oncogenesis: a positional approach. **Br J Urol** 2001; 79:28-36.

Borley N, Feneley MR. Prostate cancer: diagnosis and staging. **Asian J Androl** 2009; 11:74-80.

Bouchard C, Dittrich O, Kiermaier A, et al. Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. **Genes Dev** 2001; 15:2042-7.

Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJ, et al. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. **Cancer Res** 1993; 53:3869-73.

Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, et al. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. **Cancer Res** 2000; 60:6111-5.

Brewster SF, Browne S, Brown KW. Somatic allelic loss at the DCC, APC, nm23-H1 and p53 tumor suppressor gene loci in human prostatic carcinoma. **J Urol** 1994; 151:1073-7.

Brock MV, Gou M, Akiyama Y, et al. Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma. **Clin Cancer Res** 2003; 9:2912-9.

Brooks KJ, Coleman EJ, Vitetta ES. The antitumor activity of an anti-CD54 antibody in SCID mice xenografted with human breast, prostate, non-small cell lung, and pancreatic tumor cell lines. **Int J Cancer** 2008; 123:2438-45.

Brothman AR, Peehl DM, Patel AM, et al. Cytogenetic evaluation of 20 cultured primary prostatic tumors. **Cancer Genet Cytogenet** 1991; 55:79-84.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem** 2009; 55:611-22.

Cannell IG, Bushell M. Regulation of Myc by miR-34c: A mechanism to prevent genomic instability? **Cell Cycle** 2010; 9:2726-30.

Carpten J, Nupponen N, Isaacs S, et al. Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. **Nat Genet** 2002; 30:181-4.

Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:3367-71.

Casey T, Bond J, Tighe S. Molecular signatures suggest a major role for stromal cells in development of invasive breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 114:47–62

Chen C, Freeman R, Voigt LF, Fitzpatrick A, Plymate SR, Weiss NS. Prostate cancer risk in relation to selected genetic polymorphisms in insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3, and insulin-like growth factor-I receptor. **Can Epid Biom Prev** 2006; 15:2461-6.

Chen H, Toyooka S, Gazdar AF, Hsieh JT. Epigenetic regulation of a novel tumor suppressor gene (hDAB2IP) in prostate cancer cell lines. **J Biol Chem** 2003; 278:3121-30.

Cheng E, Lee C, Grayhack J. Endocrinology of the prostate. In: Lepor H, Lawson RK, editors. **Prostate disease**. Philadelphia: WB Saunders Company; 1993. p.57-71.

Cher ML, Bova GS, Moore DH, et al. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. **Cancer Res** 1996; 56:3091-102.

Cher ML, Carroll PR. Screening for prostate cancer. **West J Med** 1995; 162:235-42.

Cher ML, Carroll PR. Screening for prostate cancer. **West J Med** 1994; 160:250.

Choi YL, Xuan YH, Shin YK, et al. An immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in gallbladder lesions. **J Histochem Cytochem** 2004; 52:591-601.

Chu KC, Tarone RE, Freeman HP. Trends in prostate cancer mortality among black men and white men in the United States. **Cancer** 2003; 97:1507-16.

Chung LW, Baseman A, Assikis V, Zhau HE. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. **J Urol** 2005; 173:10-20.

Chung CH, Levy S, Chaurand P, Carbone DP. Genomics and proteomics: Emerging technologies in clinical cancer research. **Crit Rev Oncol/Hematol** 2007; 61:1-25

Clement G, Braunschweig R, Pasquier N, Bosman FT, Benhattar J. Methylation of APC, TIMP3, and TERT: a new predictive marker to distinguish Barrett's oesophagus patients at risk for malignant transformation. **J Pathol** 2006; 208:100-7.

Cook DL, Gerber AN, Tapscott SJ. Modeling stochastic gene expression: implications for haploinsufficiency. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95:15641-6.

Cooney KA, Wetzel JC, Consolino CM, Wojno KJ. Identification and characterization of proximal 6q deletions in prostate cancer. **Cancer Res** 1996; 56:4150-3.

Conrad F, Zhu X, Zhang X, Chalkley RJ, Burlingame AL, Marks JD, Liu B. Human antibodies targeting cell surface antigens overexpressed by the hormone refractory metastatic prostate cancer cells: ICAM-1 is a tumor antigen that mediates prostate cancer cell invasion. **J Mol Med** 2009; 87:507-14.

Coppola V, De Maria R, Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. **Endocr Relat Cancer** 2010; 17:F1-17.

Creighton CJ. Multiple oncogenic pathway signatures show coordinate expression patterns in human prostate tumors. **PLoS One** 2008; 3:e1816.

Cross NA, Chandrasekharan S, Jokonya N, et al. The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFbeta1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican. **Prostate** 2004; 63:269-75.

Dai B, Chen H, Guo S, et al. Compensatory Upregulation of Tyrosine Kinase Etk/BMX in Response to Androgen Deprivation Promotes Castration- Resistant Growth of Prostate Cancer Cells. **Cancer Res** 2010; 70(13); 5587–96.

Damber JE, Aus G. Prostate cancer. **Lancet** 2008; 371:1710-21.

De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. **Am J Pathol** 1999; 155:1985-992.

De Visschere P, Oosterlinck W, De Meerleer G, Villeirs G. Clinical and imaging tools in the early diagnosis of prostate cancer, a review. **JBR-BTR** 2010; 93:62-70.

DeMarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. **Lancet** 2003; 361:955-64.

Deutsch E, Maggiorella L, Eschwege P, Bourhis J, Soria JC, Abdulkarim B. Environmental, genetic, and molecular features of prostate cancer. **Lancet Oncol** 2004; 5:303-13.

Dong Y, Asch HL, Ying A, Asch BB. Molecular mechanism of transcriptional repression of gelsolin in human breast cancer cells. **Exp Cell Res** 2002; 276:328-36.

Dutt N, Bates AW, Baithun SI. Secondary neoplasms of the male genital tract with different patterns of involvement in adults and children. **Histopathology** 2000; 37:323-31.

Dymicka-Piekarska V, Kemonia H. Does colorectal cancer clinical advancement affect adhesion molecules (sP-selectin, sE-selectin and ICAM-1) concentration? **Thromb Res** 2009; 124:80-3.

Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. **Nature** 2007; 447:1087-93.

Edwards J. Src kinase inhibitors: an emerging therapeutic treatment option for prostate cancer. **Expert Opin Investig Drugs** 2010; 19:605-14.

Edwards SM, Eeles RA. Unravelling the genetics of prostate cancer. **Am J Med Genet C Semin Med Genet** 2004; 129C:65-73.

Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. **Nat Genet** 2008; 40:316-21.

Elo JP, Harkonen P, Kyllonen AP, Lukkarinen O, Vihko P. Three independently deleted regions at chromosome arm 16q in human prostate cancer: allelic loss at 16q24.1-q24.2 is associated with aggressive behaviour of the disease, recurrent growth, poor differentiation of the tumour and poor prognosis for the patient. **Br J Cancer** 1999; 79:156-60.

Elo JP, Visakorpi T. Molecular genetics of prostate cancer. **Ann Med** 2001; 33:130-41.

Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL; ISUP Grading Committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:1228-42.

Epstein JI. An update of the Gleason grading system. **J Urol** 2010; 183:433-40.

Fan S, Meng Q, Auborn K, Carter T, Rosen EM. BRCA1 and BRCA2 as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer cells. **Br J Cancer** 2006; 94:407-26.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61:759-67.

Finzel AH, Reiningner AJ, Bode PA, Wurzinger LJ. ICAM-1 supports adhesion of human small-cell lung carcinoma to endothelial cells. **Clin Exp Metastasis** 2004; 21:185-9.

