

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE
CÉLULAS-TRONCO EM CÂNCER DE PRÓSTATA E
SUA CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS
ANÁTOMOPATOLÓGICAS DOS PACIENTES APÓS
PROSTATECTOMIA RADICAL**

MARINA FRANÇA DE RESENDE

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

**Co-Orientador: Dr. Francisco Paulo da
Fonseca**

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Resende, Marina França de

Avaliação da expressão de marcadores de células-tronco em câncer de próstata e sua correlação com variáveis anátomopatológicas dos pacientes após prostatectomia radical / Marina França de Resende – São Paulo, 2012.

107p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. CÉLULAS-TRONCO NEOPLÁSICAS 2. NEOPLASIAS DA PRÓSTATA. 3. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR. 4. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 5. CÉLULAS-TRONCO. 6. PROGRESSÃO DA DOENÇA.

“É muito melhor lançar-se à luta em busca do triunfo, mesmo expondo-se ao insucesso, do que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Franklin D. Roosevelt

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe/ melhor amiga Sônia, por ser essa pessoa maravilhosa, pelo companheirismo, pela paciência com meus defeitos, por acreditar no meu potencial e me incentivar sempre, por todo o sacrifício que fez para criar a mim e aos meus irmãos praticamente sozinha, por ser pai e mãe ao mesmo tempo, sendo rígida nas horas necessárias. Tudo o que sou devo à senhora e certamente não existem palavras suficientes para expressar o quanto lhe sou grata por isso. Tudo o que eu faço é pensando numa maneira de retribuir o que recebi com tanto amor e carinho. Você é e sempre será meu exemplo de pessoa a seguir, espero ser sempre um motivo de orgulho em sua vida.

Ao meu estimado avô Luiz, por me amparar em todos os sentidos e em todos os momentos de minha vida, pelos ensinamentos de bondade e amor que carregarei comigo eternamente, pelo carinho e zelo que sempre teve comigo e por me ensinar que não precisamos prejudicar outras pessoas para alcançarmos o sucesso, sendo possível conseguir o êxito apenas semeando o bem. É uma verdadeira honra poder ter o prazer de conviver com uma pessoa que tenha uma maravilhosa história de vida igual a do senhor.

Ao meu querido primo Filipe (*in memorian*), pela grande lição de vida que jamais esquecerei, por ter sido essa pessoa maravilhosa e extrovertida que espalhava apenas alegria por onde passava e por me fazer enxergar que nenhum problema no mundo é digno de tanta preocupação quando se tem saúde para correr atrás do prejuízo. Você foi um guerreiro do começo ao fim, espero que agora finalmente esteja em paz e olhando por todos nós.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todas as minhas conquistas, por sempre me proteger e nunca me deixar desamparada, por fazer surgir em meu caminho pessoas maravilhosas que me auxiliam e me fazem crescer como ser humano, pelas inúmeras oportunidades que aparecem na minha vida e por sempre me dar forças para transpor todos os obstáculos, principalmente naquelas horas em que eu pensei que não conseguiria.

À Samantha, minha amiga e irmã, companheira de todas as horas, uma pessoa de uma força impressionante e caráter incontestável. Creio que nunca briguei tanto com uma pessoa quanto briguei com você. No entanto, o mais incrível é perceber que, mesmo possuindo personalidades e pontos de vista totalmente distintos, conseguimos gerar uma amizade perfeita. Obrigada por extrair o que há de melhor em mim, por entender meus anseios e enxergar minhas pequenas vitórias, por sempre me incentivar e apoiar, por respeitar meus limites e estar por perto em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins. Sobretudo, obrigada por me deixar fazer parte de sua vida e da vida de suas maravilhosas e amadas filhas, Stephanie, Tiffany e Larissa. Se existe uma pessoa responsável pelo fato de eu estar cursando uma pós-graduação, esse alguém é certamente você.

Ao meu orientador Dr. Rafael Malagoli Rocha, sobretudo pela oportunidade e por acreditar em mim e no meu potencial, por aceitar o fato de eu possuir um trabalho em paralelo ao mestrado, pela paciência em relação às minhas limitações, por sempre me incentivar a ir além, por me ajudar a vencer obstáculos, por estar sempre acessível e por coordenar seus alunos de forma tão competente e exemplar.

Ao meu co-orientador Dr. Francisco Paulo da Fonseca, pela valiosa contribuição no trabalho, pela disponibilidade e boa vontade em me atender (seja no Ambulatório Fernando Gentil quanto no consultório particular do senhor), pelo inestimável auxílio na interpretação dos resultados estatísticos em termos clínicos, pelo incentivo e por ceder seu maravilhoso banco de dados para o projeto.

À Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen, pela preciosa contribuição em relação à análise estatística do projeto, por ter me adotado como filha postíça, pela amizade e carinho com os quais sempre me tratou, por acreditar em minha capacidade e me incentivar constantemente e pela paciência e boa vontade em tirar as minhas dúvidas.

Ao Dr. Stênio de Cássio Zequi que, juntamente com o Prof. Dr. Francisco Paulo da Fonseca, teve êxito no difícil encargo de ensinar duas biólogas a respeito do câncer de próstata em uma disciplina constituída somente por médicos, inclusive permitindo que acompanhássemos as consultas no Ambulatório Fernando Gentil.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por ser receptivo e me dar a oportunidade de fazer parte da pós-graduação de uma instituição de excelência como o Hospital A. C. Camargo.

À Dra. Stephania Bezerra, pelos ensinamentos e pela boa vontade e disposição em mostrar a macroscopia de uma próstata.

À Natália, pessoa iluminada que apareceu em minha vida como um anjo. Muito obrigada por tudo o que tem feito por mim, pelas palavras amigas, pelas broncas, pela paciência e compreensão, pela sabedoria e pela amizade sincera, amor e carinho. Não tenho palavras para expressar aqui minha gratidão.

Aos meus queridos irmãos, Bruno e Thiago, pelo amor, carinho, paciência e suporte durante toda a minha vida. Talvez nunca tenha dito isso antes, mas tenho muito orgulho de vocês, pelo caráter, honestidade e por vencerem tantas batalhas e conseguirem chegar aonde chegaram. Obrigada por tudo.

Às minhas lindas cunhadas, Danielle e Erika, pelo carinho, paciência e por fazer meus irmãos muito felizes. Obrigada por escolherem fazer parte dessa família.

A toda minha família, em especial aos meus tios, Darcy, Márcia, Cláudia, Carmelo e Buck, e à minha querida avó, Dona Santa, pelo amor e carinho com que sempre me trataram.

Aos meus queridos parentes que faleceram, meu pai e avó, Ricardo e Nininha. Aonde quer que estejam, espero que estejam orgulhosos de mim e que continuem iluminando o meu caminho.

Aos meus queridos padrinhos, Cláudio e Eleana, e à sua linda família, pelo amor, carinho, apoio e amizade sincera que sempre tiveram com minha família.

Às minhas eternas amigas, Gabriela, Maria Claudia, Thaís Benessiuti e Thaís Godoy, pela mais pura amizade, pelos maravilhosos e inusitados momentos em que vivenciamos juntas, pelos risos e choros compartilhados e pelas confidências trocadas. Podemos ficar muito tempo sem nos ver, mas de uma coisa tenho a plena certeza: riremos das mesmas coisas, teremos o mesmo carinho e consideração umas com as outras e, o mais importante, a amizade permanecerá intacta. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao meu estimado amigo, Luis Claudio, pelas alegrias, amizade verdadeira e inúmeros momentos memoráveis em que passamos juntos.

Às queridas Rute, Nathalia e Carla Luana, pela amizade e pela boa vontade em ajudar no que for preciso.

Às amigas maravilhosas com as quais que tive o prazer de dividir o mesmo teto, Viviane, Daniela Hanashiro, Daniela Myamoto, Mariana Yashima e Mawusi. Obrigada pela constante aprendizagem, pela amizade verdadeira, pelos anseios e alegrias divididos, pelo apoio, tolerância e paciência e, sobretudo, por fazerem a minha vida muito mais feliz.

A todas às valorosas amizades que conquistei em São Carlos, em especial à Gabriela Cillo, Taís, Camila Shibuya, Fernanda, Larissa, Helena, Cintia Camila, Juliana, Camilla Helena, Denise, Alexandre, Márcia Dellamano, Raquel Rinke, Juliano, Anelise, Danilo Pompe, Lucas, Rafael, Rodrigo, Luci, Lisandra, Mariana Bezzon, Vanessa, Cintia e Erika. Certamente São Carlos não seria a mesma coisa sem vocês. Obrigada a todos por terem tornado inesquecível esse período da minha vida.

À querida Luciene, pela amizade, pela contribuição significativa no trabalho e por estar sempre disposta a ajudar.

A todos os funcionários do Hospital A. C. Camargo, em especial ao Ivan Neves, Carlos Ferreira Nascimento, Clara Regina Josino, Severino da Silva Ferreira, Sueli Nonogaki, Suely Francisco, Jefferson de Oliveira, Renata Lopes Mariano dos Santos, Ana Paula Teixeira Santos, Renata da Silva Costa, Luciana Pitombeira, Vanusa Rodrigues, Ana Kuninari, Simone Pagotty, Fátima Ferreira e Aline Santos Damascena, pela amizade, receptividade, disposição e boa vontade em ajudar.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial Juliano, Debora, Beatriz Maia, Beatriz Nunes, André, Júlio, Iara, Erica, Bruno e Mariana, pelo apoio, prontidão e boa vontade em ajudar no que for preciso.

RESUMO

de Resende MF. **Avaliação da expressão de marcadores de células-tronco em câncer de próstata e sua correlação com variáveis anátomopatológicas dos pacientes após prostatectomia radical.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Um grande número de estudos tem demonstrado a importância dos marcadores de células-tronco (CT) na progressão de diversos cânceres, correlacionando a expressão dos mesmos à agressividade tumoral. Particularmente em câncer de próstata (CaP), a literatura ainda é escassa.

Material e Métodos: Foram selecionadas para o presente estudo 193 amostras de adenocarcinoma prostático providas do Hospital do Câncer A. C. Camargo. Posteriormente, foi realizada a confirmação diagnóstica e a reclassificação e graduação histológica dos tumores em lâminas de hematoxilina e eosina (H&E). Os blocos de parafina correspondentes foram resgatados para a construção de um microarranjo de tecido (TMA) em cujas lâminas foram feitas reações de imuno-histoquímica (IHQ) para os marcadores de CT CD133, CD44, NANOG e OCT4 (isoformas OCT4A e OCT4B). Ensaio de western-blot e imunofluorescência na linhagem celular de CaP DU-145 também foram realizados a fim de verificar a especificidade dos anticorpos para OCT4. Foi analisado o tempo de sobrevida livre de recidiva bioquímica (SLRB) em relação à expressão dos marcadores e às variáveis anátomopatológicas, que foram recuperadas dos prontuários dos pacientes. **Resultados:** Os dados não demonstraram nenhuma correlação estatisticamente significativa em relação à expressão dos marcadores de CT às variáveis anátomopatológicas e ao PSA pré-operatório. Em relação à SLRB, pacientes que exibiram uma maior expressão de OCT4 e de OCT4B apresentaram um maior tempo de SLRB ($p=0,03$ e $p=0,02$, respectivamente), em oposição aos pacientes que obtiveram uma maior expressão de OCT4A, que apresentaram uma menor SLRB ($p=0,04$).

Pacientes que expressaram OCT4A e não expressaram OCT4B ao mesmo tempo (OCT4A⁺OCT4B⁻) exibiram uma menor SLRB quando comparado àqueles que apresentaram outras combinações de marcação de OCT4A e OCT4B ($p=0,001$). Os dados não demonstraram nenhuma correlação estatisticamente significativa em relação às expressões de CD133, CD44 e NANOG à SLRB. Na análise multivariada em relação à SLRB, permaneceram como fatores prognósticos independentes a expressão de OCT4B ($p=0,004$; RR=0,568; IC 95% [0,385 – 0,837]), presença dos estádios TNM III e IV ($p=0,008$; RR=1,747; IC 95% [1,153 – 2,645]) e a presença de invasão da vesícula seminal ($p=0,001$; RR=2,650; IC 95% [1,489 – 4,716]). **Conclusão:** A expressão de OCT4B manteve-se como fator prognóstico independente na análise multivariada, sendo que os pacientes que expressaram essa proteína apresentaram uma maior SLRB. De alguma forma, a expressão de OCT4B constituiu-se como um fator protetor em CaP. Tendo em vista que as diferentes isoformas do OCT4 podem exercer um papel importante na carcinogênese, estas precisam ser analisadas separadamente, com a sua posterior caracterização e validação através de diferentes experimentos; para tal feito, é imprescindível a utilização de ferramentas adequadas (anticorpos e primers específicos que sejam capazes de distinguir as diferentes isoformas).

SUMMARY

de Resende MF. [Evaluation of the expression of stem cell markers in prostate cancer and its correlation with patients' anatomopathological variables after radical prostatectomy]. São Paulo, 2012. [São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: A large number of studies have been demonstrated the importance of stem cell (CT) markers in the progression of several cancers, correlating its expression with tumor aggressiveness. Particularly in prostate cancer (CaP) the literature is still scarce. **Material and Methods:** For the present study, 193 samples of prostate adenocarcinoma were selected from the A. C. Camargo Cancer Hospital. It was subsequently performed the diagnostic confirmation and the reclassification and histological grading of the tumors on slides with hematoxylin and eosin (H&E). The corresponding paraffin blocks were retrieved for the construction of a tissue microarray (TMA) in which slides it was performed immunohistochemistry (IHQ) reactions for the CT markers CD133, CD44, NANOG and OCT4 (OCT4A and OCT4B isoforms). Western blot and immunofluorescence were also performed on the CaP cell line DU-145 to verify the specificity of OCT4 antibodies. It was analyzed the time of biochemical recurrence-free survival (SLRB) with regards to the expression of the markers and anatomopathological variables, which were retrieved from patient charts. **Results:** Data didn't showed statistical significance between the expression of CT markers and anatomopathological variables and preoperative PSA. Regarding SLRB, patients that exhibited increased expression of OCT4 and OCT4B had a longer SLRB ($p=0.03$ and $p=0.02$, respectively), as opposed to patients who had higher OCT4A expression, which exhibited a shorter SLRB ($p=0.04$). In addition, patients who expressed OCT4A and did not expressed OCT4B at the same time (OCT4B⁻OCT4A⁺) exhibited a shorter SLRB compared to those who exhibited other combinations of OCT4A OCT4B

staining ($p=0.001$). Data didn't showed statistical significance between the expression of CD133, CD44 and NANOG, and SLRB. In the multivariate analysis regarding SLRB, the expression of OCT4B ($p=0,004$; RR=0,568; IC 95% [0,385 – 0,837]), the presence of TNM stages III and IV ($p=0,008$; RR=1,747; IC 95% [1,153 – 2,645]) and the presence of seminal vesicle invasion ($p=0,001$; RR=2,650; IC 95% [1,489 – 4,716]) remained as independent prognostic factors. **Conclusion:** The expression of OCT4B remained as an independent prognostic factor in multivariate analysis; patients who expressed this protein had a longer SLRB. Somehow, the expression of OCT4B established itself as a protective factor in CaP. Considering that the different isoforms of OCT4 may play an important role in carcinogenesis, they need to be analyzed separately, with its subsequent characterization and validation through different experiments; for this, it is essential to use appropriate tools (antibodies and primers that are specific to distinguish the different isoforms).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da próstata em humanos.....	7
Figura 2	Representação esquemática da próstata em camundongos....	9
Figura 3	Hierarquia da diferenciação das células-tronco.....	10
Figura 4	Modelo das células-tronco tumorais.....	14
Figura 5	Modelo de evolução estocástico/clonal.....	15
Figura 6	Atuação conjunta entre os modelos de evolução estocástico/clonal e o das células-tronco tumorais.....	16
Figura 7	Caracterização da estrutura gênica do <i>CD133</i> em humanos....	22
Figura 8	Caracterização da estrutura molecular do <i>CD133</i>	23
Figura 9	Caracterização da estrutura gênica do <i>CD44</i> em humanos.....	27
Figura 10	Caracterização da estrutura molecular do <i>CD44</i>	28
Figura 11	Caracterização da estrutura gênica do <i>NANOG</i> em humanos..	31
Figura 12	Caracterização da estrutura molecular do <i>NANOG</i>	31
Figura 13	Estrutura esquemática do gene <i>OCT4</i> em humanos.....	36
Figura 14	Esquema da construção de um microarranjo de tecido.....	42

Figura 15	Marcações imuno-histoquímicas positivas em amostras de pacientes com câncer de próstata para os anticorpos CD133 (A), CD44 (C) e NANOG (E) x suas respectivas marcações imuno-histoquímicas negativas.....	52
Figura 16	Marcações imuno-histoquímicas positivas para os anticorpos OCT4A (A), OCT4 (C) e OCT4B (E) x suas respectivas marcações imuno-histoquímicas negativas (B, D e F).....	53
Figura 17	Imunofluorescência dos anticorpos OCT4A (A), OCT4B (B) e OCT4 (C).....	59
Figura 18	Western-blot em células DU-145 dos anticorpos OCT4A (A), OCT4B (B) e OCT4 (C).....	62
Figura 19	Expressão de CD133 em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica.....	66
Figura 20	Expressão de CD44 em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica.....	66
Figura 21	Expressão de NANOG em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica.....	67
Figura 22	Expressão de OCT4 em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica.....	67
Figura 23	Expressão de OCT4A em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica.....	68
Figura 24	Expressão de OCT4B em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica.....	68

Figura 25	Expressões combinadas de OCT4A e OCT4B em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica.....	69
------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Marcadores de células-tronco tumorais identificados em diferentes neoplasias.....	14
Tabela 2	Anticorpos primários utilizados na imuno-histoquímica.....	44
Tabela 3	Caracterização da casuística (variáveis bioquímicas e anátomopatológicas dos espécimes).....	50
Tabela 4	Expressão do CD133 em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório.....	54
Tabela 5	Expressão do CD44 em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório.....	55
Tabela 6	Expressão do NANOG em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório.....	56
Tabela 7	Expressão do OCT4 em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório.....	57
Tabela 8	Expressão do OCT4A em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório.....	58

Tabela 9	Expressão do OCT4B em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório.....	59
Tabela 10	Variáveis anátomopatológicas dos espécimes e PSA pré-operatório em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica.....	65
Tabela 11	Associação das expressões dos marcadores de células-tronco à sobrevida livre de recidiva bioquímica.....	65
Tabela 12	Análise multivariada para a sobrevida livre de recidiva bioquímica.....	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AR	<i>Androgen receptor</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CaP	Câncer de próstata
CARNs	<i>Castration-resistant Nkx3.1-expressing cells</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK	<i>Cytokeratins</i>
CT	Células-tronco
CTE	Células-tronco embrionárias
CTT	Células-tronco tumorais
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
GWAS	<i>Genome-wide association</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iPS	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
PAP	<i>Prostate acid phosphatase</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PIN	<i>Prostatic intraepithelial neoplasia</i>
PSA	<i>Prostate-specific antigen</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SLRB	Sobrevida livre de recidiva bioquímica
SNPs	<i>Single-nucleotide polymorphisms</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNM	Tumor-nódulo-metástase
TP/A	Transientes proliferativas/amplificadoras

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O câncer de próstata	1
1.2	Biologia celular da próstata	6
1.3	Células-tronco e o modelo das células-tronco tumorais	9
1.4	A origem do câncer de próstata.....	17
1.5	Marcadores moleculares para células-tronco e sua relevância para o câncer de próstata	20
1.5.1	CD133	21
1.5.2	CD44	25
1.5.3	NANOG	29
1.5.4	OCT4	34
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo geral	39
2.2	Objetivos específicos.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1	Pacientes e espécimes anátomopatológicos.....	40
3.2	A construção do microarranjo de tecido	41
3.3	Imuno-histoquímica	42
3.4	Análise das imagens	44
3.5	Cultura da linhagem celular humana de câncer de próstata DU-145	45
3.6	Imunofluorescência	45
3.7	Western-blot	46
3.8	Análise estatística.....	47
4	RESULTADOS.....	49
4.1	Caracterização dos pacientes	49
4.2	Imuno-histoquímica dos marcadores de células-tronco	51

4.3	Associação das variáveis anátomopatológicas dos espécimes e do PSA pré-operatório à expressão dos marcadores de células-tronco	54
4.4	Imunofluorescência	59
4.5	Western-blot	61
4.6	Associação da expressão dos marcadores de células-tronco à sobrevida livre de recidiva bioquímica	63
4.7	Análise multivariada para a sobrevida livre de recidiva bioquímica	69
5	DISCUSSÃO	71
5.1	Aspectos gerais	71
5.2	CD133, CD44 e NANOG	72
5.3	OCT4	78
6	CONCLUSÕES	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE PRÓSTATA

Atualmente, o câncer de próstata (CaP) representa a segunda causa mais comum de mortes por câncer no mundo. Nos países desenvolvidos, a neoplasia corresponde a 15% dos cânceres em homens; já em relação aos países em desenvolvimento, ela representa 4%. No Brasil, o CaP é o segundo mais comum entre os homens, ficando atrás somente do câncer de pele não-melanoma. Em 2009, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), 12.274 brasileiros morreram devido à doença. Estimativas de novos casos para 2012, segundo a mesma instituição, chegaram a um número de 60.180 (HEIDENREICH et al. 2011; Ministério da Saúde 2012).

Apesar dos números consideráveis, observa-se uma redução na taxa mortalidade devido ao CaP ao longo dos anos. Tal fato deve-se, provavelmente, ao aperfeiçoamento das técnicas diagnósticas e à descoberta do antígeno prostático-específico, ou PSA (do inglês, *prostate-specific antigen*), o que propiciou a detecção da neoplasia em seu estágio inicial, aumentando, portanto, as chances de cura dos pacientes. O PSA é uma serino-protease produzida pela próstata, constituindo-se num componente do fluido seminal necessário para o processo de ejaculação (DUNN e KAZER 2011).

Os fatores que determinam o desenvolvimento clínico da doença

ainda não são bem conhecidos. No entanto, três fatores de risco bem estabelecidos foram identificados: idade, etnia e hereditariedade. Se o parente de primeiro grau de um indivíduo apresentar CaP, o risco do mesmo desenvolver a doença é, no mínimo, dobrado. No caso de dois ou mais parentes de primeiro grau terem a neoplasia, o risco aumenta de 5 a 11 vezes. Cerca de 9% dos casos de CaP é hereditário, sendo este definido como a existência de três ou mais parentes acometidos pela doença ou de pelo menos dois parentes que tenham desenvolvido a mesma precocemente (com menos de 55 anos) (CALVO et al. 2002; HEIDENREICH et al. 2011).

O fator de risco mais significativo para a doença é certamente a idade avançada. Enquanto homens com idade inferior a 40 anos possuem 1 chance em 10.000 de desenvolver o CaP, tal risco aumenta para 1 chance em 7 em homens que atingiram 60 anos. Entretanto, o CaP não representa simplesmente um subproduto do envelhecimento, uma vez que sua incidência varia consideravelmente entre populações diferentes. Mais provavelmente, a relação da neoplasia com a senescência reflete o papel desenvolvido pelo ambiente e pelas influências fisiológicas e moleculares unidas às consequências normais advindas do envelhecimento, que provavelmente potencializam os efeitos de tais influências (SHEN e ABATE-SHEN 2010).

A progressão da neoplasia é mediada por uma série de processos que envolvem mutações nos genes que se relacionam à regulação do ciclo celular, apoptose (morte celular programada), adesão, motilidade e angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos). As alterações

genéticas mais comuns associadas ao CaP constituem a fusão dos genes *TMPRSS2:ERG* e a deleção do *PTEN* no cromossomo 10q23.3. Para o CaP hereditário, os *loci* associados à susceptibilidade à doença foram mapeados nos cromossomos 1q24-25 (HPC1), 17p11 (HPC2) e Xq27-28 (HPCX), que correspondem aos genes *RNASEL* (HPC1) e *ELAC* (HPC2). Estudos genômicos de associação, ou GWAS (do inglês, *genome-wide association*), têm identificado inúmeros polimorfismos de base única, ou SNPs (do inglês, *single-nucleotide polymorphisms*), associados ao risco de desenvolver o câncer. Particularmente, um *locus* central identificado nesses estudos foi caracterizado pela existência de polimorfismos de sequências múltiplas em 8q24, região próxima ao *MYC*. Nessa região foi identificada uma variante genética associada ao CaP em populações de europeus e africanos. Tal variante também ocorreu com uma alta frequência em afro-americanos, podendo ser a razão da alta incidência da doença em afro-americanos em comparação aos americanos descendentes de europeus (CALVO et al. 2002; DAMBER e AUS 2008; SHEN e ABATE-SHEN 2010).

A recidiva tumoral é comumente caracterizada pela amplificação e pela expressão aumentada do gene que codifica para o receptor de andrógeno, ou *AR* (do inglês, *androgen receptor*), culminando em respostas alteradas a baixos níveis de andrógeno. Em pouco menos que 10% dos casos de tumores resistentes à terapia hormonal é observada a inativação ou modulação da especificidade do *AR* através de mutação (MAITLAND e COLLINS 2008).

O CaP raramente provoca sintomas em seu estágio inicial, pois a

maioria dos adenocarcinomas origina-se a partir da região periférica da glândula, distante da uretra. A presença de sintomas sistêmicos, tais como dor óssea, anemia e falência renal, sugere uma doença localmente avançada ou metastática. A prevenção pode ser feita através do toque retal, que detecta anormalidades na glândula, e da dosagem dos níveis de PSA no sangue. Apesar deste último ser aceito mundialmente como um marcador para o CaP, este é específico para a próstata, e não para a doença em si. Além do CaP, infecções, traumas e hiperplasia prostática podem fazer com que os níveis de PSA se elevem. Apesar dessa limitação, o PSA ainda é tido como o melhor método para detecção da neoplasia. Níveis de PSA entre 2,5 e 4 ng/mL são considerados suspeitos para o CaP, necessitando, portanto, que se realizem outros exames que possibilitem um resultado mais preciso (DAMBER e AUS 2008; CAZARES et al. 2011; DUNN e KAZER 2011; HEIDENREICH et al. 2011).

O diagnóstico do CaP é feito através da biópsia (auxiliada pela ultrassonografia transretal), que até o presente momento consiste no método mais confiável para se obter uma amostragem precisa do tecido prostático. O estadiamento é feito por cintilografia óssea, tomografia computadorizada ou ressonância magnética. Uma vez diagnosticada a doença, a classificação do tumor maligno e sua extensão anatômica é feita preferencialmente pelo sistema Tumor-Nódulo-Metástase, ou TNM (do inglês, *tumour-node-metastasis*), desenvolvido e publicado pelo Comitê Conjunto Americano Sobre o Câncer, ou AJCC (do inglês, *American Joint Committee on Cancer*) (DAMBER e AUS 2008; CAZARES et al. 2011; HEIDENREICH et al. 2011).

O escore de Gleason é o método mais amplamente aceito pelos urologistas para a avaliação do prognóstico do paciente. Ele consiste na identificação dos padrões histológicos mais frequentes encontrados no tumor. Uma nota de 1 a 5 é dada aos dois padrões mais prevalentes, chamados de Gleason primário e Gleason secundário. O escore de Gleason é estabelecido através da somatória do Gleason primário e do Gleason secundário, podendo variar de 2 ($1+1=2$), para tumores diferenciados, a 10 ($5+5=10$), para tumores totalmente indiferenciados. Quanto maior a pontuação, pior é o prognóstico do paciente (EPSTEIN 2010; DELAHUNT et al. 2012).

O CaP localizado associado a um escore de Gleason menor do que 6 pode ser tratado de uma maneira efetiva através da remoção cirúrgica do órgão (prostatectomia radical), radioterapia ou por meio do monitoramento ativo (*“active surveillance”*), dependendo do paciente. Quando a neoplasia encontra-se localmente avançada, as opções de tratamento variam desde radioterapia até prostatectomia radical aliada à terapia hormonal, que consiste na ablação androgênica e/ou na inibição androgênica através de anti-andrógenos. No entanto, quando se trata da doença metastática, o prognóstico permanece desanimador. Nesses casos, o tratamento primário utilizado é a terapia hormonal. Apesar dos pacientes geralmente responderem bem ao tratamento num primeiro momento, com uma rápida redução na dor, nos níveis de PSA e no tamanho do tumor, este normalmente volta a crescer, culminando no CaP hormônio-refratário (fase andrógeno-independente), resultado do bloqueio do AR. A sobrevida do

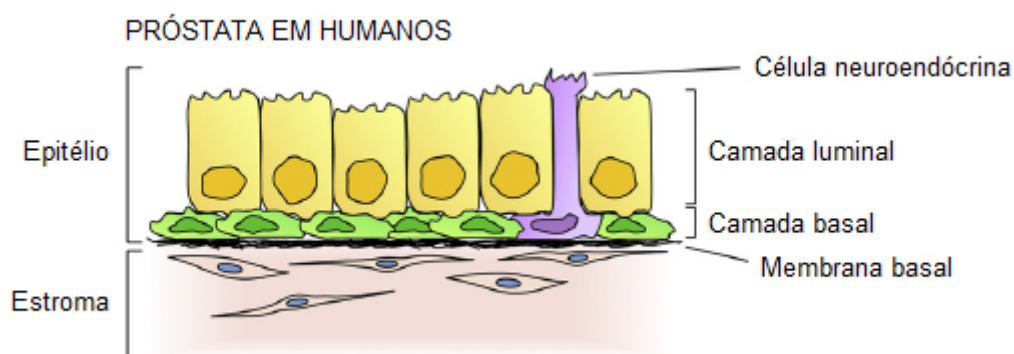
paciente é de aproximadamente dois anos, mesmo com a realização posterior da quimioterapia (MAITLAND e COLLINS 2008; PALAPATTU et al. 2009).

O CaP caracteriza-se por apresentar, preferencialmente, metástase óssea e linfonodal. No entanto, devido aos programas de triagem para a detecção precoce da doença, observa-se uma redução significativa no número de pacientes com a doença metastática. Estudos, porém, têm demonstrado que 30% desses pacientes apresentarão recidiva bioquímica, caracterizada pela elevação dos níveis de PSA ($\text{PSA} > 0,2 \text{ ng/mL}$), dentro de 10 anos após o diagnóstico, mesmo se optarem pela prostatectomia radical (EATON et al. 2010).

1.2 BIOLOGIA CELULAR DA PRÓSTATA

A próstata humana é um órgão glandular constituído por dois tipos predominantes de células, basais e luminais, que se diferenciam não só em seu aspecto morfológico como em suas propriedades biológicas. As células colunares do epitélio luminal apresentam atividade secretória, tendem a ser diferenciadas, dependentes de andrógeno e possuem baixa capacidade proliferativa e alto índice apoptótico; já as células basais representam o oposto, ou seja, encontram-se fortemente aderidas à membrana basal, são relativamente indiferenciadas, independentes de andrógeno e apresentam alta capacidade proliferativa e baixo índice apoptótico, características intrínsecas às células-tronco (CT). Dispersas pelo epitélio prostático estão

as células neuroendócrinas, terminalmente diferenciadas e andrógeno-independentes (vide Figura 1). Apesar de estas últimas serem encontradas rotineiramente no CaP, com uma prevalência aumentada na fase mais avançada e metastática da doença, sua função precisa ainda é desconhecida. A relação existente entre as células neuroendócrinas e as células luminais e basais ainda não foi esclarecida, no entanto, evidências atuais sugerem que as primeiras representam um tipo celular pós-mitótico derivado das células secretoras luminais. Alguns modelos sugerem a existência de células transientes proliferativas/amplificadoras (TP/A) que serviriam como intermediárias entre as CT indiferenciadas da camada basal e as altamente diferenciadas células exócrinas e neuroendócrinas do lúmen. A próstata humana também contém vários tipos de células do estroma, incluindo fibroblastos, miofibroblastos e células musculares lisas, as quais guiam o crescimento e a diferenciação do epitélio (CALVO et al. 2002; LAWSON e WITTE 2007; PALAPATTU et al. 2009; OLDRIDGE et al. 2011).