Fleming WH, Hamel A, MacDonald R, et al. Expression of the c-myc protooncogene in human prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia. **Cancer Res** 1986; 46:1535-8.

Fu M, Liu M, Sauve AA, et al. Hormonal control of androgen receptor function through SIRT1. **Mol Cell Biol** 2006; 26:8122-35.

Gallucci M, Merola R, Leonardo C, et al. Genetic profile identification in clinically localized prostate carcinoma. **Urol Oncol** 2008; 27: 502-8.

Gallucci M, Merola R, Leonardo C, et al. Genetic profile identification in clinically localized prostate carcinoma. **Urol Oncol** 2009; 27:502-8.

Gambarini-Paiva G. **Genes candiadtos a marcadores tumorais na progressão do adenocarcinoma de próstata identificados por análise de HR_CGH e CGH-array.** Botucatu; 2009. [Tese de Doutorado-UNESP-Departamento de Genética-Instituto de Biociências].

Gardner L, Lee L, Dang C. **The c-Myc Oncogenic Transcription Factor** (Adapted from myc oncogene, Encyclopedia of Cancer) This extract is used with the permission of Academic Press and is taken from The Encyclopedia of Cancer, Second Edition, July 2002.

Ghoussaini M, Song H, Koessler T, et al. Postate Cancer Study Collaborators/British Association of Urological Surgeons' Section of Oncology; UK ProtecT Study Collaborators. Multiple loci with different cancer specificities within the 8q24 gene desert. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100:962-6.

Gleason, DF. Histologic grading of prostate cancer: a prespective. **Human Patol** 1992; 23:273-9.

Gonzalgo ML, Isaacs WB. Molecular pathways to prostate cancer. **J Urol** 2003; 170:2444-52.

Gorlov IP, Gallick GE, Gorlova OY, Amos C, Logothetis CJ. GWAS meets microarray: are the results of genome-wide association studies and gene-expression profiling consistent? Prostate cancer as an example. **PLoS One** 2009; 4:e6511.

Gregory CW, He B, Johnson RT, et al. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. **Cancer Res** 2001; 61, 4315-9.

Gu P, Xing X, Tanzer M, et al. Frequent loss of TIMP-3 expression in progression of esophageal and gastric adenocarcinomas. **Neoplasia** 2008; 10:563-72.

Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, et al. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. **Oncogene** 2000; 19:1288-96.

Gudmundsson J, Sulem P, Manolescu A, et al. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. **Nat Genet** 2007; 39:631-7.

Gurel B, Iwata T, Koh CM, et al. Molecular Alterations in Prostate Cancer as Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Targets. **Adv Anat Pathol** 2008; 15:319-31.

Gurel B, Iwata T, Koh CM, et al. Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. **Mod Pathol** 2008; 21:1156-67.

Gurel B, Ali TZ, Montgomery EA, et al. NKX3.1 as a Marker of Prostatic Origin in Metastatic Tumors. **Am J Surg Pathol** 2010; 34:1097-105.

Haapala K, Rokman A, Palmberg C, et al. Chromosomal changes in locally recurrent, hormone-refractory prostate carcinomas by karyotyping and comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet** 2001; 131:74-8.

Hai T, Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88:3720-4.

Haiman CA, Le Marchand L, Yamamoto J, et al. A common genetic risk factor for colorectal and prostate cancer. **Nat Genet** 2007; 39:954-6.

Hallikas O, Palin K, Sinjushina N, et al. Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. **Cell** 2006; 124:47-59.

Han M, Gann PH, Catalona WJ. Prostate-specific antigen and screening for prostate cancer. **Med Clin North Am** 2004; 88:245-65.

Hayes SH, Seigel GM. Immunoreactivity of ICAM-1 in human tumors, metastases and normal tissues. **Int J Clin Exp Pathol** 2009; 2:553-60.

He WW, Sciavolino PJ, Wing J, et al. A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. **Genomics** 1997; 43:69-77.

He XY, Chen JX, Zhang Z, Li CL, Peng QL, Peng HM. The let-7a microRNA protects from growth of lung carcinoma by suppression of k-Ras and c-Myc in nude mice. **J Cancer Res Clin Oncol** 2010; 136:1023-8.

Helleman J, Jansen MP, Ruigrok-Ritstier K, et al. Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. **Clin Cancer Res** 2008; 14:5555-64.

Hemmerlein B, Scherbening J, Kugler A, Radzun HJ. Expression of VCAM-1, ICAM-1, E- and P-selectin and tumour-associated macrophages in renal cell carcinoma. **Histopathology** 2000; 37:78-83.

Herlyn M, Malkowicz SB. Regulatory pathways in tumor growth and invasion. **Lab Invest** 1991; 65:262-71.

Hill R, Song Y, Cardiff RD, Van Dyke T. Heterogeneous tumor evolution initiated by loss of pRb function in a preclinical prostate cancer model. **Cancer Res** 2005; 65:10243-54.

Hoque MO, Topaloglu O, Begum S, et al. Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects. **J Clin Oncol** 2005; 23:6569-75.

Hornstein M, Hoffmann MJ, Alexa A, et al. Protein phosphatase and TRAIL receptor genes as new candidate tumor genes on chromosome 8p in prostate cancer. **Cancer Genomics Proteomics** 2008; 5:123-36.

Hsueh YP, Lai MZ. Overexpression of activation transcriptional factor 1 in lymphomas and in activated lymphocytes. **J Immunol** 1995; 54:5675-83.

Huang Y, Friess H, Kleeff J, et al. Doc-2/hDab2 expression is up-regulated in primary pancreatic cancer but reduced in metastasis. **Lab Invest** 2001; 81:863-73.

Huang W, Chan S, Yang T, Tzeng C, Chen C. Inhibition of ICAM-1 gene expression, monocyte adhesion and cancer cell invasion by targeting IKK complex: molecular and functional study of novel α -methylene- γ -butyrolactone derivatives. **Carcinogenesis** 2004; 25(10):1925-1934.

Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. **Cancer Cell** 2008; 3:58-68.

Isaacs W, Kainu T. Oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cancer. **Epidemiol Rev** 2001; 23:36-41.

Ishiguro H, Tsunoda T, Tanaka T, Fujii Y, Nakamura Y, Furukawa Y. Identification of AXUD1, a novel human gene induced by AXIN1 and its reduced expression in human carcinomas of the lung, liver, colon and kidney. **Oncogene** 2001; 20:5062-6.

Ishkanian AS, Mallof CA, Ho J, et al. High-resolution array CGH identifies novel regions of genomic alteration in intermediate-risk prostate cancer. **Prostate** 2009; 69:1091-100.

Ito H, Kamoi K, Yokoyama K, Yamada K, Nishimura T. Visualization of prostate cancer using dynamic contrast-enhanced MRI: comparison with transrectal power Doppler ultrasound. **Br J Radiol** 2003; 76:617-24.

Ittmann M. Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. **Cancer Res** 1996; 56:2143-7.

Iwasaki K, Hailemariam K, Tsuji Y. PIAS3 interacts with ATF1 and regulates the human ferritin H gene through an antioxidant-responsive element. **J Biol Chem** 2007; 282:22335-43.

Iwata T, Schultz D, Hicks J, et al. MYC overexpression induces prostatic intraepithelial neoplasia and loss of Nkx3.1 in mouse luminal epithelial cells. **PLoS One** 2010; 5:e9427.

Jarrard DF, Sarkar S, Shi Y, et al. p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells. **Cancer Res** 1999; 59:2957-64.

Jean D, Tellez C, Huang S, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis of human melanoma by intracellular anti-ATF-1 single chain Fv fragment. **Oncogene** 2000; 19:2721-30.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2008; 58:71-96.

Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Res** 1997; 57:524-31.

Jin W, Yun C, Hobbie A, Martin M, Sorensen P, Kim S. Cellular Transformation and Activation of the Phosphoinositide-3- Kinase–Akt Cascade by the ETV6-NTRK3 Chimeric Tyrosine Kinase Requires c-Src. **Cancer Res** 2007; 67: (7).

Jorgenson E, Deitcher SR, Cicek M, et al. Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) polymorphism 4G/5G is associated with prostate cancer among men with a positive family history. **Prostate** 2007; 67:172-7.

Ju JH, Maeng JS, Lee DY, Piszczek G, Gelmann EP, Gruschus JM. Interactions of the acidic domain and SRF interacting motifs with the NKX3.1 homeodomain. **Biochemistry** 2009; 48:10601-7.

Ju JH, Maeng JS, Zemedkun M, et al. Physical and functional interactions between the prostate suppressor homeoprotein NKX3.1 and serum response factor. **J Mol Biol** 2006; 360:989-99.

Kantoff PW, Beer TM, D'Amico A, et al. Innovations and Challenges in Prostate Cancer: Summary Statement for the 6th Cambridge Conference. **J Urol** 2007;178, S5-8.

Kasahara K, Taguchi T, Yamasaki I, Kamada M, Yuri K, Shuin T. Detection of genetic alterations in advanced prostate cancer by comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet** 2002; 137:59-63.

Kibel AS, Faith DA, Bova GS, Isaacs WB. Mutational analysis of ETV6 in prostate carcinoma. **Prostate** 2002; 52:305-10.

Kim HJ, Kim KR, Park HS, et al. The expression and role of serum response factor in papillary carcinoma of the thyroid. **Int J Oncol** 2009; 35:49-55.

Kong Z, Xie D, Boike T, et al. Downregulation of human DAB2IP gene expression in prostate cancer cells results in resistance to ionizing radiation. **Cancer Res** 2010; 70:2829-39.

König JJ, Teubel W, Romijn JC, Schroder FH, Hagemeyer A. Gain and loss of chromosomes 1, 7, 8, 10, 18, and Y in 46 prostate cancers. **Hum Pathol** 1996; 27:720-7.

Korkmaz CG, Korkmaz KS, Manola J, et al. Analysis of androgen regulated homeobox gene NKX3.1 during prostate carcinogenesis. **J Urol** 2004; 172:1134-9.

Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. **Nature Rev Cancer** 2008; 8:497-511.

Kwabi-Addo B, Wang S, Chung W, et al. Identification of differentially methylated genes in normal prostate tissues from African American and Caucasian men. **Clin Cancer Res** 2010; 16:3539-47.

Laé M, Freneaux P, Sastre-Garau X, Chouchane O, Sigal-Zafrani B, Vincent-Salomon A. Secretory breast carcinomas with ETV6-NTRK3 fusion gene belong to the basal-like carcinoma spectrum. **Mod Pathol** 2009; 22:291-8.

Langston AA, Stanford JL, Wicklund KG, Thompson JD, Blazej RG, Ostrander EA. Germ-line BRCA1 mutations in selected men with prostate cancer. **Am J Hum Genet** 1996; 58:881-5.

Lapointe J, Li C, Giacomini CP, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. **Cancer Res** 2007; 67:8504-10.

Lapointe J, Li C, Higgins JP, et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101:811-6.

Lavenu A, Pournin S, Babinet C, Morello D. The cis-acting elements known to regulate c-myc expression ex vivo are not sufficient for correct transcription in vivo. **Oncogene** 1994; 9:527-36.

Lei Q, Jiao J, Xin L, et al. NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss. **Cancer Cell** 2006; 9:367-78.

Li C, Larsson C, Futreal A, et al. Identification of two distinct deleted regions on chromosome 13 in prostate cancer. **Oncogene** 1998; 16:481-7.

Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science** 1997; 275:1943-7.

Li R, Wheeler T, Dai H, Frolov A, Thompson T, Ayala G. High level of androgen receptor is associated with aggressive clinicopathologic features and decreased biochemical recurrence-free survival in prostate: cancer patients treated with radical prostatectomy. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:928-34

Liang S, Slattery MJ, Wagner D, Simon SI, Dong C. Hydrodynamic shear rate regulates melanoma-leukocyte aggregation, melanoma adhesion to the endothelium, and subsequent extravasation. **Ann Biomed Eng** 2008; 36:661-71.

Lin YC, Shun CT, Wu MS, Chen CC. A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-kappaB. **Clin Cancer Res** 2006; 12:7165-73.

List HJ, Reiter R, Singh B, Wellstein A, Riegel AT. Expression of the nuclear coactivator AIB1 in normal and malignant breast tissue. **Breast Cancer Res Treat** 2001; 68:21-8.

Liu W, Xie CC, Zhu Y, et al. Homozygous deletions and recurrent amplifications implicate new genes involved in prostate cancer. **Neoplasia** 2008; 10:897-907.

Lundgren R, Heim S, Mandahl N, Anderson H, Mitelman F. Chromosome abnormalities are associated with unfavorable outcome in prostatic cancer patients. **J Urol** 1992; 147:784-8.

Luo JH, Yu YP. Genetic factors underlying prostate cancer. **Expert Rev Mol Med** 2003; 5:1-26.

Machkova NA. Regulatory activity of lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. **Probl Tuberk** 1991; 5:57-9.

Mackinnon AC, Yan BC, Joseph LJ, Al-Ahmadie HA. Molecular biology underlying the clinical heterogeneity of prostate cancer: an update. **Arch Pathol Lab Med** 2009; 133:1033-40.

Macoska JA, Trybus TM, Benson PD, et al. Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. **Cancer Res** 1995; 55:5390-5.

Macoska JA, Trybus TM, Sakr WA, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of 8p allelic loss and chromosome 8 instability in human prostate cancer. **Cancer Res** 1994; 54:3824-30.

Macri E, Loda M. Role of p27 in prostate carcinogenesis. **Cancer Metastasis Rev** 1998-1999; 17:337-44.

Madhavan M, Srinivas P, Abraham E, Ahmed I, Vijayalekshmi NR, Balaram P. Down regulation of endothelial adhesion molecules in node positive breast cancer: possible failure of host defence mechanism. **Pathol Oncol Res** 2002; 8:125-8.

Makridakis C, Akalu A, Reichardt JKV. Identification and characterization of somatic steroid 5 α -reductase (SRD5A2) mutations in human prostate cancer tissue. **Oncogene** 2004; 23:7399-405.

Mashkova TD, Oparina NI, Zinov'eva OL, et al. Transcription TIMP3, DAPk1 and AKR1B10 genes in squamous cell lung cancer. **Mol Biol** 2006;40(6):1047–1054.

Matsuura H, Shiraishi T, Yatani R, Kawamura J. Interphase cytogenetics of prostate cancer: fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of Japanese cases. **Br J Cancer** 1996; 74:1699-704.

Mayer EL, Krop IE. Advances in Targeting Src in the Treatment of Breast Cancer and Other Solid Malignancies. **Clin Cancer Res** 2010;16(14).

Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:599-609.

Mc Donnell TJ, Charis NS, Cho-Vega JH, et al. Biomarker expression patterns that correlate with high grade features in treatment naïve, organ-confined prostate cancer. **BMC Med.Genomics** 2008; 1:1

McDonnell TJ, Navone NM, Troncoso P, et al. Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer. **J Urol** 1997; 157:569-74.

Melamed J, Einhorn JM, Ittmann MM. Allelic loss on chromosome 13q in human prostate carcinoma. **Clin Cancer Res** 1997; 3:1867-72.

Meng MV, Dahiya R. Molecular genetics. In: Carroll PR, Grossfeld GD, editors. **Prostate cancer**. Hamilton-Ontario: BC Decker; 2002. p.42-59.

Mettlin CJ, Murphy GP, Ho R, Menck HR. The National Cancer Data Base report on longitudinal observations on prostate cancer. **Cancer** 1996; 77:2162-6.

Micale MA, Mohamed A, Sakr W, Powell IJ, Wolman SR. Cytogenetics of primary prostatic adenocarcinoma. Clonality and chromosome instability. **Cancer Genet Cytogenet** 1992; 61:165-73.

Michaelson MD, Cotter SE, Gargollo PC, Zietman AL, Dahl DM, Smith MR. Management of complications of prostate cancer treatment. **CA Cancer J Clin** 2008; 58:196-213.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de próstata**. Disponível em: <URL:http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=339> [2010 jun 20].

Mochtar CA, Kiemeny LA, van Riemsdijk MM, et al. Prostate-specific antigen as an estimator of prostate volume in the management of patients with symptomatic benign prostatic hyperplasia. **Eur Urol** 2003; 44:695-700.

Mok SC, Chan WY, Wong KK, et al. DOC-2, a candidate tumor suppressor gene in human epithelial ovarian cancer. **Oncogene** 1998; 16:2381-7.

Mok SC, Wong KK, Chan RK, et al. Molecular cloning of differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 1994; 52:247-52

Mori R, Wang Q, Quek ML, et al. Prognostic value of the androgen receptor and its coactivators in patients with D1 prostate cancer. **Anticancer Res** 2008; 28:425-30.

Nardi AC, Moreira Filho DC, Nardozza A, Rios LAS, Zequi SC. **Perfil do Câncer de Próstata no Estado de São Paulo- Detectado pela Sociedade Brasileira de Urologia- Secção São Paulo**. São Paulo: Lado a Lado Comunicação; 2005.

Nagy B, Szendroi A, Romics I. Overexpression of CD24, c-myc and Phospholipase 2A in Prostate Cancer Tissue Samples Obtained by Needle Biopsy. **Pathol Oncol Res** 2008; 15:279-83.

Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. **N Engl J Med** 2003; 349:366-81.

Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. **Oncogene** 1999; 18:3004-16.

Nishio Y, Yamada Y, Kokubo H, et al. Prognostic significance of immunohistochemical expression of the HER-2/neu oncoprotein in bone metastatic prostate cancer. **Urology** 2006; 68:110-5.

Oesterling JE. Age-specific reference ranges for serum prostate-specific antigen. **Can J Urol** 1995; 2:23-9.

Onate, SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. **Science** 1995; 270:1354-7.

Park J, Kim M, Lim J, et al. Three-way complex translocations in infant acute myeloid leukemia with t(7;12)(q36;p13): the incidence and correlation of a HLXB9 overexpression. **Cancer Genet Cytogenet** 2009; 191:102-5.

Patel AR, Klein EA. Risk factors for prostate cancer. **Nat Clin Pract** 2009; 6:87-95.

Patel SR, Richardson RL, Kvols L. Metastatic cancer to the testes: a report of 20 cases and review of the literature. **J Urol** 1989; 142:1003-5.

Persson H, Leder P. Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human c-myc oncogene. **Science** 1984; 225:718-21.

Planas-Silva MD, Shang Y, Donaher JL, Brown M, Weinberg RA. AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. **Cancer Res** 2001; 61:3858-62.

Possner M, Heuser M, Kaulfuss S, et al. Functional analysis of NKX3.1 in LNCaP prostate cancer cells by RNA interference. **Int J Oncol** 2008; 32:877-84.

Prowatke I, Devens F, Benner A, et al. Expression analysis of imbalanced genes in prostate carcinoma using tissue microarrays. **Br J Cancer** 2007; 96:82-8

Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, et al. Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Res** 1995; 55:5408-14.

Quon KC, Berns A. Haplo-insufficiency? Let me count the ways. **Genes Dev** 2001; 15:2917-21.

Redmond, A. M. et al. Coassociation of estrogen receptor and p160 proteins predicts resistance to endocrine treatment; SRC-1 is an independent predictor of breast cancer recurrence. **Clin. Cancer Res** 2009; 15:2098–2106.

Reis-Filho JS, Natrajan R, Vatcheva R, et al. Is acinic cell carcinoma a variant of secretory carcinoma? A FISH study using ETV6'split apart' probes. **Histopathology** 2008; 52:840-6.

Reiter RE, Sato I, Thomas G, et al. Coamplification of prostate stem cell antigen (PSCA) and MYC in locally advanced prostate cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2000; 27:95-103.

Rennert H, Zeigler-Johnson C, Mittal RD, et al. Analysis of the RNASEL/HPC1 and Macrophage Scavenger Receptor 1 in asian-indian advanced prostate cancer. **Urology** 2008; 72:456-60.

Revelos K, Petraki C, Gregorakis A, Scorilas A, Papanastasiou P, Koutsilieris M. Immunohistochemical expression of Bcl2 is an independent predictor of time-to-biochemical failure in patients with clinically localized prostate cancer following radical prostatectomy. **Anticancer Res** 2005; 25:3123-33.

Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ, et al. Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. **Br J Cancer** 2005; 92:2171-80.

Rosette C, Roth RB, Oeth P, et al. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. **Carcinogenesis** 2005; 26(5):943-950.

Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, et al. Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. **Cancer Res** 1998; 58:4497-504.

Royuela M, de Miguel MP, Ruiz A, et al. Interferon-g and its functional receptors overexpression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma: parallelism with c-myc and p53 expression. **Eur Cytok Network** 2000; 11:119-27.

Ruggero D. The role of Myc-induced protein synthesis in cancer. **Cancer Res** 2009; 69:8839-43.

Saad F, Lipton A. SRC kinase inhibition: targeting bone metastases and tumor growth in prostate and breast cancer. **Cancer Treat Rev** 2010; 36:177-84.

Sachdeva M, Mo Y. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis. **Am J Transl Res** 2010; 2:170-180.

Salinas CA, Kwon E, Carlson CS, et al. Multiple independent genetic variants in the 8q24 region are associated with prostate cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:1203-13.

Sampson VB, Rong NH, Han J, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. **Cancer Res** 2007; 67:9762-70.

Santos RM. **Assinatura genética em adenocarcinomas de próstata e suas metástases**. Botucatu; 2008 [Tese de doutorado; Departamento de genética, instituto de biociências – UNESP].

Sato K, Qian J, Slezak JM, et al. Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1574-80.

Savinainen KJ, Linja MJ, Saramaki OR, et al. Expression and copy number analysis of TRPS1, EIF3S3 and MYC genes in breast and prostate cancer. **Br J Cancer** 2004; 90:1041-6.

Schulmann K, Sterian A, Berki A, et al. Inactivation of p16, RUNX3, and HPP1 occurs early in Barrett's-associated neoplastic progression and predicts progression risk. **Oncogene** 2005; 24:4138-48.

Schumacher FR, Feigelson HS, Cox DG, et al. A common 8q24 variant in prostate and breast cancer from a large nested case-control study. **Cancer Res** 2007; 67:2951-6.

Seidman JD. Osteopontin as a biomarker for ovarian cancer. **Jama** 2002; 287:3209; author reply -10.

Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. ISCN. **An international system for human cytogenetic nomenclature**. 2009. Basel: S. Karger; 2009.

Shapira M, Ben-Izhak O, Slotky M, Goldin O, Lahav-Baratz S, Hershko DD. Expression of the ubiquitin ligase subunit cyclin kinase subunit 1 and its relationship to S-phase kinase protein 2 and p27Kip1 in prostate cancer. **J Urol** 2006; 176:2285-9.