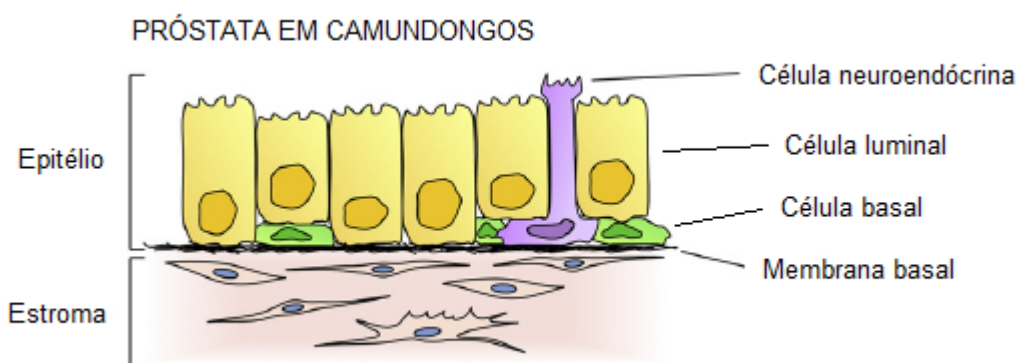
Fonte: Adaptado de OLDRIDGE et al. (2011)

Figura 1 - Representação esquemática da próstata em humanos

As células basais e as luminais podem ser diferenciadas também através da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para coloração das citoceratinas, ou CK (do inglês, *cytokeratins*), que fazem parte do grupo das proteínas filamentosas que entrelaçam o citoesqueleto através de interações heterodiméricas e polimerização. CK8 e CK18 são predominantemente expressas pelas células luminais; já as células basais são caracterizadas pela expressão de CK5 e CK14. As células TP/A subdividem-se em dois grupos, baseado no padrão de expressão das CK: o primeiro tipo celular é caracterizado pela expressão de CK5 e ausência da expressão de CK14, localizando-se no compartimento basal; já o segundo tipo celular expressa CK5 e CK18 e encontra-se no epitélio luminal. Além de expressarem CK8 e CK18, as células luminais também expressam fosfatase ácida prostática, ou PAP (do inglês, *prostate acid phosphatase*), PSA, CD57, 15-lipoxigenase-2 (15-LOX2), Nkx3.1 e altos níveis de AR; as células basais expressam p63, CD44, Bcl-2, telomerase, GST- π , marcadores de proliferação celular (como C-Met), supressores de mitose (como p27kip), o receptor de estrógeno β , ou (ER) β (do inglês, *estrogen receptor*), e baixos níveis de AR. Por último, as células neuroendócrinas expressam marcadores endócrinos, tais como cromogranina A, sinatopsina, bombesina, calcitonina, serotonina e somatostatina; tais células não expressam AR (SCHALKEN e VAN LEENDERS 2003; VAN LEENDERS e SCHALKEN 2003; TANG et al. 2007; KASPER 2008; WANG e SHEN 2011; OLDRIDGE et al. 2011).

Contrastando a próstata humana, em camundongos o órgão é muito mais simples, consistindo de um epitélio luminal em contato direto com a

membrana basal, além de um relativo menor número de células basais numa camada descontínua e um estroma menos complexo e espesso (vide Figura 2) (OLDRIDGE et al. 2011).



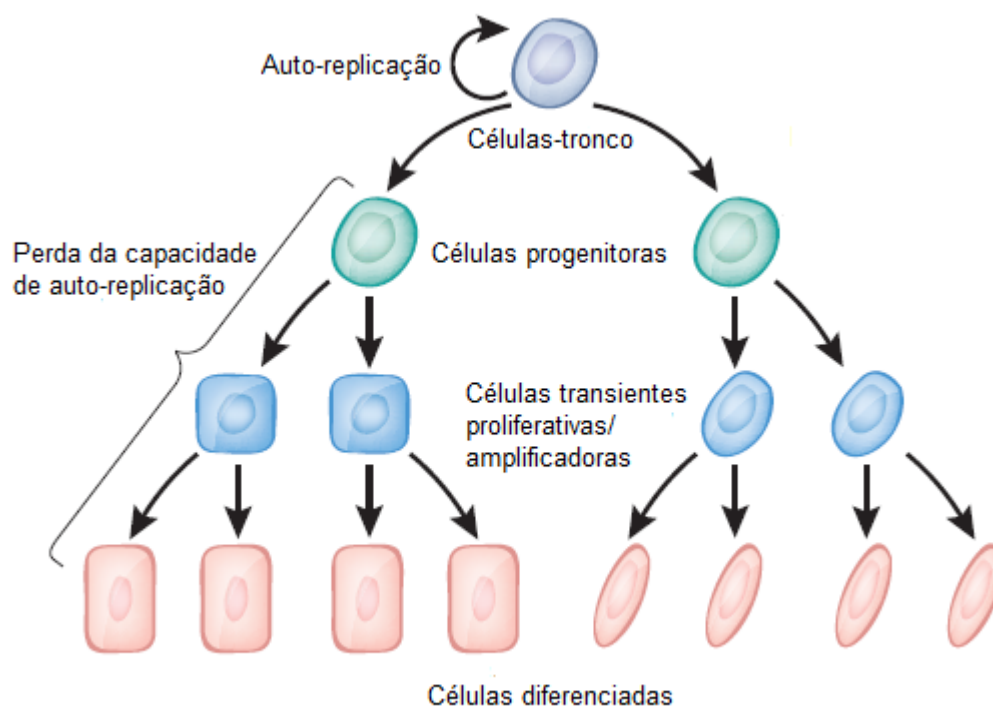
Fonte: Adaptado de OLDRIDGE et al. (2011)

Figura 2 - Representação esquemática da próstata em camundongos

1.3 CÉLULAS-TRONCO E O MODELO DAS CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

As CT encontram-se no topo da linhagem hierárquica (vide Figura 3). Elas são multipotentes e detêm a capacidade de auto-renovação (divisão simétrica), proliferação e diferenciação em outras linhagens celulares (divisão assimétrica) que constituem um órgão. A presença de CT adultas foi confirmada em diversos tecidos (inclusive em próstata), onde exercem papéis fundamentais nos processos de homeostase, reparo e regeneração. Tais células geralmente são representadas por uma pequena subpopulação de células quiescentes com uma alta razão núcleo:citoplasma. Podem ser induzidas a se proliferarem após um estímulo, apresentando, portanto, um

alto potencial proliferativo. Na próstata humana e de camundongo, as primeiras evidências da existência das CT epiteliais andrógeno-independentes surgiram em meados de 1980, através de experimentos de regressão/regeneração. Através desses experimentos, pesquisadores observaram que ocorria a apoptose da maioria das células luminais com a queda dos níveis de andrógenos, com a sobrevivência de algumas células basais. Posteriormente, ao restabelecerem os níveis de andrógenos, ocorria a reconstituição do compartimento luminal, ficando evidente, portanto, a existência de SC andrógeno-independentes na camada basal da próstata (WANG e SHEN 2011; OLDRIDGE et al. 2011).



Fonte: Adaptado de GUPTA et al. (2009)

Figura 3 - Hierarquia da diferenciação das células-tronco

Em se tratando de camundongos, ainda não é bem definido se a população de CT prostáticas caracteriza-se por um fenótipo basal ou luminal, uma vez que há evidências para ambas as hipóteses. WANG X et al. (2009a) demonstraram a existência de uma população de raras células luminais, denominadas CARNs (do inglês, *Castration-resistant Nkx3.1-expressing cells*). Tais células expressam Nkx3.1 após a castração, possuem a capacidade de auto-renovação *in vivo* e são capazes de reconstituir os dutos prostáticos através do transplante de uma única célula. Em contrapartida, há diversos estudos indicando que as CT da próstata de camundongos possuem características basais. Tanto em humanos quanto em roedores, é conhecido que as células basais são andrógeno-independentes e apresentam uma capacidade proliferativa maior do que as células luminais. As células basais podem se diferenciar, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em células luminais. Estudos em camundongos levaram à identificação de uma subpopulação de células Sca-1⁺ epiteliais prostáticas com características semelhantes às CT, localizada na região proximal dos dutos prostáticos. Posteriormente, o marcador Sca-1⁺ foi utilizado em conjunto com outros a fim de isolar e caracterizar tal subpopulação de CT. LAWSON et al. em 2007 identificaram células com o fenótipo CD45⁻CD31⁻Ter119⁻Sca-1⁺CD49f⁺, presentes na próstata de camundongos, como potenciais CT com capacidade de auto-renovação, formação de esferas em cultura (“prostratosferas”) e diferenciação. Tais células claramente foram identificadas na camada basal e foram capazes de gerar tanto células luminais quanto células basais *in vivo*. LEONG et al. em 2008 demonstraram

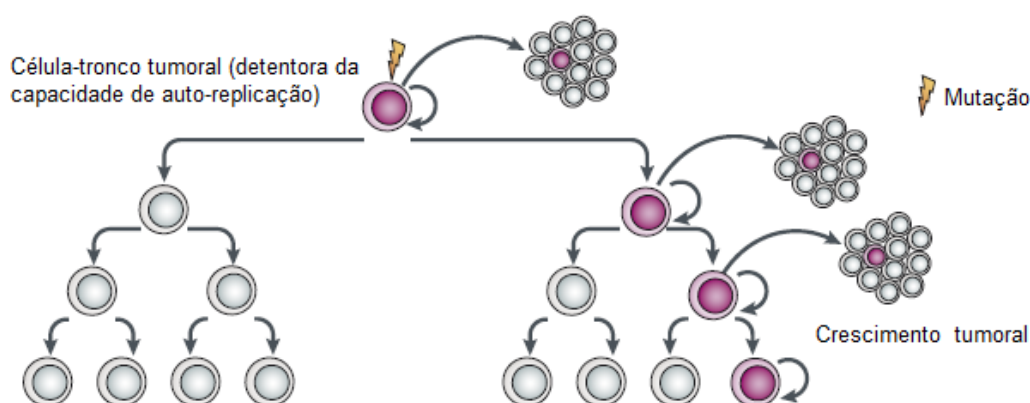
que uma única célula $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD133}^+ \text{CD44}^+ \text{CD117}^+$ foi capaz de reconstituir as estruturas funcionais da próstata quando transplantada *in vivo* (BURGER et al. 2005; FRAME et al. 2010; MAITLAND et al. 2011; OLDRIDGE et al. 2011).

A respeito da próstata humana, há evidências consistentes de que as CT residem na camada basal. Em 2004, RICHARDSON et al. demonstraram a existência, no compartimento basal, de células integrina $\alpha 2 \beta 1^+ \text{CD133}^+$ que representavam uma pequena subpopulação de células quiescentes com características semelhantes às CT: alto potencial proliferativo *in vitro* e capacidade de reconstrução de estruturas acinares funcionais da próstata *in vivo*. A caracterização molecular de tais células revelou que estas não expressavam AR em níveis de mRNA, indicando que não são andrógeno-dependentes e nem andrógeno-responsivas. No elegante trabalho de GOLDSTEIN et al., de 2010, foram utilizados marcadores de superfície celular para separar as células luminais ($\text{CD49}^{\text{lo}} \text{Trop2}^{\text{hi}}$) das células basais ($\text{CD49}^{\text{hi}} \text{Trop2}^{\text{hi}}$). Após combinação com células mesenquimais do seio urogenital embrionário e posterior injeção subcutânea em camundongos altamente imunodeficientes NOD-SCID-IL-2R $\gamma^{-/-}$, somente as células basais formaram dutos prostáticos depois de 16 semanas de crescimento. Além disso, nesse mesmo estudo, os autores introduziram nas células luminais e basais um lentivírus carregando os genes *ERG* e *AKT* ativados. Apenas o lentivírus inserido nas células basais resultou em neoplasia intraepitelial prostática de alto grau, ou PIN (do inglês, *prostatic intraepithelial neoplasia*), uma lesão histologicamente caracterizada pela hiperplasia do epitélio

luminal e por uma progressiva perda das células basais, além de ser apontada por diversos estudos como sendo a precursora de alguns carcinomas prostáticos. A coexpressão desses dois genes associada ao *AR* culminou num adenocarcinoma altamente semelhante ao CaP (MAITLAND et al. 2011; OLDRIDGE et al. 2011).

Baseado no modelo das células-tronco tumorais (CTT), também conhecidas como células iniciadores de tumor ou células tumorais semelhantes às CT, apenas uma ínfima porcentagem das células tumorais possuiria a capacidade infinita de se auto-renovar e, assim, de reconstituir o tumor, incluindo todos os seus tipos celulares (vide Figura 4). Tais células iniciadoras seriam as CTT propriamente ditas, que, quando purificadas e injetadas num modelo animal, provocariam o crescimento tumoral. De uma maneira oposta, sua progênie sofreria o processo de diferenciação e perderia seu potencial tumorigênico. Sob tal ponto de vista, sendo as CTT a força motriz do tumor, tratamentos efetivos no combate à doença devem se focar especificamente nessa população de células para que não haja uma posterior recidiva tumoral (vide Figura 4). Diversos estudos têm demonstrado a existência de subpopulações de células detentoras de características intrínsecas às CTT em câncer de cérebro (SINGH et al. 2004), mama (AL-HAJJ et al. 2003), fígado (MA et al. 2007), pâncreas (LI et al. 2009b), pulmão (ERAMO et al. 2008), endométrio (RUTELLA et al. 2009), cólon (LI et al. 2012) e próstata (FAN et al. 2010). Todas as subpopulações de células candidatas à CTT de tais estudos foram caracterizadas através da utilização de marcadores moleculares que identificam também suas

correspondentes CT/progenitoras, sugerindo que as CTT e suas contrapartes normais compartilham dos mesmos marcadores fenotípicos. A Tabela 1 identifica os marcadores moleculares utilizados na caracterização de populações de CTT em diferentes trabalhos, dentre os quais alguns já citados anteriormente (WANG e SHEN 2011; OLDRIDGE et al. 2011).



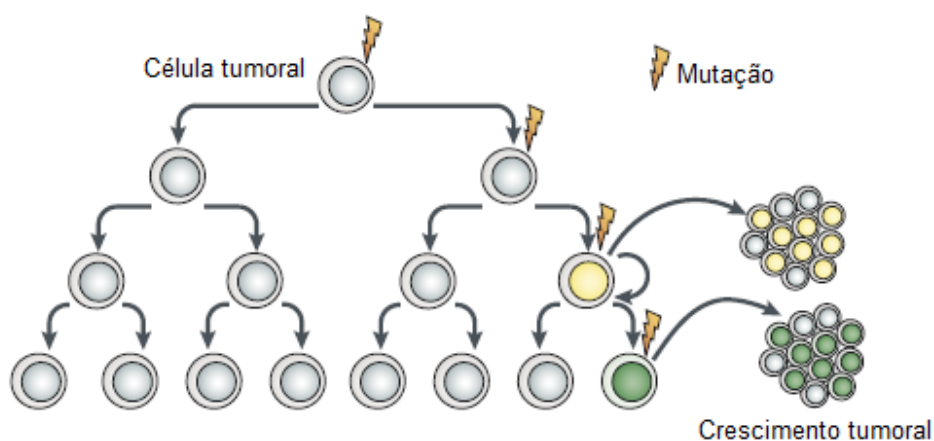
Fonte: Adaptado de VISVADER e LINDEMAN (2008)

Figura 4 – Modelo das células-tronco tumorais (somente as células-tronco tumorais podem causar o crescimento tumoral, em razão de sua capacidade de auto-renovação)

Tabela 1 - Marcadores de células-tronco tumorais identificados em diferentes neoplasias

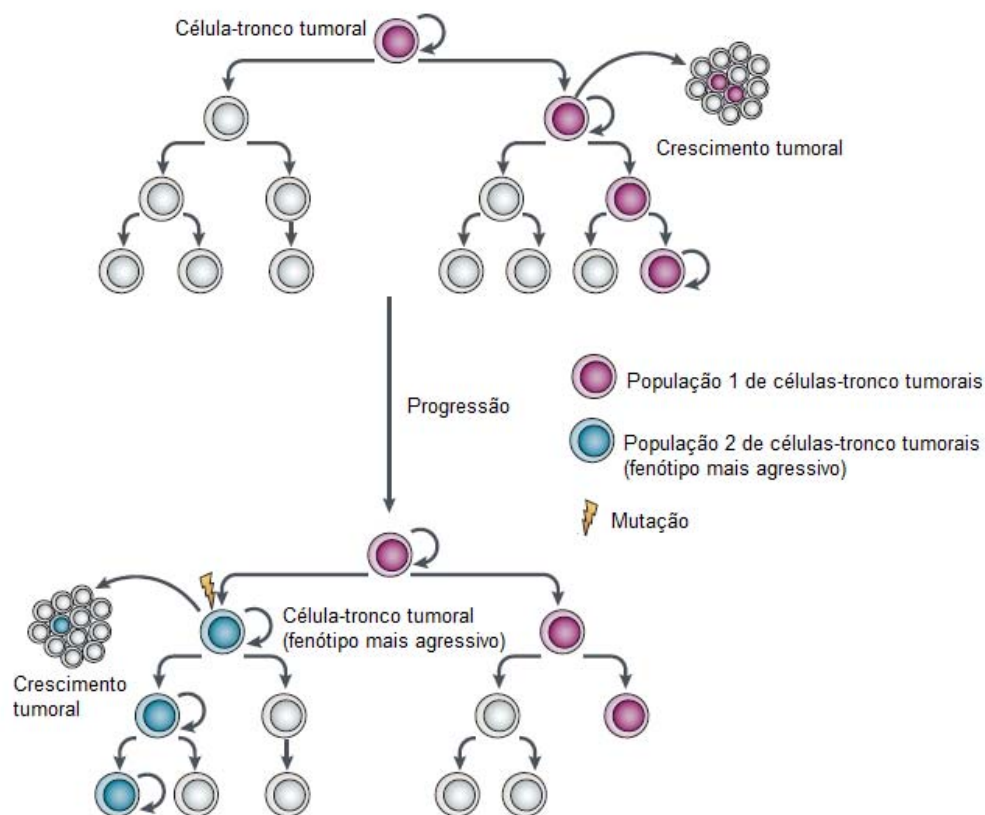
CÂNCER	MARCADORES	REFERÊNCIA
Bexiga	Lin ⁻ / CD44 ⁺ / CK5 ⁺ / CK20 ⁻	CHAN et al. (2009)
Cérebro	CD133 ⁺	SINGH et al. (2004)
Cólon	EpCAM ^{hi} / CD44 ⁺	DALERBA et a. (2007)
Fígado	CD90 ⁺	YANG et al. (2008)
Leucemia mieloide aguda	CD34 ⁺ CD38 ⁻	BONNET e DICK (1997)
Mama	CD44 ⁺ / CD24 ^{-/low} / Lin ⁻ / EpCAM ⁺	AL-HAJJ et al. (2003)
Melanoma	ABC B5 ⁺	SCHATTON et al. (2008)
Ovário	CD44 ⁺ / CD117 ⁺	ZHANG S et al. (2008)
Pâncreas	CD44 ⁺ / CD24 ⁺ / ESA ⁺	LI et al. (2009b)
Próstata	CD133 ⁺ / α ₂ β ₁ ^{hi} / CD44 ⁺	WEI et al.(2007)
Pulmão	CD133 ⁺	TIRINO et al. (2009)