Shen MM, Wang X, Economides KD, Walker D, Abate-Shen C. Progenitor Cells for the Prostate Epithelium: Roles in Development, Regeneration, and Cancer. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 2009; 73:529-38.

Smith E, De Young NJ, Tian Z, et al. Methylation of TIMP3 in esophageal squamous cell carcinoma. **World J Gastroenterol** 2008; 14:203-10.

Smith JR, Freije D, Carpten JD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. **Science** 1996; 274:1371-4.

Somers GR, Viero S, Nathan PC, Teshima I, Pereira C, Zielenska M. Association of the t(12;22)(q13;q12) EWS/ATF1 rearrangement with polyphenotypic round cell sarcoma of bone: a case report. **Am J Surg Pathol** 2006; 30:10579.

Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. **Cancer Res** 1996; 56:218-22.

Song H, Zhang B, Watson MA, Humphrey PA, Lim H, Milbrandt J. Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. **Oncogene** 2009; 28:3307-19.

Song B, Wang C, Liu J, et al. MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression. **J Exp Clin Cancer Res** 2010;29:29

Sotelo J, Esposito D, Duhagon MA, et al. Long-range enhancers on 8q24 regulate c-Myc. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 107:3001-5.

Steele R, Mott JL, Ray RB. MBP-1 Upregulates miR-29b, Which Represses Mcl-1, Collagens, and Matrix Metalloproteinase-2 in Prostate Cancer Cells. **Genes Cancer** 2010; 1:381-8.

Steiner T, Junker K, Burkhardt F, Braunsdorf A, Janitzky V, Schubert J. Gain in chromosome 8q correlates with early progression in hormonal treated prostate cancer. **Eur Urol** 2002; 41:167-71.

Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. **Cancer Res** 1991; 51:222-6.

Skotheim RI, OS Thomassen G, Eken M, et al. A universal assay for detection of oncogenic fusion transcripts by oligo microarray analysis. **Molecular Cancer** 2009, 8(5):10.1186/1476-4598-8-5

Suarez BK, Gerhard DS, Lin J, et al. Polymorphisms in the prostate cancer susceptibility gene HPC2/ELAC2 in multiplex families and healthy controls. **Cancer Res** 2001; 61:4982-4.

Sun Y, Eichelbaum EJ, Wang H, Vesely DL. Atrial natriuretic peptide and long acting natriuretic peptide inhibit MEK 1/2 activation in human prostate cancer cells. **Anticancer Res** 2007; 27:3813-8.

Takahashi S, Qian J, Brown JA, et al. Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by fluorescence in situ hybridization in needle biopsies. **Cancer Res** 1994; 54:3574-9.

Tanas MR, Rubin BP, Montgomery EA, et al. Utility of FISH in the diagnosis of angiomatoid fibrous histiocytoma: a series of 18 cases. **Mod Pathol** 2010; 23:93-7.

Tang RH, Zheng XL, Callis TE, et al. Myocardin inhibits cellular proliferation by inhibiting NF-kappaB(p65)-dependent cell cycle progression. **Proc Natl Acad Sci USA** 2008; 105:3362-7.

Tavtigian SV, Simard J, Teng DH, et al. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. **Nat Genet** 2001; 27:172-80.

Tempia-Caliera AA, Horvath LZ, Zimmermann A, et al. Adhesion molecules in human pancreatic cancer. **J Surg Oncol** 2002; 79:93-100.

Tien JC, Zhou S, Xu J. The role of SRC-1 in murine prostate carcinogenesis is nonessential due to a possible compensation of SRC-3/AIB1 overexpression. **Int J Biol Sci** 2009; 5:256-64.

Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, et al. Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. **Cancer Cell** 2002; 2:367-76.

Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. **Science** 2005; 310:644-8.

Tong J, Ng D, Chau S, So K, Leung P, Lee T, Lung R, Chan M, Chan A, Lo K, To K. Putative tumour-suppressor gene *DAB2* is frequently down regulated by promoterhypermethylation in nasopharyngeal carcinoma **BMC Cancer** 2010, **10**:253

Trybus TM, Burgess AC, Wojno KJ, Glover TW, Macoska JA. Distinct areas of allelic loss on chromosomal regions 10p and 10q in human prostate cancer. **Cancer Res** 1996; 56:2263-7.

Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. **Annu Rev Med** 1999; 50:401-23.

van der Stoep N, Quinten E, van den Elsen PJ. Transcriptional regulation of the MHC class II trans-activator (CIITA) promoter III: identification of a novel regulatory region in the 5'-untranslated region and an important role for cAMP-responsive element binding protein 1 and activating transcription factor-1 in CIITA-promoter III transcriptional activation in B lymphocytes. **J Immunol** 2002; 169:5061-71.

van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature** 2002; 415:530-6.

Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvanen AC, et al. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. **Cancer Res** 1995; 55:342-7.

Visakorpi T. The molecular genetics of prostate cancer. **Urology** 2003; 62:3-10.

Vocke CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, et al. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. **Cancer Res** 1996;56: 2411-6.

Voeller HJ, Augustus M, Madike V, Bova GS, Carter KC, Gelmann EP. Coding region of NKX3.1, a prostate-specific homeobox gene on 8p21, is not mutated in human prostate cancers. **Cancer Res** 1997; 57:4455-9.

Vogel W, Maier C, Paiss T. Prostate cancer and the problem of genotype phenotype correlation. **Cytogenet Cell Genet** 2001; 93:162-7.

Wachtel M, Dettling M, Koscielniak E, et al. Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. **Cancer Res** 2004; 64:5539-45.

Wang L, McDonnell SK, Elkins DA, et al. Role of HPC2/ELAC2 in hereditary prostate cancer. **Cancer Res** 2001; 61:6494-9.

Wang S, Coleman EJ, Pop LM, Brooks KJ, Vitetta ES, Niederkorn JY. Effect of an anti-CD54 (ICAM-1) monoclonal antibody (UV3) on the growth of human uveal melanoma cells transplanted heterotopically and orthotopically in SCID mice. **Int J Cancer** 2006; 118:932-41.

Wang WL, Mayordomo E, Zhang W, et al. Detection and characterization of EWSR1/ATF1 and EWSR1/CREB1 chimeric transcripts in clear cell sarcoma (melanoma of soft parts). **Mod Pathol** 2009; 22:1201-9.

Wang Z, Tseng CP, Pong RC, et al. The mechanism of growth-inhibitory effect of DOC-2/DAB2 in prostate cancer. Characterization of a novel GTPase-activating protein associated with N-terminal domain of DOC-2/DAB2. **J Biol Chem** 2002; 277:12622-31.

Webb HD, Hawkins AL, Griffin CA. Cytogenetic abnormalities are frequent in uncultured prostate cancer cells. **Cancer Genet Cytogenet** 1996; 88:126-32.

Wierstra I, Alves J. The c-myc promoter: still MysterY and challenge. **Adv Cancer Res** 2008; 99:113-333.

Witte JS. Prostate cancer genomics: towards a new understanding. **Nat Rev Genet** 2009; 10:77-82.

Wolter H, Trijic D, Gottfried HW, Mattfeldt T. Chromosomal changes in incidental prostatic carcinomas detected by comparative genomic hybridization. **Eur Urol** 2002; 41:328-34.

Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. **Cancer** 1997; 80:1529-37.

Xu J, Wu R, O'Malley B. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:615-30.

Xu J. Combined analysis of hereditary prostate cancer linkage to 1q24-25: results from 772 hereditary prostate cancer families from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics. **Am J Hum Genet** 2000; 66:945-57.

Yang G, Timme TL, Frolov A, et al. Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression. **Cancer** 2005; 103:1186-94.