Na contramão, encontra-se o modelo de evolução estocástico (ou clonal), no qual postula que as células tumorais mutantes detentoras de uma vantagem de crescimento seriam selecionadas e se proliferariam, sendo que todas as células tumorais pertencentes a tal população dominante possuiria um potencial tumorigênico similar. Em outras palavras, a força motriz do tumor seria composta por clones detentores de vantagens em relação ao crescimento e/ou resistência à terapia. Portanto, em tal modelo, um tratamento efetivo no combate à doença consistiria no ataque de todas as células tumorais. É importante notar que os 2 modelos não são mutuamente exclusivos, uma vez que as próprias CTT sofrem o processo de evolução clonal. Desse modo, uma segunda população de CTT mais dominante pode surgir, caso sofra alguma mutação que confira um fenótipo mais agressivo em relação às capacidades de auto-renovação e de crescimento celular (vide Figura 6) (VISVADER e LINDEMAN 2008; WANG e SHEN 2011).



Fonte: Adaptado de VISVADER e LINDEMAN (2008)

Figura 5 - Modelo de evolução estocástico/clonal (todas as células indiferenciadas detêm capacidades tumorigênicas similares)



Fonte: Adaptado de VISVADER e LINDEMAN (2008)

Figura 6 - Atuação conjunta entre os modelos de evolução estocástico/clonal e o das células-tronco tumorais (inicialmente, o crescimento tumoral é dirigido por uma população de células-tronco tumorais; com a progressão do tumor, uma segunda população de células-tronco tumorais pode surgir em razão da evolução clonal e adquirir um fenótipo mais agressivo, tornando-se dominante e, assim, sendo a responsável pelo crescimento tumoral)

Acredita-se que as CTT prostáticas surgem devido ao processo de envelhecimento, onde estas adquiriram modificações epigenéticas (mudanças da cromatina e do DNA) e mutações que resultaram na desregulação dos processos biológicos normais das células enquanto mantiveram o fenótipo de auto-renovação. As CTT não expressam AR e

nem PSA, além de serem tipicamente quiescentes. A resistência que essas células apresentam às terapias tradicionais, que dependem de uma atividade contínua de ciclagem celular, como a quimioterapia e a radiação, é uma consequência dessa quiescência. Portanto, estas provavelmente são andrógeno-independentes e sobreviverão à ablação androgênica imposta pela terapia hormonal, culminando na recidiva tumoral (CALVO et al. 2002; PALAPATTU et al. 2009).

1.4 A ORIGEM DO CÂNCER DE PRÓSTATA

Como mencionado anteriormente, PIN de alto grau é considerada uma lesão precursora do CaP, caracterizando-se histologicamente por uma hiperplasia do epitélio luminal e uma perda progressiva do epitélio basal. Com a evolução da doença para o adenocarcinoma, a arquitetura prostática começa a se degradar, resultando na perda das estruturas glandulares características e na destruição da membrana basal. Em nível celular, ocorre uma redução drástica das células basais ($< 1\%$), sendo que o CaP é constituído majoritariamente por células luminais AR^+ ($> 99\%$), que tornam-se altamente proliferativas na doença. Embora o CaP exiba um fenótipo fortemente luminal, isso não exclui a possibilidade das células basais serem as células de origem da doença. Particularmente, é possível que células basais transformadas se diferenciariam para produzir uma grande quantidade de células luminais tumorais (KASPER 2008; WANG e SHEN 2011; OLDRIDGE et al. 2011).

Duas teorias centrais foram propostas para explicar o surgimento do CaP. A primeira delas postula que a doença surgiria de um nicho de CT normais localizado na camada basal da glândula prostática. Sob certas condições fisiológicas, tais células normais (que possuem uma baixa taxa de proliferação) dariam origem a uma segunda população de células, que apresentaria uma capacidade proliferativa maior, as células TP/A. Em seguida, estas se diferenciariam em células secretoras maduras. No entanto, durante o processo tumorigênico, os genes controladores da proliferação celular e reparo do DNA nas CT normais acumulariam mutações, provocando a transformação de tais células em CTT, que apresentariam uma vantagem em relação à taxa de crescimento em comparação à sua contraparte. A segunda teoria prediz que o CaP origina-se de células normais localizadas na camada luminal/transiente/amplificadora, que se desdiferenciariam e readquiririam a capacidade de auto-renovação, dando início ao crescimento descontrolado do tumor (TREROTOLA et al. 2010).

De acordo com MEEKER et al. (2002) e GUREL et al. (2008), eventos moleculares associados ao início da doença, como encurtamento do telômero e superexpressão de *c-MYC*, aconteceriam exclusivamente nas células luminais, e não nas basais. Utilizando um modelo animal para o estudo do CaP (camundongos nocauteados para *PTEN*), KORSTEN et al. em 2009 observaram que as células iniciadoras do tumor apresentavam o fenótipo luminal. Mencionando novamente o trabalho de WANG X et al. (2009a) em camundongos, ao deletarem o *PTEN* nas células CARNs,

estritamente luminais, ocorreu o aparecimento da PIN de alto grau e, posteriormente, do carcinoma, sugerindo que essas células seriam as precursoras do CaP. Em um estudo recente, GERMANN et al. (2012) demonstraram a pré-existência de uma população de células resistentes à castração androgênica semelhante às CARNs em um modelo de xenoenxerto de CaP humano, no qual foi capaz de reiniciar o crescimento tumoral após o reestabelecimento dos níveis de andrógeno. As células constituintes dessa população expressavam marcadores de células luminais (Nkx3.1, CK18 e AR) e de CT (OCT4, SOX2, KLF4, NANOG, ALDH1A1 e CD44), não expressando marcadores de células basais. Entretanto, até o presente momento, é desconhecido se tais CARNs existem no epitélio prostático hormonalmente intacto e, se de fato existem, se estas seriam as precursoras da doença (GERMANN et al. 2012).

Na concepção de MOSCATELLI e WILSON (2010), é possível que ambos os tipos celulares, basal e luminal, dêem origem ao CaP. Segundo os mesmos autores, também seria possível que os estímulos oncogênicos provoquem diferentes transformações em populações distintas de células. Portanto, tumores derivados de diferentes células teriam um comportamento biológico e perfil genético variável, dependendo de sua origem. Por existirem indícios de que as CT normais da próstata residem tanto no compartimento luminal quanto no basal, se tais células são mais susceptíveis às transformações oncogênicas, ambos os compartimentos conteriam células que dariam origem ao CaP.

A maioria das evidências científicas indica que as CT da próstata

residem na camada basal e dão origem às células secretoras luminais por meio das células TP/A, possuidoras de um fenótipo intermediário entre as CT e as células diferenciadas. Sabe-se de uma forma concreta que: a) em camundongos adultos, as células secretoras são originadas de células que expressam p63 (um fator de transcrição presente em todas as células basais da próstata); e b) células basais que expressam p63 são fundamentais para o desenvolvimento prostático. Células basais da próstata de humanos e camundongos apresentam um maior potencial proliferativo *in vivo* e *in vitro* em comparação às células luminais, além da assinatura molecular das SC prostáticas exibirem um fenótipo semelhante ao basal, como expressão de CK5, CK14, p63 e integrina $\alpha 6$ (MOSCATELLI e WILSON 2010).

Em suma, a origem da neoplasia ainda é um assunto bastante controverso no meio científico. Somente com a identificação e caracterização da célula de origem do CaP será possível o desenvolvimento de terapias mais efetivas, direcionadas exclusivamente para a eliminação dessa população celular específica.

1.5 MARCADORES MOLECULARES PARA CÉLULAS-TRONCO E SUA RELEVÂNCIA PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA

Diversos estudos têm correlacionado a expressão de marcadores de CT com agressividade tumoral, tais como em câncer de mama (ZHOU et al. 2010; HANKER et al. 2010; NEUMEISTER et al. 2010), próstata (HAN et al. 2004; ZHIGANG e WENLV 2004; GRAVDAL et al. 2009), colorretal

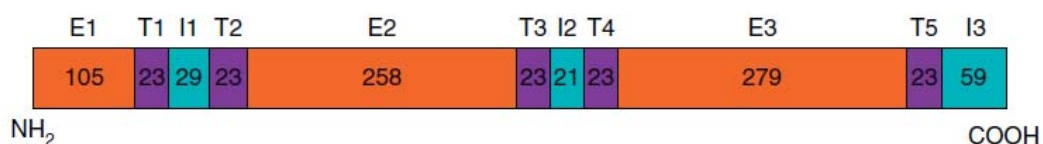
(NAKAMURA et al. 2010; TAKAHASHI et al. 2010) e pulmão (WOO et al. 2010; SHOLL et al. 2010; LI et al. 2011). No entanto, particularmente em se tratando do CaP, a literatura ainda é escassa. O grande desafio clínico do CaP é representado pela atual incapacidade de distinção entre a doença indolente e a agressiva em pacientes que apresentam um escore de Gleason baixo na biópsia. Essa falta de informação prognóstica acarreta num tratamento excessivo de pacientes que eventualmente precisam apenas de um monitoramento conservativo. Desse modo, o impacto provocado pelo tratamento na sobrevida dos pacientes com CaP é pequeno, mais provavelmente devido a um tratamento excessivo desnecessário e a um diagnóstico superestimado, o que provoca uma diluição dos benefícios da terapia àqueles pacientes que realmente necessitam de uma intervenção (SHEN e ABATE-SHEN 2010).

Atualmente, há um número significativo de potenciais marcadores para CT. O presente trabalho tem como foco os seguintes: CD133, CD44, NANOG e OCT4.

1.5.1 CD133

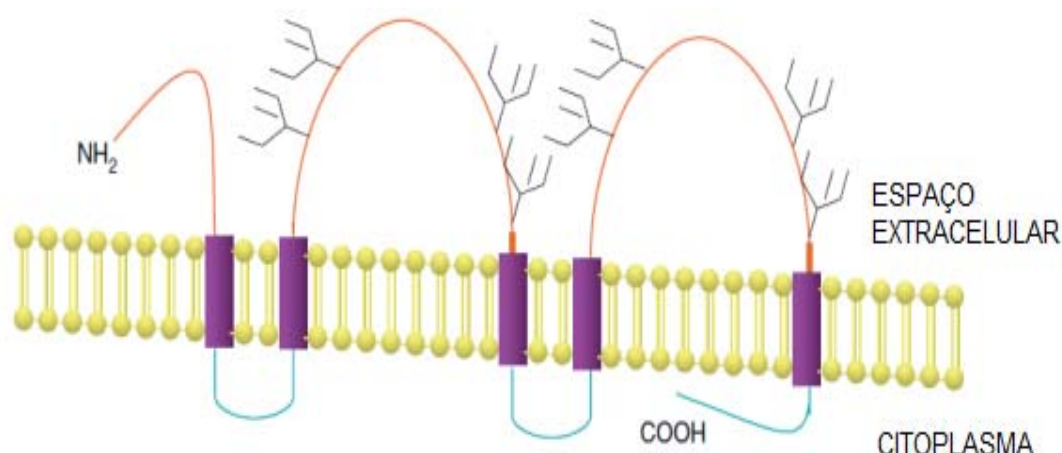
Em humanos, o CD133, também conhecido prominina-1, é uma proteína pertencente à família das promininas. Foi originalmente descoberto como alvo do anticorpo AC133, o qual reconhece um epítipo da molécula dependente de glicosilação. Células CD34⁺ progenitoras do fígado fetal e da medula óssea fetal e de adultos, do sangue do cordão umbilical e do sangue periférico foram utilizadas para a imunização de camundongos, e a

expressão restrita do antígeno do CD133 a esses tecidos sugeriu que este poderia ser usado como um marcador de células progenitoras hematopoiéticas. O cDNA do CD133 codifica uma glicoproteína transmembrana de cadeia única constituída por 865 aminoácidos (AA), possuindo um peso molecular de 120 kDa. Apresenta 1 domínio N-terminal (105 AA), 2 domínios adicionais extracelulares (258 e 279 AA), 5 domínios transmembrana (cada um contendo 23 AA), 2 domínios intracelulares (29 e 21 AA) e uma cauda carboxi-terminal de 59 AA. Tendo como base a sequência do CD133, foram identificados 8 potenciais sítios de N-glicosilação (vide Figuras 7 e 8) (WU e WU 2009; FERRANDINA et al. 2009b).



Fonte: Adaptado de FERRANDINA et al. (2009b)

Figura 7 - Caracterização da estrutura gênica do *CD133* em humanos (o número de aminoácido de cada domínio está representado na figura, sendo que E=extracelular, T=transmembrana e I=intracelular)



Fonte: Adaptado de FERRANDINA et al. (2009b)

Figura 8 - Caracterização da estrutura molecular do CD33 (os domínios extracelulares estão representados em laranja, os intracelulares em azul e os domínios transmembrana em violeta; os sítios de N-glicosilação estão representados em preto)

O gene em humanos que codifica para o CD133, *PROM1*, possui uma cópia única, é conservado através do reino animal e localiza-se no cromossomo 4 (4p15.33). Compreende 37 éxons (aproximadamente 160 kb) e produz um transcrito de mais ou menos 4.4kb. O processo de transcrição do CD133 é controlado por meio de 5 promotores alternativos tecido-específicos, culminando na formação de diferentes isoformas de mRNA e, posteriormente, em variantes da glicoproteína que diferem entre si em seus domínios C-terminais citoplasmáticos. Transcritos do gene *PROM1* têm sido detectados em diversas linhagens celulares e tecidos adultos, enquanto que a proteína CD133 é expressa em células progenitoras ou indiferenciadas provindas de distintos órgãos, assim como em tecidos neoplásicos (FERRANDINA et al. 2009b; WU e WU 2009).

A função biológica do CD133 ainda permanece desconhecida. No

entanto, diversas evidências têm sido reportadas sugerindo um provável papel na regulação da topologia da membrana plasmática. De fato, o CD133 é uma proteína que se liga ao colesterol e está associada aos chamados microdomínios da membrana, os quais representam áreas ricas em esfingolipídeos e que estão envolvidas nas cascatas de sinalização. De um modo interessante, nas células hematopoiéticas progenitoras migratórias CD133⁺/CD44⁺ que exibem uma morfologia polarizada, o CD133, juntamente com o CD44 e outras moléculas de adesão, parecem estar concentrados nas protrusões da membrana plasmática, sustentando, portanto, o envolvimento do CD133 no processo de migração celular. Já foi reportado que em fluidos biológicos, tais como urina, sêmen, fluido do tubo neural e saliva, o CD133 está associado a pequenas partículas da membrana, denominadas prominossomos. O papel de tais partículas é ainda desconhecido, no entanto, foi proposto que estas representariam microdomínios ricos em CD133 e necessários para a manutenção das propriedades das CT, cuja perda, através da divisão assimétrica, pode contribuir para o processo de diferenciação celular. Portanto, a polarização do CD133 pode ter uma função nos processos de divisão assimétrica e simétrica. Alternativamente, os prominossomos poderiam também estar envolvidos nas interações célula-célula que afetam a polaridade e a migração (FERRANDINA et al. 2009b).