Yang SF, Chen MK, Hsieh YS, et al. PGE2/EP1 signaling pathway enhances ICAM-1 expression and cell motility in oral cancer cells. **J Biol Chem** 2010.

Yemelyanov A, Czwarnog J, Chebotaev D, et al. Tumor suppressor activity of glucocorticoid receptor in the prostate. **Oncogene** 2007; 26:1885-96.

Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. **Nat Genet** 2007; 39:989-94.

Zenklusen JC, Thompson JC, Troncoso P, Kagan J, Conti CJ. Loss of heterozygosity in human primary prostate carcinomas: a possible tumor suppressor gene at 7q31.1. **Cancer Res** 1994; 54:6370-3.

Zhang H, Muders MH, Li J, Rinaldo F, Tindall DJ, Datta K. Loss of NKX3.1 favors vascular endothelial growth factor-C expression in prostate cancer. **Cancer Res** 2008; 68:8770-8.

Zhang P, Liu W, Zhang J, et al. Gene expression profiles in the PC-3 human prostate cancer cells induced by NKX3.1. **Mol Biol Rep** 2010; 37:1505-12.

Zhang S, Zhang HS, Reuter VE, Slovin SF, Scher HI, Livingston PO. Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers. **Clin Cancer Res** 1998; 4:295-302.

Zhao H, Kim Y, Wang P, et al. Genome-wide characterization of gene expression variations and DNA copy number changes in prostate cancer cell lines. **Prostate** 2005; 63:187-97.

Zheng L, Wang F, Qian C, et al. Unique substitution of CHEK2 and TP53 mutations implicated in primary prostate tumors and cancer cell lines. **Hum Mutat** 2006; 27:1062-3.

Zheng SL, Ju JH, Chang BL, et al. Germ-line mutation of NKX3.1 cosegregates with hereditary prostate cancer and alters the homeodomain structure and function. **Cancer Res** 2006; 66:69-77.

Zheng SL, Sun J, Cheng Y, et al. Association between two unlinked loci at 8q24 and prostate cancer risk among European Americans. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:1525-33.

Zheng SL, Sun J, Wiklund F, et al. Genetic variants and family history predict prostate cancer similar to prostate-specific antigen. **Clin Cancer Res** 2009; 15:1105-11.

Zhou H, Yan J, Luo W, et al. SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. **Cancer Res** 2005; 65:7976-83.

Zhou J, Scholes J, Hsieh J. Characterization of a Novel Negative Regulator (DOC-2/DAB2) of c-Src in Normal Prostatic Epithelium and Cancer. **J Biol Chem** 2003; 278:6936-41.

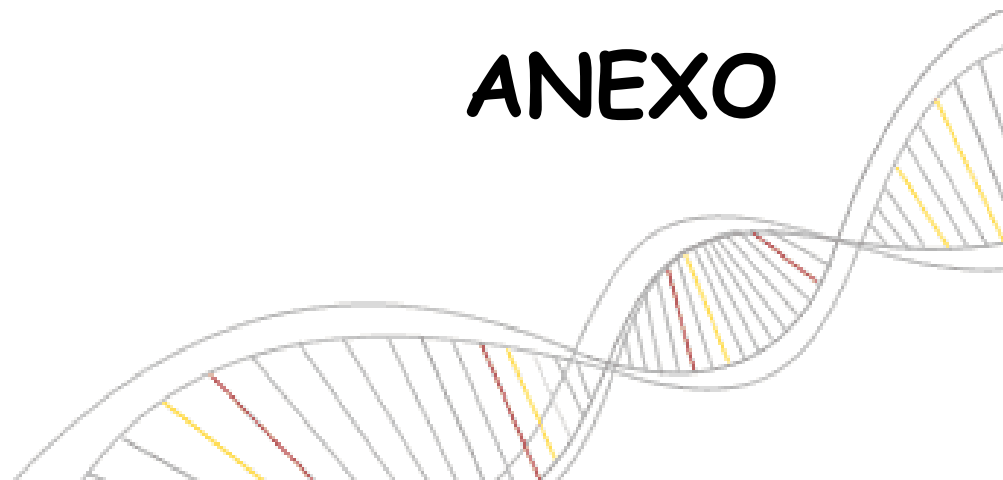
Zhou J, Fan J, Hsieh JT. Inhibition of mitogen-elicited signal transduction and growth in prostate cancer with a small peptide derived from the functional domain of DOC-2/DAB2 delivered by a unique vehicle. **Cancer Res** 2006; 66:8954-8.

Zhou Q, Liu LZ, Fu B, et al. Reactive oxygen species regulate insulin-induced VEGF and HIF-1 α expression through the activation of p70S6K1 in human prostate cancer cells. **Carcinogenesis** 2007; 28:28-37.

Zhou J, Hernandez G, Tu SW, Huang CL, Tseng CP, Hsieh JT. The role of DOC-2/DAB2 in modulating androgen receptor-mediated cell growth via the nongenomic c-Src-mediated pathway in normal prostatic epithelium and cancer. **Cancer Res** 2005; 65:9906-13.

Zitzelsberger H, Szucs S, Robens E, Weier HU, Hofler H, Bauchinger M. Combined cytogenetic and molecular genetic analyses of fifty-nine untreated human prostate carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet** 1996; 90:37-44.

ANEXO



Anexo 1 - Tabela das características clínicas e histopatológicas dos pacientes com carcinomas de próstata (CaP) e tecido adjacente (Tec Adj) não neoplásico.

Caso	Tecido	QR MYC	QR NKX3.1	QR SRF	QR SRC	Idade	Hist. Famil.	PSA pré	Escore Gleason	TNM	Estadio	Risco de rec	Inv Angio	Ext. extraprost.	Margem	Inv vesic.	PSA pós	Rec. Bioq.	Seguimento (meses)
31F1 1	CaP	0,43	0,22	0,56	0,15	61	-	16,96	8(5+3)	pT2c	II	mod	+	-	-	-	0,12	0	20,8
88F1	CaP	5,62	0,68	0,45	1,21	65	+	5,82	7(4+3)	pT3a	III	mod	+	+	-	-	0,37	1	45,9
205F2a	CaP	4,48	0,50	0,93	0,72	67	-	5,96	7(3+4)	pT2c	III	mod	-	-	-	-	0,02	0	13,1
217F4	CaP	2,31	0,94	1,26	1,07	62	+	6,95	6(3+3)	pT3a	III	mod	-	+	-	-	0	0	12,1
218F2	CaP	5,41	0,97	1,64	2,75	74	-	4,84	6(3+3)	pT2c	II	baixo	-	-	+	-	s.i.	0	
162F1	CaP	7,96	1,46	0,81	3,01	58	+	4,00	7(3+4)	pT3a	III	alto	-	+	-	-	0,06	0	34,4
168F2	CaP	0,65	0,50	1,15	5,56	70	+	4,45	8(5+3)	pT3a	III	alto	-	-	-	-	0	0	33,2
170F1	CaP	4,33	0,76	0,66	2,43	70	-	4,98	8(5+3)	pT2c	II	mod	-	-	-	-	0,1	0	6,1
174F1	CaP	6,49	0,45	0,84	1,31	60	-	8,09	6(3+3)	pT2c	II	baixo	-	-	-	-	0	0	22,9
182F1	CaP	5,66	0,27	0,15	0,23	65	-	5,38	6(3+3)	pT2c	II	baixo	-	-	-	-	0	0	48,4
184F1	CaP	2,58	0,83	0,65	2,03	64	+	7,39	8(5+3)	pT3a	III	alto	-	+	+	-	1,18	1	28,5
186F1	CaP	1,33	0,38	0,23	1,08	53	-	11,36	8(3+5)	pT3a	III	alto	-	+	+	-	0	0	29,5
188F1	CaP	5,91	0,99	0,37	1,72	65	+	7,22	7(3+4)	pT2c	II	mod	-	-	-	+	0,63	1	36,7
189F1	CaP	1,89	0,63	1,66	3,65	70	-	6,87	7(3+4)	pT3a	III	mod	-	+	+	-	0,01	0	24,1
190F2	CaP	3,89	2,14	0,64	1,19	71	-	3,10	7(4+3)	pT2c	II	mod	+	-	-	-	0,08	0	19,7
195F1	CaP	8,65	0,56	1,88	1,74	59	-	21,40	7(3+4)	pT2c	II	mod	-	-	+	-	0,03	0	30,4
198F1	CaP	3,88	0,70	0,17	0,34	49	+	4,10	7(3+4)	pT2c	II	mod	-	-	-	-	0	0	32,6
199F1	CaP	3,66	0,45	0,70	1,16	65	-	7,30	6(3+3)	pT2c	II	mod	-	-	-	-	0	0	9,6
200F1	CaP	3,48	0,54	0,31	0,78	60	-	11,50	7(3+4)	pT3b	III	mod	-	+	+	-	0	1	31,3
201F1	CaP	2,22	0,42	0,42	0,71	64	-	37,95	7(4+3)	pT3b	III	alto	+	+	+	+	0,14	0	21,6
202F1	CaP	2,71	nd	0,61	0,76	71	-	13,75	7(3+4)	pT2c	II	mod	-	-	+	-	0	0	6,7
203F1	CaP	2,88	0,42	0,34	1,00	69	+	11,00	8(3+5)	pT3a	III	alto	+	+	-	-	0,02	0	33,2
207F4	CaP	3,31	0,51	1,09	3,09	56	-	8,50	7(3+4)	pT2c	II	mod	-	-	-	-	0,33	1	21,1
209F2	CaP	1,22	2,09	0,30	1,00	53	-	4,50	6(3+3)	pT3a	III	mod	-	+	+	-	0,02	0	13,8
213F1	CaP	1,99	0,29	0,45	0,70	65	-	7,00	6(3+3)	pT3a	III	mod	-	+	-	-	0	0	11,4
217F1	CaP	1,34	1,62	0,39	0,83	51	+	6,95	6(3+3)	pT3a	III	mod	-	+	-	-	0	0	12,1
220F1	CaP	8,00	1,57	0,61	1,30	48	-	4,31	7(4+3)	pT2a	II	baixo	-	-	-	-	0	0	28,3
222F1	CaP	11,29	2,48	0,35	2,43	57	-	29,24	9(4+5)	pT4	IV	alto	+	+	+	-	0,18	1	10,8
223F1	CaP	2,02	2,21	0,60	1,42	50	+	4,08	7(3+4)	pT2c	II	mod	-	-	-	-	0	0	26,9
224F1	CaP	3,71	1,10	1,00	2,05	58	s.i.	1,06	7(3+4)	pT2c	II	mod	-	-	-	-	0	0	5,5
225F2	CaP	6,41	0,86	0,69	1,78	65	s.i.	4,27	6(3+3)	pT2c	II	mod	-	-	-	-	0	0	5,2
226F1	CaP	14,93	0,26	1,52	1,12	50	s.i.	2,06	6(3+3)	pT2c	II	mod	-	-	-	-	0	0	
227F1	CaP	11,02	0,39	1,47	1,66	64	s.i.	6,70	7(3+4)	pT3a	III	mod	-	+	-	-	0,2	0	22,9
228F1	CaP	2,97	1,12	0,98	1,50	53	-	6,57	7(4+3)	pT2c	II	mod	+	-	+	-	0,11	1	21,7
281	CaP	13,23	0,16	0,64	3,40	71	-	17,00	6(3+3)	pT2b	II	mod	-	-	-	-	0,05	1	84,4
936	CaP	1,79	0,91	0,99	1,24	53	+	1,80	6(3+3)	pT2b	II	baixo	+	-	-	-	0,02	0	74,4
952	CaP	3,38	0,34	0,43	0,60	57	+	8,20	5(2+3)	pT2b	II	baixo	-	-	-	-	s.i.	1	94,3
948	CaP	3,03	0,84	0,35	0,84	67	+	8,70	5(3+2)	pT2b	II	baixo	-	-	-	-	0,02	0	59,0
959	CaP	4,57	0,49	0,93	1,12	67	-	14,80	7(3+4)	pT3a	III	mod	-	-	+	-	0,01	0	83,6
961	CaP	4,81	0,18	1,11	1,09	60	-	6,00	7 (3+4)	pT3b	III	mod	-	-	+	-	0,03	1	88,5