Usado sozinho ou em conjunto com outros marcadores moleculares, atualmente o CD133 tem sido utilizado para a identificação de CT em diversos tecidos. As CTT geralmente também são caracterizadas pelo

aumento da expressão dessa glicoproteína. Trabalhos recentes revelaram que o CD133 é expresso em diversos tipos de tumores, incluindo câncer de pulmão, cólon, pâncreas, glioblastoma, ovário e próstata. (SALNIKOV et al. 2010; PELLACANI et al. 2011).

Dentre as vias de sinalização mais frequentemente citadas como potencialmente envolvidas no processo de auto-renovação das CT e das CTT, estão a do Notch, a do Wnt e a do Hedgehog. É importante mencionar que todas as vias anteriormente citadas estão envolvidas no processo de proliferação e sobrevivência das células não neoplásicas, assim como estão aberrantemente ativadas nas células tumorais. Mais recentemente, através de estudos de CSC CD133⁺, tem-se começado a esclarecer os mecanismos envolvidos na expressão de tais vias de sinalização. Em razão da ligação bioquímica existente entre essas vias de sinalização, o CD133 e um comportamento celular mais agressivo, incluindo resistência à quimioterapia e radioterapia, diversos estudos têm se focado na correlação entre a expressão de CD133 e características clinico-patológicas de pacientes com câncer. Na maioria desses estudos, a alta expressão dessa glicoproteína tem sido associada a um prognóstico ruim (MAEDA et al. 2008; SONG et al. 2008; ZEPPERINICK et al. 2008; FERRANDINA et al. 2009b).

1.5.2 CD44

O CD44, também chamado de H-CAM, Pgp-1 e HUTCH-1, é uma glicoproteína transmembrana de cadeia única codificada por um gene de cópia única localizado no cromossomo 11 (11p13) em humanos e que

consiste de 20 éxons, com um tamanho aproximado de 60 kb. Os éxons 1-5 e 16-18 são constantes, enquanto que os éxons 6-15 (denominados v1-v10) e 19-20 são variáveis e inseridos através do processo de *splicing* alternativo. A isoforma mais comum, também chamada de hematopoiética ou padrão, CD44H ou CD44s (do inglês, *hematopoietic* e *standard*, respectivamente), é traduzida em um polipeptídeo de 85 a 95 kDa pelos éxons constantes e encontra-se presente na membrana da maioria das células dos vertebrados. Já as isoformas variantes do CD44, denominadas CD44v, são proteínas maiores resultantes do *splicing* alternativo dos éxons variáveis e estão implicadas no processo metastático. A expressão destas últimas é regulada por fatores específicos do ambiente e do tecido, sendo que vias oncogênicas, tais como a cascata Ras-MAPK, podem regular o processo de *splicing* alternativo durante a progressão do câncer. Ao contrário da isoforma CD44s, as isoformas CD44v são expressas somente em algumas células epiteliais, durante o desenvolvimento embrionário, no processo de maturação dos linfócitos e em diversos tipos de neoplasias. As proteínas CD44 variam de tamanho entre 85 a 230 kDa por 3 razões: primeiro, como já dito anteriormente, um considerável número de mRNAs é gerado através do *splicing* alternativo dos éxons variantes; segundo, tais proteínas sofrem vários graus de modificações pós-traducionais, tais como N- e O-glicosilações e o acoplamento de glicosaminoglicanas (GAG); e terceiro, as proteínas CD44 frequentemente sofrem um encurtamento *in vivo* devido à sua clivagem parcial por metaloproteases da matriz, sendo que tal efeito é mais evidente em cânceres (NAOR et al. 2008; ICZKOWSKI 2010;

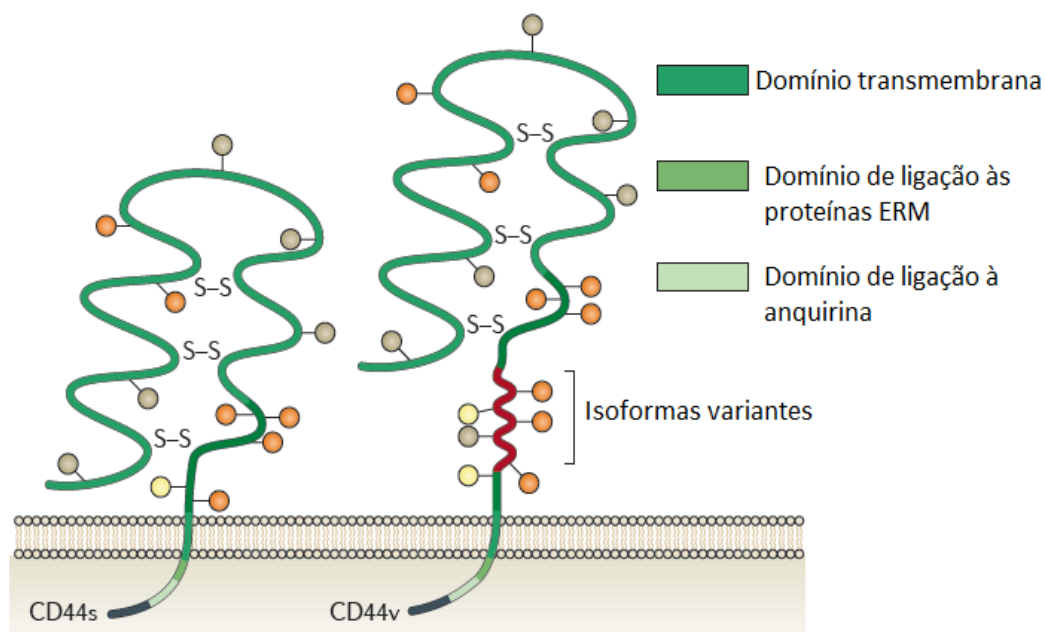
LOUDERBOUGH e SCHROEDER 2011; ZÖLLER 2011).

A estrutura gênica do *CD44* é composta por 3 regiões: domínio extracelular (compreendido pelos éxons 1-17), domínio transmembrana (compreendido pelo éxon 18) e cauda citoplasmática (compreendida pelos éxons 19 e 20) (vide Figura 9). O domínio N-terminal (extracelular) medeia a ligação do CD44 total (CD44s acrescido de suas variantes) ao seu principal ligante, a hialurona (HA), além das proteínas que compõem a matriz extracelular, tais como osteopontina, colágeno, fibronectina e laminina; o domínio transmembrana é o responsável pelo endereçamento dos linfócitos para os linfonodos, processo mais conhecido como *homing*; já o domínio carboxil citoplasmático é ancorado ao citoesqueleto de actina e às proteínas anquirina, ezrina, radixina e moesina (as 3 últimas são membros da família ERM), sendo importante não somente na migração celular do CD44, como também na transdução de sinais. (vide Figura 10) (NAOR et al. 2008; ICZKOWSKI 2010; LOUDERBOUGH e SCHROEDER 2011).



Fonte: Adaptado de LOUDERBOUGH e SCHROEDER (2011)

Figura 9 – Caracterização da estrutura gênica do *CD44* em humanos (o domínio extracelular, o domínio transmembrana e a cauda citoplasmática estão representados pelas letras E, T e C, respectivamente).



Fonte: Adaptado de ZÖLLER (2011)

Figura 10 – Caracterização da estrutura molecular do CD44 (os sítios de O-glicosilação, de N-glicosilação e o de acoplamento das glicosaminoglicanas estão representados como círculos laranjas, cinzas e amarelos, respectivamente; em vermelho encontra-se a região onde os produtos dos éxons variantes serão inseridos numa molécula de CD44v; S-S representa as pontes dissulfeto, que servem para estabilizar o domínio extracelular)

As proteínas CD44 regulam os processos de crescimento, migração, sobrevivência e diferenciação. Sendo assim, são propensas a estarem envolvidas na progressão tumoral e na metástase. O primeiro grande achado envolvendo o CD44 no processo metastático foi a identificação de uma isoforma variante em uma linhagem celular altamente metastática de câncer de pâncreas em ratos, feita por SEITER et al. em 1993. A partir desse trabalho, um número considerável de outros estudos avaliando a expressão das isoformas do CD44 em tumores de diferentes origens tem sido publicado, no entanto, com resultados conflitantes. De um modo geral,

o aumento da expressão das isoformas do CD44 tem sido correlacionado a um pior prognóstico em diversos cânceres, tais como câncer de mama e de estômago. No entanto, em tumores como o neuroblastoma e o CaP, ocorre justamente o contrário, ou seja, a agressividade tumoral está correlacionada a uma diminuição da expressão de CD44 (ORIAN-ROUSSEAU 2010).

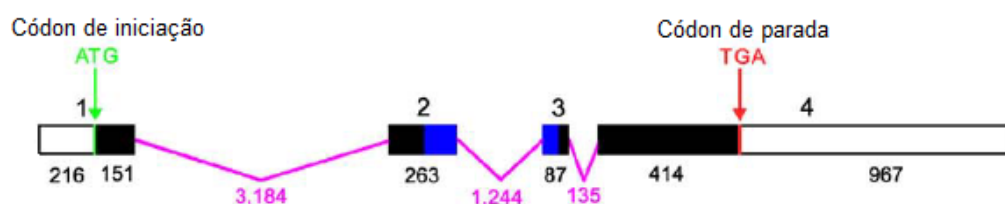
As características compartilhadas entre CT e CTT estão frequentemente ligadas a eventos secundários, tais como a transição epitélio-mesênquima, ou EMT (do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*), a migração e a resistência à apoptose, que estão associados ao CD44. Sendo a adesão celular indispensável ao desenvolvimento de organismos multicelulares, tal processo em CT, juntamente com a migração celular, é fundamental na embriogênese e no remodelamento tecidual, assim como também o deve ser nas CTT. O enriquecimento *in vitro* de CTT tem sido adquirido através de ensaios de crescimento celular sob a forma de esferas e da expressão de proteínas transportadoras ABC (do inglês, *ATP-binding cassette*). No entanto, nos últimos anos, a expressão de marcadores moleculares que se correlacionam às características de CTT tem sido utilizada para a identificação dessa subpopulação de células, sendo o CD44 o marcador de superfície celular mais frequentemente observado em CTT (ZÖLLER 2011).

1.5.3 NANOG

Em humanos, o gene *NANOG* localiza-se no cromossomo 12 (12p13.31) e pertence à família dos genes *homeobox*, sendo constituído por

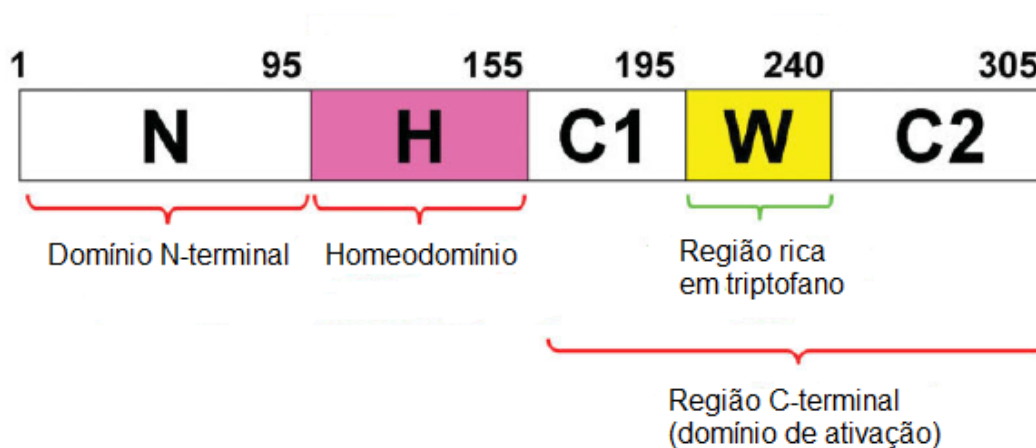
4 éxons (vide Figura 11). Codifica uma proteína de 305 AA composta por um domínio N-terminal, um homeodomínio conservado que liga-se ao DNA e uma região C-terminal composta por 2 domínios de transativação (vide Figura 12). BOOTH e HOLLAND em 2004 identificaram a existência de 11 pseudogenes, incluindo 10 pseudogenes processados (*NANOGP2* ao *NANOGP11*) e uma repetição em tandem (*NANOGP1*). Tais pseudogenes compartilham sequências homólogas à região codificadora do *NANOG*, no entanto, não são capazes de produzir proteínas funcionais, com exceção do *NANOGP8*, devido a mutações em regiões críticas. Os pseudogenes são normalmente considerados como genes não funcionais ou como fragmentos gênicos devido, justamente, à sua inabilidade de traduzir proteínas *full-length* funcionais (HART et al. 2004; SUO et al. 2005; ZHANG et al. 2006; AMBADY et al. 2010).

Fatores de transcrição precisam estar localizados no núcleo a fim de regular ativamente a transcrição. Foi demonstrado que o *NANOG*, em humanos, possui 2 sinais de localização nuclear, ou NLS (do inglês, *nuclear localization signal*), no homeodomínio, possibilitando a sua translocação para o núcleo. No entanto, mais recentemente, foi identificado um sinal de exportação nuclear, ou NES (do inglês, *nuclear export signal*), o que sugere um possível tráfego da referida proteína do núcleo para o citoplasma (AMBADY et al. 2010).



Fonte: Adaptado de BOOTH e HOLLAND (2004)

Figura 11 - Caracterização da estrutura gênica do *NANOG* em humanos (os 4 éxons estão representados por barras horizontais e numerados de 1 a 4; os íntrons estão em rosa; as terminações 5' e 3' não traduzidas estão em branco; as regiões codificadoras estão em preto, com o homeobox em azul; os tamanhos de cada íntron e éxon em nucleotídeos está descrito nos lugares correspondentes, assim como os códons de iniciação e de parada)



Fonte: Adaptado de CHANG et al. (2009)

Figura 12 - Caracterização da estrutura molecular do *NANOG* (o tamanho em aminoácido de cada região está descrito nos lugares correspondentes)

O *NANOG* foi inicialmente descrito como um fundamental fator de transcrição responsável pela identidade e auto-renovação das células-tronco embrionárias (CTE), seja por meio da ativação de repressores da diferenciação quanto através da supressão dos ativadores desse processo. Juntamente com *OCT4* e *SOX2*, forma uma rede central responsável pela

manutenção das características das CTE. O *NANOG* promove a expansão destas últimas em humanos e camundongos através da regulação do processo de auto-renovação, além de estar envolvido também na reprogramação de células diferenciadas para a obtenção das CT pluripotentes induzidas, ou iPS (do inglês, *induced pluripotent stem cells*). Uma diminuição na sua expressão induz a diferenciação; já o oposto provoca o estímulo da pluripotência. Tal proteína é expressa na massa celular interna do blastocisto e no epiblasto em sua fase de pós-implantação, além de ser detectável em células germinativas, seminomas, carcinomas embrionários e carcinomas *in situ*. Diversos estudos demonstraram que o *NANOG* também é expresso em outras neoplasias, tais como câncer de mama, cérvix, cavidade oral, rim e ovário, levantando a possibilidade dessa proteína exercer funções importantes na tumorigênese. Em um elegante estudo, BEN-PORATH et al. em 2008 identificaram um grupo de fatores de transcrição altamente, mas não exclusivamente, expresso em CTE e que apresentou uma maior expressão preferivelmente em tumores de alto grau. Nesse grupo estão incluídos *NANOG*, *SOX2*, *OCT4* e *C-MYC*. Segundo os autores, o grau de diferenciação tumoral seria determinado, em partes, pela atividade conjunta de tais fatores de transcrição, o que contribuiria para um comportamento tumoral mais agressivo (ZHANG et al. 2006; JETER et al. 2009; SILVA et al. 2009; ZBINDEN et al. 2010; NETTERSHEIM et al. 2011).

Uma via de sinalização importante implicada no controle do crescimento e manutenção das características de CT das células tumorais do glioblastoma multiforme é a Hedgehog-Gli (ou HH-Gli). De uma forma

interessante, foi demonstrado que tal via é responsável também pela regulação de diversos genes relacionados às CT, dentre eles o NANOG. Em um elegante estudo, ZBINDEN et al. (2010) demonstraram que os níveis normais de expressão de NANOG e de GLI1 são dependentes entre si. Os mesmos autores descobriram que o NANOG é essencial para a geração de respostas à via HH-GLI, sendo, portanto, um importante efetor de GLI1. Como conclusão, NANOG e GLI1 formam um módulo positivo funcionalmente relevante, uma vez que seus níveis de expressão regulam o comportamento das CT e o crescimento tumoral. Curiosamente, foi demonstrado que p53, uma importante proteína supressora tumoral, regula negativamente o módulo positivo formado por NANOG e GLI1 (ZBINDEN et al. 2010).

Estudos recentes têm evidenciado o NANOG como um fator de mau prognóstico. Em câncer colorretal, MENG et al. (2010) demonstraram que NANOG possui uma função na progressão das células tumorais, promovendo a proliferação, invasão e a motilidade das mesmas, além de participar do processo de EMT durante a progressão da doença. Em 2010, CHIOU et al. demonstraram que a coexpressão de OCT4 e NANOG induz um aumento nas propriedades das CT, provocando o estímulo ao processo de EMT e promovendo a tumorigênese e a metástase em câncer de pulmão. LIN et al. (2012) demonstraram que a expressão de NANOG se correlacionou a um estágio clínico mais avançado em pacientes com adenocarcinoma gástrico. Por último, YIN et al. (2012) demonstraram que a coexpressão de NANOG e OCT4 em carcinoma hepatocelular está

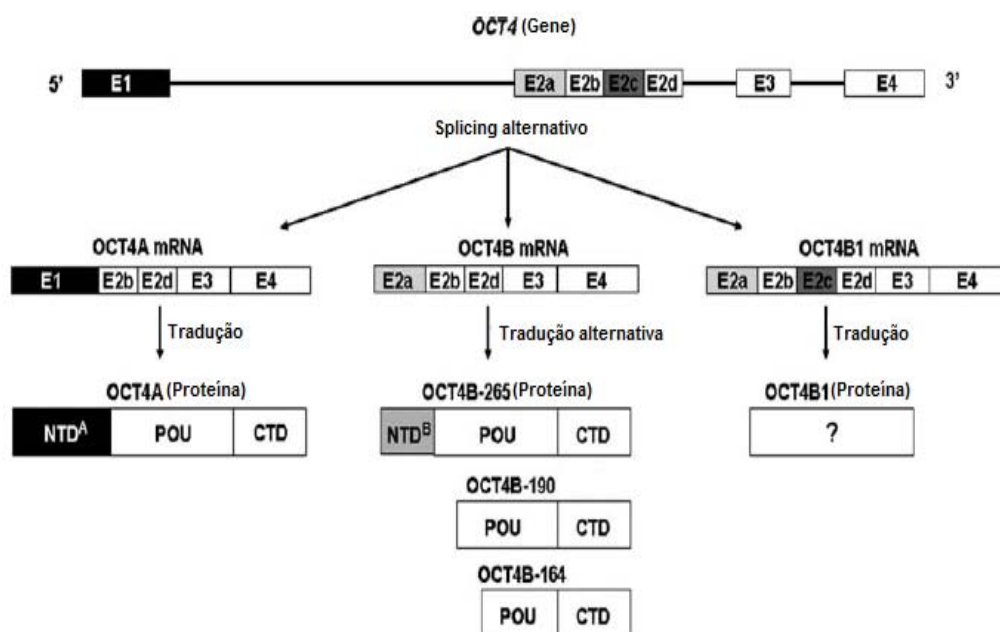
relacionada a um comportamento tumoral mais agressivo, predizendo uma pior evolução clínica dos pacientes.

1.5.4 OCT4

O *OCT4*, também conhecido como *POU5F1*, *OCT3/4*, *OCT3*, *OTF3* ou *OTF4*, é um fator de transcrição vital no processo de auto-renovação das CTE e sua posterior diferenciação em linhagens específicas. Em humanos, localiza-se no cromossomo 6 (6p21.3) e é capaz de gerar 2 isoformas principais através do processo de *splicing* alternativo, OCT4A e OCT4B. OCT4B1 consiste na nova variante do gene *OCT4*, descoberta por ATLASI et al. (2008). Os 3 transcritos variantes do *OCT4* diferem entre si no domínio N-terminal, sendo idênticos no domínio C-terminal. O transcrito do OCT4A é formado pelos éxons 1, 2b, 2d, 3 e 4, sendo que o éxon 1 é a região exclusiva dessa variante (vide Figura 13). Em contraste, o transcrito do OCT4B é truncado, com a ausência do éxon 1 e a presença especial do éxon 2a (vide Figura 13). O transcrito do OCT4B1 é quase idêntico ao do OCT4B, com o acréscimo do éxon 2c (vide Figura 13). O gene *OCT4* é considerado como sendo composto por 5 éxons, no entanto, os éxons 2a, 2b, 2c e 2d resultam em um único éxon 2, no qual existem inúmeros sítios de *splicing* alternativo. Sendo assim, seria mais preciso dizer que o *OCT4* é composto por 4 éxons (vide Figura 13) (WANG e DAI 2010).

O mRNA do OCT4A é traduzido na proteína OCT4A (360 AA e 45 kDa); já o mRNA do OCT4B é capaz de gerar 3 variantes proteicas através de um processo alternativo de tradução: OCT4B-265 (265 AA e 35k Da),

OCT4B-190 (190 AA e 23 kDa) e OCT4B-164 (164 AA e 20 kDa). O mRNA de OCT4B1 possui um éxon críptico, que contém um códon de parada TGA. Por esse motivo, espera-se que essa isoforma gere um peptídeo truncado. No entanto, ainda sabe-se muito pouco a respeito do produto proteico gerado pelo OCT4B1. Conforme demonstrado por GAO et al. (2010), o mRNA do OCT4B1 pode se transformar no mRNA do OCT4B através de *splicing* alternativo, possibilitando, portanto, a produção das 3 variantes proteicas geradas pelo último, OCT4B-265, OCT4B-190 e OCT4B-164. Funcionalmente e estruturalmente, as 3 isoformas do *OCT4* são divididas em um domínio transcricional de ativação N-terminal, um domínio central POU (PIT-OCT-UNC) e um domínio de transativação C-terminal, sendo este último específico para cada tipo celular (vide Figura 13) (WANG e DAI 2010).



Fonte: Adaptado de WANG e DAI (2010)

Figura 13 - Estrutura esquemática do gene *OCT4* em humanos (o *OCT4* é capaz de gerar 3 transcritos e 4 isoformas proteicas; as regiões diferentes estão indicadas em cinza claro e em cinza escuro, já as regiões idênticas estão em branco; NTD=domínio terminal/ POU=domínio POU de ligação ao DNA/ CTD=domínio C-terminal)

A concentração de OCT4 em uma célula necessita de um controle rigoroso a fim de permitir a auto-renovação das CTE, pois até um aumento de 2 vezes é capaz de induzir a diferenciação em mesoderme e endoderme primitivas, e uma queda de 50% nos níveis de OCT4 provoca a diferenciação em trofectoderme. Embora não haja um conhecimento sólido a respeito de como os níveis de OCT4 são precisamente controlados nas CTE, possivelmente há um mecanismo altamente sensível capaz de detectar os níveis proteicos de OCT4, enviando sinais supressores ao

aumento de sua expressão como uma primeira etapa num *feedback* negativo. A importância de OCT4 para a pluripotencialidade foi evidenciada com o advento da tecnologia das iPS. Dentre as várias combinações de fatores de transcrição necessários para a geração dessas células, o OCT4 é o único fator exógeno a ser obrigatoriamente requisitado. A maioria dos protocolos de iPS não necessita de NANOG exógeno, uma vez que o OCT4 e outros fatores introduzidos são capazes de ativar a sua expressão. SOX2 exógeno também pode ser omitido caso as células-alvo já expressem essa proteína, tais como as CT neurais (KELLNER e KIKYO 2010).

Baseado em achados recentes, OCT4A é a variante central responsável pelas propriedades das CT em células pluripotentes. É essencialmente encontrada no núcleo do zigoto, mórula, massa interna celular do blastocisto, CTE, células de carcinoma embrionário, CTT, células germinativas e em tumores de células germinativas. De uma maneira diferente, a isoforma OCT4B localiza-se principalmente no citoplasma das células somáticas, linhagens celulares e tumores primários, não sendo capaz de manter a capacidade de auto-renovação das CTE. WANG X et al. (2009b) sugeriram que o OCT4B-190 pode estar envolvido na resposta ao choque térmico; já GAO et al. em 2012 demonstraram um aumento na expressão de OCT4B-265 sob estresse genotóxico em CT, sugerindo que essa proteína possa funcionar na resposta a esse tipo de estresse celular através da via de sinalização do p53. OCT4B1 é amplamente expresso em células humanas pluripotentes e não-pluripotentes. Similarmente ao OCT4A, ocorre uma diminuição da sua expressão em células diferenciadas, fazendo

com que o OCT4B1 seja considerado um possível marcador de características intrínsecas às CT. No entanto, sua função ainda permanece incerta (FARASHAHI YAZD et al. 2011).

O OCT4 tem sido associado à via de sinalização Wnt/ β -catenina, envolvida virtualmente em todos os aspectos do desenvolvimento embrionário e considerada uma das primeiras vias necessárias à formação dos eixos embrionários iniciais. A via Wnt/ β -catenina possui inúmeras funções na biologia das CT, no desenvolvimento normal e nas doenças, sendo que diversos trabalhos demonstraram que sua ativação promove a manutenção da pluripotencialidade das CTE em condições favoráveis à diferenciação, enquanto que outros estudos relataram que essa via controla a diferenciação das CTE e a diferenciação terminal das células pós-mitóticas. ABU-REMAILEH et al. em 2010 demonstraram que, em CTE, o OCT4 previne o acúmulo excessivo de β -catenina, mantendo os níveis relativamente baixos desta última no núcleo, o que é compatível com a proliferação e a pluripotencialidade. Nesse contexto, o OCT4 protegeria as células de sinais externos de diferenciação que poderiam direcionar as células prematuramente a um destino errôneo. Em um trabalho recente de 2012, DAVIDSON et al. também corroboram um modelo através do qual a via Wnt/ β -catenina é reprimida pela expressão de OCT4 no contexto da auto-renovação das CTE humanas, ocorrendo o inverso quando tais células se diferenciam (ABU-REMAILEH et al. 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, através da IHQ, a expressão de marcadores de CT em CaP e correlacionar os achados com variáveis anátomopatológicas dos espécimes cirúrgicos e com o PSA pré-operatório.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, através da IHQ, a expressão dos marcadores de CT em CaP: CD133, CD44, NANOG e OCT4.

Correlacionar os resultados obtidos na IHQ aos fatores prognósticos bem conhecidos no CaP, tais como PSA pré-operatório, escore de Gleason, estágio TNM, presença ou ausência de invasões angiolinfática e da vesícula seminal, de extensão extraprostática, de margem cirúrgica positiva e de linfonodos positivos.

Correlacionar os resultados obtidos na IHQ com o tempo de sobrevida livre de recidiva bioquímica (SLRB) dos pacientes.

Validar a especificidade dos anticorpos para as diferentes isoformas do OCT4, OCT4A e OCT4B, através das técnicas de western-blot e imunofluorescência, aplicadas à linhagem celular humana de CaP DU-145.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES E ESPÉCIMES ANATOMOPATOLÓGICOS

Amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina de pacientes diagnosticados com CaP provindos do Hospital do Câncer A. C. Camargo foram incluídas no presente estudo após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da mesma instituição, sob o número de processo 1473/10. Todos os pacientes em questão foram submetidos à prostatectomia radical e o material biológico foi colhido previamente ao tratamento hormonal ou radioterápico. Em razão de ser um estudo retrospectivo, não foi necessária a elaboração de um termo de consentimento aos pacientes. A confirmação diagnóstica foi feita pela coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e os blocos de parafina correspondentes foram resgatados para a confecção de um microarranjo de tecido, ou TMA (do inglês, *tissue microarray*), contendo 193 amostras de adenocarcinomas prostáticos diagnosticados entre 1991 e 2009 no Hospital do Câncer A. C. Camargo. Foram incluídas no estudo amostras que exibiam disponibilidade de material biológico e dados bioquímicos e anatomopatológicos. Todos os adenocarcinoma prostáticos utilizados no estudo foram classificados de acordo com o escore de Gleason. A avaliação da extensão da doença nos pacientes foi feita através do sistema TNM de estadiamento (baseado no Manual de Estadiamento do Câncer da AJCC, 7ª Edição, 2010). Os estádios IIA e IIB foram considerados

como sendo II na análise estatística. Os seguintes dados bioquímicos e anátomopatológicos foram coletados dos prontuários dos pacientes: PSA pré-operatório, escore de Gleason (tal variável foi recategorizada em dois grupos: grupo 1 - pacientes com escore de Gleason 6(3+3) ou 7(3+4) e grupo 2 – pacientes com escore de Gleason entre 7(4+3) e 10), estágio TNM, presença ou ausência de invasões angiolinfática e da vesícula seminal, de extensão extraprostática, de margem cirúrgica positiva e de linfonodos positivos.

3.2 A CONSTRUÇÃO DO MICROARRANJO DE TECIDO

Áreas representativas dos tumores foram selecionadas em lâminas coradas por H&E para a confecção de um TMA. As áreas tumorais selecionadas foram retiradas do bloco doador e adicionadas ao bloco receptor com auxílio do Manual Tissue Arrayer 1 (Beecher Instruments Micro-array technology, Silver Spring, USA). Foram utilizados dois fragmentos de cada amostra, compreendendo regiões diferentes do tumor e depositadas de forma coordenada no bloco receptor. Os fragmentos tumorais de 1,0 mm foram arranjados em duplicata e com espaço de 0,2 mm entre as amostras. Os cortes seriados do bloco do TMA foram depositados em lâminas silanizadas (Starfrost®) recobertas com adesivo e submetidas à fixação por luz ultravioleta (Instrumedics Inc®, Hackensack, NJ). Posteriormente, as lâminas foram passadas por um banho de parafina e

armazenadas à - 20°C no freezer, sendo posteriormente utilizadas para a IHQ.



Fonte: Adaptado de Microarray Station

Figura 14 - Esquema da construção de um microarranjo de tecido

3.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram realizados cortes de 4 µm de espessura postos em lâminas com carga elétrica (StarFrost®) e mantidas em estufa a 60°C overnight. As lâminas foram identificadas e desparafinadas em xilol (2 trocas de 10 minutos cada); então passadas em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%, 85% e 75%) e lavadas em água corrente por 5 minutos. A recuperação antigênica por calor foi realizada utilizando o equipamento PT-Link (DAKO, Carpinteria, CA, EUA) seguindo as recomendações de tempo e pH fornecidas pelo fabricante para cada marcador molecular. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram inseridas no Autostainer (DAKO, Carpinteria, CA, EUA) para a realização

automatizada das reações, à exceção das lâminas de TMA correspondentes aos anticorpos OCT4 e OCT4B. A peroxidase endógena foi bloqueada com reagente do mesmo fabricante por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com bloqueador de proteínas (DAKO, Carpinteria, CA, EUA) por 5 minutos, à temperatura ambiente, e em uma câmara úmida. Posteriormente, os mesmos foram incubados com cada anticorpo primário, por 90 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, incubados com o anticorpo secundário e com o polímero HRP (Flex Plus; DAKO, Carpinteria, CA, EUA) durante 30 minutos cada, também à temperatura ambiente. Após lavagem em solução salina tamponada com fosfatos, ou PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*), os cortes foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidina, ou DAB (DAKO, Carpinteria, CA, EUA), por 5 minutos e então lavados em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris por 2 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool e xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek Film®). As lâminas correspondentes aos anticorpos OCT4 e OCT4B, por estes serem produzidos em cabra e em rato, respectivamente, passaram por um processo de IHQ manual, com a utilização do sistema de detecção LSABTM (DAKO, Carpinteria, CA, EUA).

Como controle positivo para as reações de IHQ foram utilizados tecidos provindos de tonsila para o marcador CD44, de seminoma para os marcadores NANOG e OCT4 e de linfoma anaplásico de grandes células para o CD133. Como controle negativo, foram omitidos os respectivos anticorpos primários. As características de cada anticorpo primário utilizado,

bem como as respectivas titulações empregadas no presente trabalho, estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados na imuno-histoquímica

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição
CD133	Policlonal (rabbit)	Abcam	1/100
CD44	Monoclonal, F10-44-2 (mouse)	Novocastra	1/40
OCT4	Policlonal (goat)	R&D Systems	1/50
OCT4A	Monoclonal, C-10 (mouse)	Santa Cruz	1/25
OCT4B	Monoclonal (rat)	R&D Systems	1/25
NANOG	Monoclonal, 1E6C4 (mouse)	Cell Signaling	1/500

3.4 ANÁLISE DAS IMAGENS

Para a análise das lâminas de IHQ, estas foram digitalizadas no equipamento digitalizador de lâminas Aperio (Vista, CA, USA), e a intensidade de marcação das reações, bem como a contagem de células marcadas e o escore de positividade de cada caso (dependendo do marcador), foram analisados de forma automatizada pelo programa analisador de imagens Image Scope do Aperio (Vista, CA, USA). A positividade de cada marcador foi quantificada a fim de fazermos a comparação entre os padrões de marcação, localização e intensidade dentre as diferentes amostras do TMA. Foram aplicados algoritmos diferentes no processo de quantificação das marcações, dependendo do marcador. Para o CD133, NANOG, OCT4 e OCT4B foi usado o algoritmo para análise de marcação citoplasmática (*positive pixel count*); para o OCT4A foi usado o algoritmo nuclear; e, finalmente, para o CD44 foi usado o algoritmo de

membrana. Para cada amostra, o programa gerou uma variável numérica específica, que representou a positividade da marcação.