933	CaP	2,48	0,26	0,13	0,51	43	-	9,90	9(5+4)	pT4	IV	alto	-	-	-	0,7	1	23,1
954	CaP	0,95	0,48	1,45	1,97	68	-	3,90	5(3+2)	pT2b	II	mod	-	-	-	0,01	0	80,1
946	CaP	4,86	0,19	0,40	0,78	66	-	11,70	5(3+2)	pT3a	III	mod	-	-	-	s.i.	0	78,3
940	CaP	5,45	0,45	0,37	0,78	61	-	6,23	7(3+4)	pT3a	III	mod	-	-	+	0,02	0	81,1
15 T	CaP	1,20	0,79	0,33	0,15	56	-	21,90	7(3+4)	pT3b	III	alto	+	-	+	0,08	1	53,1
24 T	CaP	4,80	0,50	3,09	1,97	72	-	7,32	7(4+3)	pT3a	III	mod	+	+	-	0,002	0	61,1
25 T	CaP	6,83	1,23	2,34	0,90	64	-	25,90	7(3+4)	pT2b	II	mod	-	-	-	0,002	1	57,5
37 T	CaP	7,09	2,13	3,15	1,29	58	+	8,60	7(3+4)	pT2b	II	mod	+	-	-	0,05	0	66,1
38 T	CaP	10,23	1,69	1,79	2,69	61	-	17,80	7(3+4)	pT2b	II	mod	-	-	+	0,94	1	52,7
39 T	CaP	4,89	1,08	2,14	1,30	54	-	7,30	7(3+4)	pT2a	II	baixo	-	-	-	0,05	0	8,2
43 T	CaP	11,79	0,76	2,89	1,31	60	-	4,22	7(3+4)	pT3a	III	alto	-	-	+	0,05	0	19,1
44 T	CaP	5,46	1,09	0,05	1,63	64	+	7,50	7 (3+4)	pT3a	III	mod	-	-	-	0,05	0	56,8
51 T	CaP	5,21	1,20	0,02	1,07	55	-	22,10	7(4+3)	pT3a	III	alto	+	-	-	0,003	0	28,6
52 T	CaP	2,07	0,99	0,15	1,20	72	-	6,80	7(3+4)	pT3a	III	mod	+	+	-	0,05	0	54,8
53 T	CaP	2,77	1,13	0,92	0,55	60	-	5,20	7(3+4)	pT3a	III	mod	-	-	-	0,05	1	38,6
59 T	CaP	2,32	0,35	0,68	0,68	79	-	8,63	7(4+3)	pT2b	II	mod	-	-	-	0,1	0	37,1
63 T	CaP	2,90	0,77	1,13	0,81	73	+	21,87	7(3+4)	pT3b	III	alto	-	+	+	0,12	1	43,4
23 T	CaP	6,89	0,36	1,53	1,55	57	-	4,60	7(3+4)	pT2a	II	baixo	-	-	-	0,03	0	47,9
27 T	CaP	8,68	0,33	1,74	1,35	58	+	2,40	7(3+4)	pT2b	II	mod	+	-	-	0	1	65,1
36 T	CaP	7,30	0,95	0,79	0,90	62	-	5,74	7(3+4)	pT3a	III	mod	-	-	+	0,05	0	48,9
54 T	CaP	5,33	0,81	1,98	1,11	61	-	5,70	7(3+4)	pT3a	III	mod	-	+	+	0,03	1	57,5
71 T	CaP	4,78	0,88	1,69	0,43	74	-	5,25	7(3+4)	pT3a	III	mod	-	-	+	0,003	0	27,6
B12T	CaP	3,48	0,87	1,83	0,97	67	-	9,50	6(3+3)	pT2b	II	baixo	-	-	+	0,03	0	59,3
B2T	CaP	6,92	0,98	1,20	1,36	64	-	7,89	6(3+3)	pT2b	II	baixo	-	-	-	0,03	0	68,0
B3T	CaP	6,23	1,22	1,61	1,26	56	-	8,30	6(3+3)	pT2a	II	baixo	-	-	-	0,03	1	69,3
B8T	CaP	4,48	0,41	1,95	0,75	61	-	9,20	8(3+5)	pT2b	II	baixo	-	-	-	0,03	0	68,7
B16T	CaP	14,84	1,64	1,15	1,44	61	-	4,20	6(3+3)	pT3a	III	mod	+	-	-	0,01	1	72,5
B17T	CaP	5,70	0,42	0,84	2,08	64	-	5,70	6(3+3)	pT2b	II	baixo	-	-	-	0,04	0	40,8
B43 T	CaP	11,16	1,14	1,61	0,41	64	+	5,30	7(3+4)	pT3a	III	mod	-	-	+	0,05	0	40,2
GL05 - 1T	CaP	5,39	0,57	0,01	0,35	70	-	4,70	5(3+2)	pT2b	II	baixo	-	-	-	0,06	0	61,2
GL05 - 2T	CaP	5,20	1,58	0,88	0,85	63	-	37,70	5(2+3)	pT2b	II	mod	-	-	-	0,034	0	36,4
GL06 - 2T	CaP	21,06	1,29	1,60	1,39	72	-	10,20	6(3+3)	pT2b	II	mod	-	-	-	0,002	0	44,0
GL08 - 2T	CaP	4,43	0,40	0,36	0,28	63	-	69,00	8(4+4)	pT3a	III	alto	-	-	+	9,3	1	40,0
B36 T	CaP	8,34	0,24	2,47	1,09	58	-	16,40	6(3+3)	pT3a	III	alto	-	-	-	0	1	50,2
B27 T	CaP	6,49	0,46	0,51	0,86	70	-	24,60	6(3+3)	pT3a	III	alto	-	-	+	0,02	0	71,1
B29 T	CaP	8,66	0,61	1,07	0,81	67	-	6,17	6(3+3)	pT2b	II	baixo	-	-	-	0,04	0	79,1
B38 T	CaP	11,12	0,54	3,27	1,15	66	+	6,57	6(3+3)	pT2b	II	baixo	-	-	-	0,01	0	25,9
B48 T	CaP	5,59	0,36	1,87	0,84	57	-	6,98	6(3+3)	pT2b	II	baixo	-	-	-	0,05	0	19,4
B51 T	CaP	6,88	0,43	0,79	0,57	58	+	15,00	6(3+3)	pT2b	II	mod	-	+	-	0,01	0	18,3
B32 T	CaP	7,13		1,51	1,62	63	-	8,06	7(4+3)	pT2b	II	mod	-	-	-	0,02	0	62,1
B37 T	CaP	12,48		2,44	1,29	50	-	8,15	7(3+4)	pT2b	II	mod	-	-	-	0,07	1	68,2
B50 T	CaP	1,94	0,51	0,59	0,74	56	-	3,30	6(3+3)	pT2b	II	baixo	-	-	-	0,005	0	45,9
B52 T	CaP	12,63	1,92	3,33	3,48	60	+	6,80	6(3+3)	pT2b	II	baixo	-	-	-	0,05	0	8,6
B74 T	CaP	1,89	0,15	0,66	0,74	78	-	9,26	9(4+5)	pT3b	III	alto	-	-	-	0,01	0	2,3
B77 T	CaP	3,16	0,48	1,21	1,23	71	-	4,70	7(3+4)	pT3a	III	mod	-	-	+	0,0012	0	33,3
B57 T	CaP	6,65	0,61	0,93	1,93	63	-	3,80	6(3+3)	pT3a	III	mod	+	+	+	0,02	0	39,3
B60 T	CaP	4,14	0,78	1,51	1,30	46	-	5,35	6(3+3)	pT2b	II	baixo	-	-	-	0,03	0	37,5

B63 T	CaP	3,56	1,50	2,22	2,19	70	+	6,07	6(3+3)	pT2b	II	baixo	-	-	-	-	0,002	0	32,7
B65 T	CaP	8,26	0,99	0,93	1,14	57	-	8,63	9(4+5)	pT2b	II	mod	+	-	-	-	0,03	0	43,7
B66 T	CaP	5,42	0,53	2,09	1,03	62	-	2,99	8(5+3)	pT3a	III	alto	-	-	+	-	0,01	0	6,3
B68 T	CaP	3,74	0,28	1,22	1,53	57	-	5,62	6(3+3)	pT3a	III	mod	-	-	+	-	0,033	0	43,3
B69 T	CaP	11,31	0,52	1,50	1,18	50	+	23,80	9(5+4)	pT3b	III	alto	-	-	-	-	0,39	1	41,2
B70 T	CaP	7,65	1,48	1,57	1,00	62	+	8,12	7(3+4)	pT2b	II	mod	-	-	-	-	0,01	0	15,0
B76 T	CaP	13,91	0,89	1,12	2,58	66	-	4,48	6(3+3)	pT2b	II	baixo	-	-	-	-	0,009	0	8,5
B 125 T	CaP	6,90	0,32	0,96	1,32	53	-	11,01	6(3+3)	pT2b	II	mod	-	-	-	-	0,05	0	45,9
070F1	Tec. adj.	9,49	0,43	1,60	0,86	71	-	9,94	7(4+3)	pT2c	II	mod	-	-	-	-	0,03	0	19,7
173F1b	Tec. adj.	2,33	0,25	1,14	0,68	71	+	17,68	7(3+4)	pT3b	III	alto	+	-	+	+	0,01	0	14,3
179F1	Tec. adj.	2,39	0,39	0,95	0,94	64	-	5,63	7(3+4)	pT3a	III	mod	-	+	+	-	0	0	21,3
193F2	Tec. adj.	0,89	1,58	0,68	1,69	69	-	19,36	7(3+4)	pT2c	II	mod	-	-	+	-	0,1	0	22,6
196F1	Tec. adj.	1,45	0,08	1,18	1,30	64	-	7,00	9(4+5)	pT3b	III	alto	-	-	-	+	s.i.	s.i.	
204F1	Tec. adj.	2,18	0,49	1,39	1,52	64	-	6,97	6(3+3)	pT2c	II	baixo	-	-	-	-	0	0	3,1
210F1	Tec. Adj.	0,69	1,04	0,63	0,86	68	-	11,08	6(3+3)	pT2b	II	mod	-	-	-	-	0	0	12,6
215F1	Tec. Adj.	2,34	0,28	1,07	0,65	52	-	3,97	6(3+3)	pT2a	II	baixo	-	-	-	-	0,03	0	12,8
88F2	Tec. adj.	4,57	0,69	0,96	1,26	65	+	5,82	7(4+3)	pT3a	III	mod	+	+	-	-	0,23	1	45,9