3.5 CULTURA DA LINHAGEM CELULAR HUMANA DE CÂNCER DE PRÓSTATA DU-145

A linhagem celular humana de CaP DU-145, derivada de metástase cerebral de CaP e tumorigênica quando injetada em camundongos imunodeficientes, foi obtida da ATCC (do inglês, *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) e mantida em meio DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com uma alta concentração de glicose, suplementado com 10% soro fetal bovino (LGC, São Paulo, SP, BR), 100 unidades/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2mM L-glutamina (Invitrogen, CA, USA), e 1.0 mM piruvato de sódio (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para observar a localização celular das isoformas de OCT4, foi feito um ensaio de imunofluorescência utilizando os três anticorpos para OCT4. A linhagem celular humana de CaP DU-145 foi fixada em solução recém preparada contendo 4% de paraformaldeído por 1 hora à temperatura de 4°C. Tais células foram, então, permeabilizadas com uma solução 0,25%

Triton X-100 (0,1% Tween-20 em PBS) por 30 minutos e bloqueadas em 1% BSA (do inglês, *bovine serum albumin*) e PBS por 30 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas nos respectivos anticorpos primários diluídos em solução de PBS contendo 1% BSA, por 12 horas à temperatura de 4°C (os anticorpos OCT4 e OCT4B foram utilizados em uma diluição de 10µg/ml; já o anticorpo OCT4A foi usado em uma diluição de 1/100). Após lavar 3 vezes com PBS, as células foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG, ou Alexa Fluor® 555 goat anti-rat IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo 10µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole) para corar o núcleo numa diluição de 1/200 em 1% BSA por 1 hora à temperatura ambiente. Por fim, as células DU-145 foram lavadas 3 vezes com PBS e visualizadas no microscópio confocal Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Thonwood, NY, USA). Para os controles negativos, todas as condições acima descritas foram mantidas, exceto que foram omitidos os respectivos anticorpos primários.

3.7 WESTERN-BLOT

Os três anticorpos para OCT4 utilizados no presente estudo foram validados através de western-blot. Resumidamente, as células DU-145 foram lisadas num tampão de lise contendo 10% SDS (do inglês, *sodium dodecyl sulfate*) e uma mistura de inibidores de protease (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). Após 10 minutos no gelo, as amostras

foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a fim de remover os restos celulares. Em seguida, os lisados celulares (20, 40 e 60 µg) foram corridos num gel SDS–PAGE composto por 10% poliacrilamida. Após a eletroforese, as respectivas proteínas foram eletrotransferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), sendo que a eficiência da transferência foi monitorada por meio do corante de Ponceau (0,5%). Posteriormente, as membranas foram incubadas no tampão de bloqueio contendo 10% BSA, 10 mM Tris–HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, e 0.1% Tween 20 por 2 horas à temperatura ambiente e, então, incubadas *overnight* à temperatura de 4°C com os respectivos anticorpos primários (os anticorpos OCT4 e OCT4B foram utilizados em uma diluição de 1/3000; já o anticorpo OCT4A foi utilizado em uma diluição de 1/2000). Após incubação com os anticorpos conjugados à peroxidase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a detecção foi realizada por meio de reagentes quimioluminescentes de alta performance (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste do Qui-Quadrado foi utilizado para avaliar a expressão dos marcadores de CT em relação às variáveis anátomopatológicas do espécime cirúrgico e ao PSA pré-operatório.

As curvas de SLRB foram construídas pelo método de Kaplan-Meier (a SLRB é baseada no aumento do PSA pós-operatório e definida como um nível de PSA pós-operatório > 0,2 ng/ml). A avaliação da associação das

variáveis anátomopatológicas do espécime cirúrgico, do PSA pré-operatório e da expressão dos marcadores de SC em relação à SLRB foi feita através do teste de Log-Rank.

A identificação dos fatores independentes relacionados à SLRB foi realizada através da regressão logística múltipla, ou modelo de Cox. As variáveis selecionadas para o estudo múltiplo foram as que atingiram significância estatística na análise univariada, bem como aquelas que atingiram valores de p menores ou iguais a 0,25. O resultado final foi obtido através da estratégia *stepwise forward selection*, na qual a variável de maior significância na análise univariada são acrescentadas, uma a uma e em ordem crescente, as outras variáveis.

O nível de significância foi definido como sendo acima de 0,05 e a análise estatística do presente estudo foi realizada por meio do software *Windows Statistical Package for Social Science (SPSS)*, versão 17.0 (EUA).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

A média da idade dos pacientes foi de 61 anos, variando de 46 a 74 anos. O valor da mediana do PSA pré-operatório foi de 8,6 ng/ml, sendo que a maioria dos pacientes (60,6%) possuía um PSA pré-operatório abaixo de 10ng/ml. 49,2% e 44,6% dos pacientes pertencia aos estádios TNM II e III, respectivamente, sendo que apenas uma pequena parcela (6,23%) possuía estágio TNM IV. A maioria dos pacientes caracterizou-se pela ausência de invasão angiolinfática (76,9%), extensão extraprostática (78,3%), margem cirúrgica positiva (78,4%), invasão da vesícula seminal (88,4%) e de linfonodos positivos (94,6%). A recidiva bioquímica aconteceu em 60,5% dos casos. A caracterização da casuística utilizada no presente trabalho encontra-se descrita na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização da casuística (variáveis bioquímicas e anátomopatológicas dos espécimes)

Características	n (%)
Idade (anos)	
< 50	11 (5,69)
50 - 70	160 (82,9)
>70	21 (11,4)
PSA pré-operatório (ng/ml)	
< 10	114 (60,6)
10 ≥ PSA < 20	50 (26,5)
≥ 20	24 (12,9)
Estádio TNM	
II	95 (49,2)
III	86 (44,6)
IV	8 (6,23)
Escore de Gleason	
6 (3+3)	102 (52,8)
7 (3+4)	46 (23,8)
7 (4+3)	19 (9,84)
8 - 10	26 (13,5)
Invasão angiolinfática	
Presença	44 (23,2)
Ausência	146 (76,9)
Extensão extraprostática	
Presença	41 (21,7)
Ausência	148 (78,3)
Margem cirúrgica positiva	
Presença	68 (21,6)
Ausência	122 (78,4)
Invasão da vesícula seminal	
Presença	22 (11,6)
Ausência	168 (88,4)
Linfonodos positivos	
Presença	10 (5,44)
Ausência	174 (94,6)
Recidiva bioquímica	
Presença	115 (60,5)
Ausência	75 (39,5)

4.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO

Nas reações de IHQ aplicadas às amostras dos pacientes com CaP, foi obtido somente marcação citoplasmática para os marcadores CD133, NANOG, OCT4 e OCT4B (vide Figuras 15A, 15E, 16C e 16E, respectivamente); já o CD44 apresentou marcação na membrana, sendo que em alguns casos também houve marcação fraca no citoplasma (vide Figura 15C). O anticorpo OCT4A marcou somente núcleo (vide Figura 16A). É importante mencionar que o anticorpo anti-CD44 utilizado no presente estudo é específico para a isoforma CD44s; já o anti-CD133 identifica um epítipo não-dependente de glicosilação, ao contrário do anticorpo anti-CD133 comumente usado nos trabalhos, o AC133, que reconhece um epítipo dependente de glicosilação, conforme já mencionando anteriormente. As medianas da positividade das expressões do CD133, CD44, NANOG, OCT4, OCT4A e OCT4B foram 3,5, 6,9, 6,9, 6,3, 2 e 0,05, respectivamente.

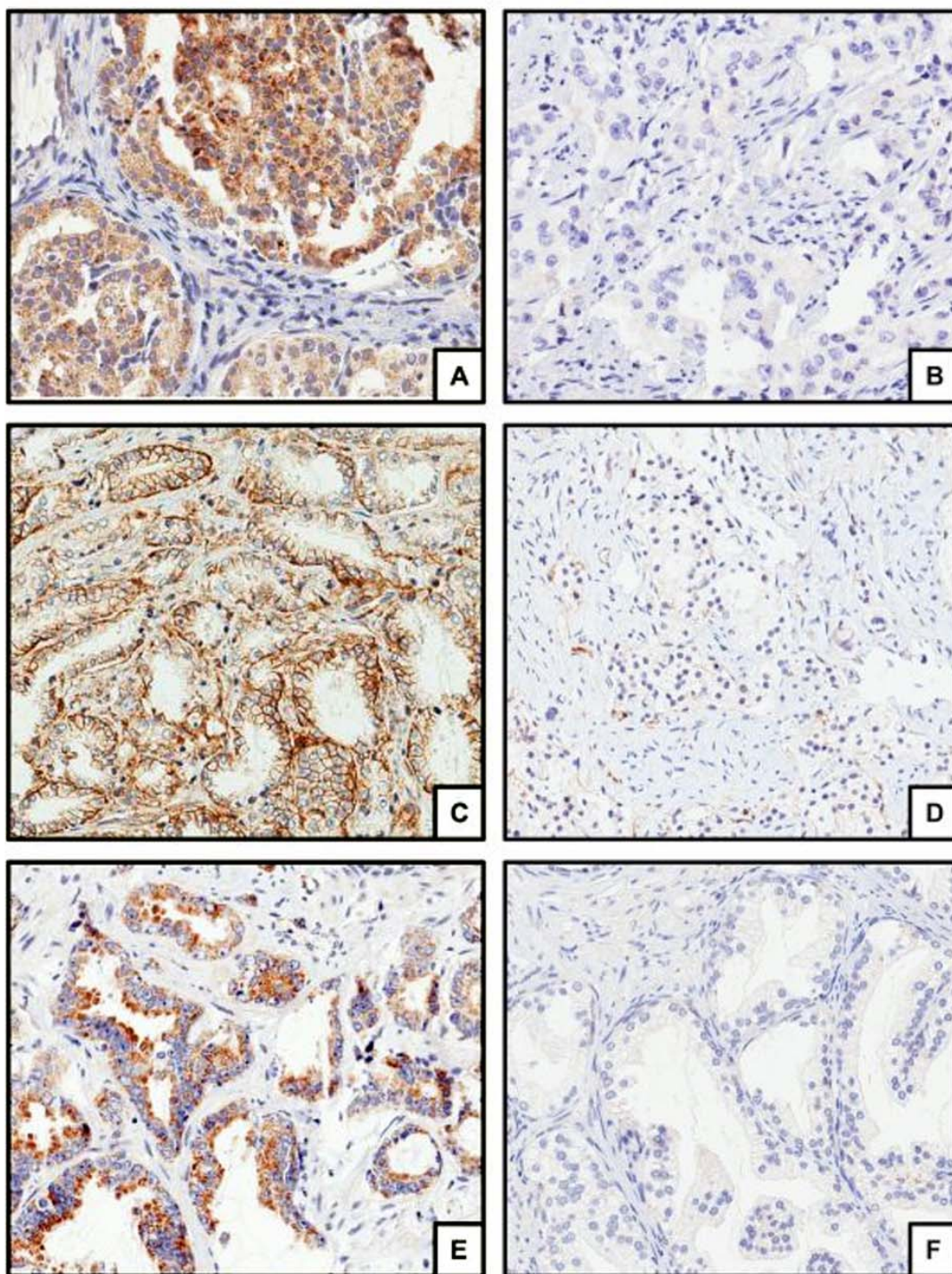


Figura 15 – Marcações imuno-histoquímicas positivas em amostras de pacientes com câncer de próstata para os anticorpos CD133 (A), CD44 (C) e NANOG (E) x suas respectivas marcações imuno-histoquímicas negativas (B, D, F e H) (aumento 200x)

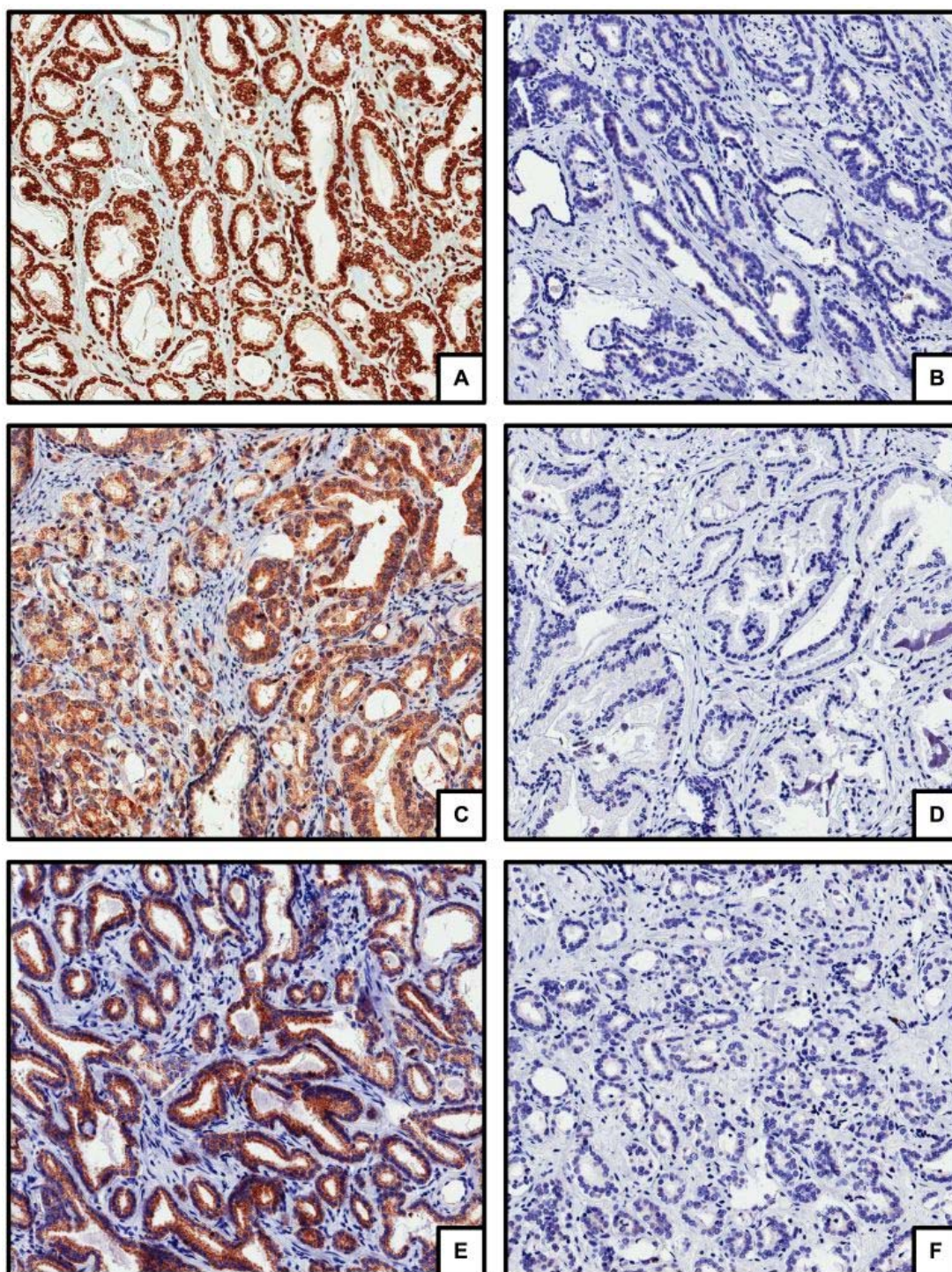


Figura 16 – Marcações imuno-histoquímicas positivas em amostras de pacientes com câncer de próstata para os anticorpos OCT4A (A), OCT4 (C) e OCT4B (E) x suas respectivas marcações imuno-histoquímicas negativas (B, D e F) (aumento 200x)

4.3 ASSOCIAÇÃO DAS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS DOS ESPÉCIMES E DO PSA PRÉ-OPERATÓRIO À EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO

As Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9 descrevem o resultado da análise das variáveis em relação às expressões dos marcadores CD133, CD44, NANOG, OCT4, OCT4A e OCT4B, respectivamente. Como podemos observar, não houve nenhuma correlação estatisticamente significativa.

Tabela 4 - Expressão do CD133 em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório

Variáveis	Categoria	Positividade		p
		n (%)	n (%)	
		< 3,5**	≥ 3,5**	
PSA pré-operatório (ng/ml)	< 8,6*	43 (46,23)	50 (52,08)	0,422
	≥ 8,6*	50 (53,77)	46 (47,92)	
Estádio TNM	II	50 (53,19)	45 (47,36)	0,423
	III e IV	44 (46,81)	50 (52,64)	
Escore de Gleason	6(3+3) e 7(3+4)	73 (76,04)	75 (77,31)	0,834
	7(4+3) até 10	23 (23,96)	22 (22,69)	
Invasão angiolinfática	Ausência	75 (78,94)	71 (74,73)	0,670
	Presença	20 (21,06)	24 (25,27)	
Extensão extraprostática	Ausência	74 (77,89)	74 (78,72)	0,717
	Presença	21 (22,11)	20 (21,28)	
Margem cirúrgica positiva	Ausência	62 (65,26)	60 (63,15)	0,811
	Presença	33 (34,74)	35 (36,85)	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	85 (89,47)	83 (88,29)	0,650
	Presença	10 (10,53)	12 (11,71)	
Linfonodo positivo	Ausência	85 (95,5)	89 (93,68)	0,322
	Presença	4 (4,5)	6 (6,32)	

* Mediana do PSA pré-operatório/ ** Mediana da positividade

Tabela 5 - Expressão do CD44 em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório

Variáveis	Categoria	Positividade		p
		n (%)	n (%)	
		< 6,9**	≥ 6,9**	
PSA pré-operatório (ng/ml)	< 8,6*	49 (53,26)	44 (45,36)	0,278
	≥ 8,6*	43 (46,74)	53 (54,64)	
Estádio TNM	II	48 (51,61)	47 (48,95)	0,715
	III e IV	45 (48,39)	49 (51,05)	
Escore de Gleason	6(3+3) e 7(3+4)	72 (75)	76 (78,35)	0,582
	7(4+3) até 10	24 (25)	21 (21,65)	
Invasão angiolinfática	Ausência	75 (79,78)	71 (73,95)	0,534
	Presença	19 (20,22)	25 (26,05)	
Extensão extraprostática	Ausência	69 (73,4)	79 (83,15)	0,264
	Presença	25 (26,6)	16 (16,85)	
Margem cirúrgica positiva	Ausência	58 (61,7)	64 (66,66)	0,651
	Presença	36 (38,3)	32 (33,34)	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	87 (92,55)	81 (84,37)	0,078
	Presença	7 (7,45)	15 (15,63)	
Linfonodo positivo	Ausência	85 (94,44)	89 (94,68)	0,662
	Presença	5 (5,56)	5 (5,32)	

* Mediana do PSA pré-operatório / **

Mediana da positividade

Tabela 6 - Expressão do NANOG em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório

Variáveis	Categoria	Positividade		p
		n (%)	n (%)	
		< 6,9**	≥ 6,9**	
PSA pré-operatório (ng/ml)	< 8,6*	42 (44,68)	51 (53,68)	0,216
	≥ 8,6*	52 (55,32)	44 (46,32)	
Estádio TNM	II	51 (53,68)	44 (46,8)	0,345
	III e IV	44 (46,32)	50 (53,2)	
Escore de Gleason	6(3+3) e 7(3+4)	74 (76,28)	74 (77,08)	0,896
	7(4+3) até 10	23 (23,72)	22 (22,92)	
Invasão angiolinfática	Ausência	75 (78,12)	71 (75,53)	0,768
	Presença	21 (21,88)	23 (24,47)	
Extensão extraprostática	Ausência	74 (77,08)	74 (79,56)	0,671
	Presença	22 (22,92)	19 (20,44)	
Margem cirúrgica positiva	Ausência	61 (63,54)	61 (64,89)	0,824
	Presença	35 (36,46)	33 (35,11)	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	85 (88,54)	83 (88,29)	0,958
	Presença	11 (11,46)	11 (11,71)	
Linfonodo positivo	Ausência	86 (95,55)	88 (93,61)	0,332
	Presença	4 (4,45)	6 (6,39)	

* Mediana do PSA pré-operatório / **

Mediana da positividade

Tabela 7 - Expressão do OCT4 em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório

Variáveis	Categoria	Positividade		p
		n (%)	n (%)	
		< 6,3**	≥ 6,3**	
PSA pré-operatório (ng/ml)	< 8,6*	42 (44,21)	51 (54,25)	0,167
	≥ 8,6*	53 (55,79)	43 (45,75)	
Estádio TNM	II	49 (51,04)	46 (49,46)	0,828
	III e IV	47 (48,96)	47 (50,54)	
Escore de Gleason	6(3+3) e 7(3+4)	78 (80,41)	70 (72,91)	0,218
	7(4+3) até 10	19 (19,59)	26 (27,09)	
Invasão angiolinfática	Ausência	75 (78,12)	71 (75,53)	0,768
	Presença	21 (21,88)	23 (24,47)	
Extensão extraprostática	Ausência	76 (79,16)	72 (77,41)	0,691
	Presença	20 (20,84)	21 (22,59)	
Margem cirúrgica positiva	Ausência	65 (67,7)	57 (60,63)	0,501
	Presença	31 (32,3)	37 (39,37)	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	87 (90,62)	81 (86,17)	0,337
	Presença	9 (9,38)	13 (13,83)	
Linfonodo positivo	Ausência	86 (94,5)	88 (94,62)	0,678
	Presença	5 (5,5)	5 (5,38)	

* Mediana do PSA pré-operatório / **

Mediana da positividade

Tabela 8 - Expressão do OCT4A em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório

Variáveis	Categoria	Positividade		p
		n (%)	n (%)	
		< 2**	≥ 2**	
PSA pré-operatório (ng/ml)	< 8,6*	21 (43,75)	72 (51,06)	0,381
	≥ 8,6*	27 (56,25)	69 (48,94)	
Estádio TNM	II	28 (58,33)	67 (47,51)	0,196
	III e IV	20 (41,67)	74 (52,49)	
Escore de Gleason	6(3+3) e 7(3+4)	40 (81,63)	108 (75)	0,343
	7(4+3) até 10	9 (18,37)	36 (25)	
Invasão angiolinfática	Ausência	38 (79,16)	108 (76,05)	0,862
	Presença	10 (20,04)	34 (23,95)	
Extensão extraprostática	Ausência	39 (81,25)	109 (77,3)	0,857
	Presença	9 (18,75)	32 (22,7)	
Margem cirúrgica positiva	Ausência	35 (72,91)	87 (61,26)	0,331
	Presença	13 (27,09)	55 (38,74)	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	43 (89,58)	125 (88,02)	0,771
	Presença	5 (10,42)	17 (11,98)	
Linfonodo positivo	Ausência	44 (91,66)	130 (95,58)	0,079
	Presença	4 (8,34)	6 (4,42)	

* Mediana do PSA pré-operatório / **

Mediana da positividade

Tabela 9 - Expressão do OCT4B em relação às variáveis anátomopatológicas dos espécimes e ao PSA pré-operatório

Variáveis	Categoria	Positividade		p
		n (%)	n (%)	
		< 0,05**	≥ 0,05**	
PSA pré-operatório (ng/ml)	< 8,6*	33 (43,42)	60 (53,09)	0,192
	≥ 8,6*	43 (56,58)	53 (46,91)	
Estádio TNM	II	41 (53,24)	54 (48,21)	0,497
	III e IV	36 (46,76)	58 (51,79)	
Escore de Gleason	6(3+3) e 7(3+4)	64 (83,11)	84 (72,41)	0,085
	7(4+3) até 10	13 (16,89)	32 (27,59)	
Invasão angiolinfática	Ausência	61 (80,26)	85 (74,56)	0,641
	Presença	15 (19,74)	29 (25,44)	
Extensão extraprostática	Ausência	62 (81,57)	86 (76,1)	0,676
	Presença	14 (18,43)	27 (23,9)	
Margem cirúrgica positiva	Ausência	51 (67,1)	71 (62,28)	0,772
	Presença	25 (32,9)	43 (37,72)	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	69 (90,78)	99 (86,84)	0,405
	Presença	7 (9,22)	15 (13,16)	
Linfonodo positivo	Ausência	68 (94,44)	106 (94,64)	0,491
	Presença	4 (5,56)	6 (5,36)	

* Mediana do PSA pré-operatório / ** Mediana da positividade

4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

De acordo com a Figura 17, observa-se que o OCT4A encontra-se no núcleo, o OCT4B no citoplasma e o OCT4 encontra-se em ambos os compartimentos nas células DU-145 (vide Figuras 17A, 17B e 17C, respectivamente).

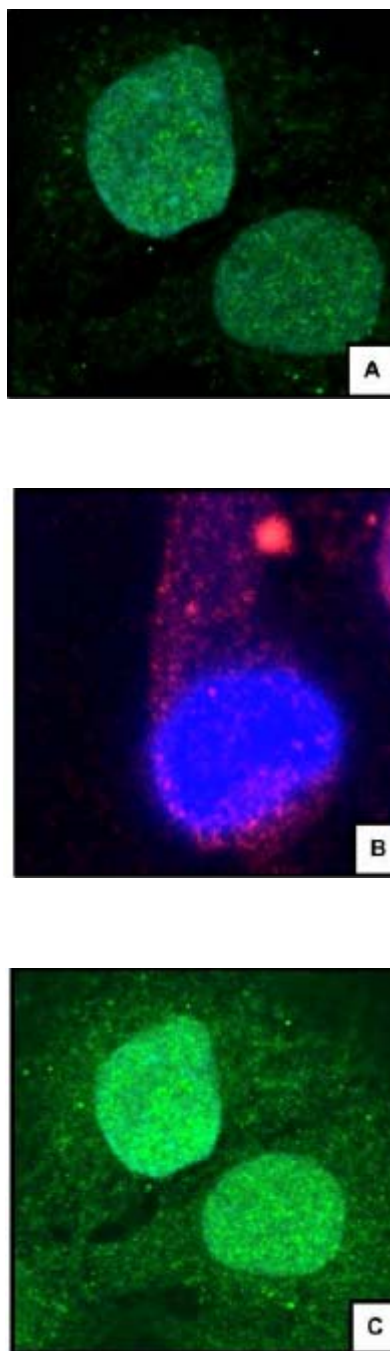


Figura 17 - Imunofluorescência dos anticorpos OCT4A (A), OCT4B (B) e OCT4 (C), demonstrando localização celular nuclear, citoplasmática e nuclear/citoplasmática nas células DU-145, respectivamente (aumento 1000x)

4.5 WESTERN-BLOT

Conforme os resultados do western-blot aplicado em células DU-145, foi obtida uma banda de aproximadamente 45 KDa para o OCT4A, uma banda de aproximadamente 33 kDa para o OCT4B e duas bandas, uma de 33 KDa e outra de 45 kDa, para o anticorpo OCT4. (vide Figuras 18A, 18B e 18C abaixo, respectivamente).

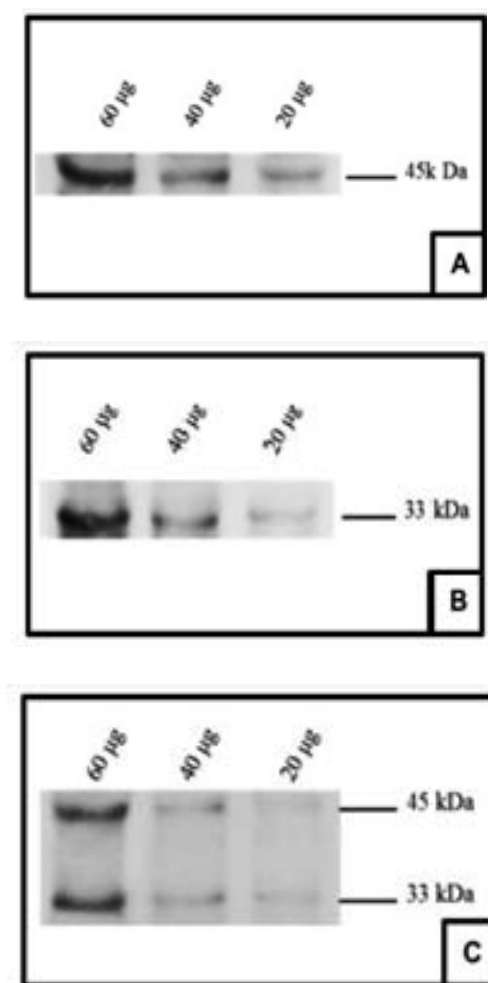


Figura 18 – Western-blot em células DU-145 dos anticorpos OCT4A (A), OCT4B (B) e OCT4 (C), demonstrando as bandas das respectivas proteínas

4.6 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO À SOBREVIDA LIVRE DE RECIDIVA BIOQUÍMICA

A média da SLRB foi de 37,5 meses, já a mediana foi de 30,49 meses, variando de 0,3 a 108,88 meses. Na análise univariada, pacientes com níveis de PSA pré-operatório maiores ou iguais à mediana do PSA pré-operatório (8,6 ng/ml; $p=0,007$), escore de Gleason mais avançado [7(4+3) até 10; $p=0,012$], estádios TNM III ou IV ($p<0,001$), margem cirúrgica positiva ($p=0,002$), linfonodos positivos ($p=0,003$), invasões da vesícula seminal ($p<0,001$) e angiolinfática ($p=0,019$) apresentaram uma menor SLRB (vide Tabela 10). A mediana de SLRB da casuística do presente estudo foi de 45,56 meses, variando de 0,3 a 108,9 meses.

As expressões de CD133, CD44 e NANOG em relação à SLRB não deram resultados estatisticamente significativos ($p=0,27$; $p=0,69$ e $p=0,15$, respectivamente; vide Tabela 11 e Figuras 19, 20 e 21). Somente as expressões dos marcadores OCT4, OCT4A e OCT4B se correlacionaram à SLRB com uma significância estatística (vide Tabela 11). De acordo com os resultados, pacientes que exibiram uma maior expressão de OCT4 e de OCT4B apresentaram um maior tempo de SLRB em relação aos pacientes que apresentaram uma menor expressão dessas proteínas ($p=0,03$ e $p=0,02$, respectivamente; vide Tabela 11 e Figuras 22 e 24), enquanto que os pacientes que obtiveram uma maior expressão de OCT4A apresentaram uma menor SLRB em relação aos pacientes que apresentaram uma menor

expressão da proteína ($p=0,04$; vide Tabela 11 e Figura 23). É importante mencionar que foi considerado como “maior expressão” valores iguais ou maiores do que a mediana da positividade da marcação obtida na IHQ; valores menores do que a mediana da positividade foram considerados como “menor expressão”.

Também foram avaliados os pacientes que expressaram OCT4A e não expressaram OCT4B ao mesmo tempo ($OCT4A^+OCT4B^-$) em comparação à SLRB dos pacientes que apresentaram outras combinações de marcação de OCT4A e OCT4B, sendo considerada uma marcação negativa aquela menor do que a mediana da positividade e marcação positiva como sendo aquela maior ou igual à mediana da positividade (vide Tabela 11 e Figura 25). O menor tempo de SLRB foi apresentado pelos pacientes do primeiro grupo ($p=0.001$).

Tabela 10 - Variáveis anátomopatológicas dos espécimes e PSA pré-operatório em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica

Marcador	Categoria	Mediana (meses)	p
PSA pré-operatório	< 8,6*	59,868	0,007
	≥ 8,6*	30,625	
Estádio TNM	II	60,428	< 0,001
	III	28,125	
	IV	6,184	
Escore de Gleason	6(3+3) e 7(3+4)	56,513	0,012
	7(4+3) até 10	23,98	
Invasão angiolinfática	Ausência	50,197	0,019
	Presença	17,237	
Extensão extraprostática	Ausência	46,776	0,808
	Presença	35,559	
Margem cirúrgica positiva	Ausência	56,579	0,002
	Presença	24,671	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	50,197	< 0,001
	Presença	11,678	
Linfonodo positivo	Ausência	47,73	0,003
	Presença	9,539	

* Mediana do PSA pré-operatório

Tabela 11 - Associação das expressões dos marcadores de células-tronco à sobrevida livre de recidiva bioquímica

Marcador	Categoria	Mediana (meses)	p
CD133	< 3,5*	39,539	0,270
	≥ 3,5*	57,467	
CD44	< 6,9*	46,941	0,690
	≥ 6,9*	44,737	
NANOG	< 6,9*	35,559	0,150
	≥ 6,9*	57,895	
OCT4	< 6,3*	30,658	0,030
	≥ 6,3*	57,895	
OCT4A	< 2*	63,849	0,040
	≥ 2*	40,164	
OCT4B	< 0,05*	30,658	0,020
	≥ 0,05*	57,895	
OCT4A e OCT4B	OCT4A positivo e OCT4B negativo**	24,77	0,001
	O resto	59,868	

* Mediana da positividade/ ***positivo" e "negativo" significam, respectivamente, < ou ≥ do que a mediana da positividade

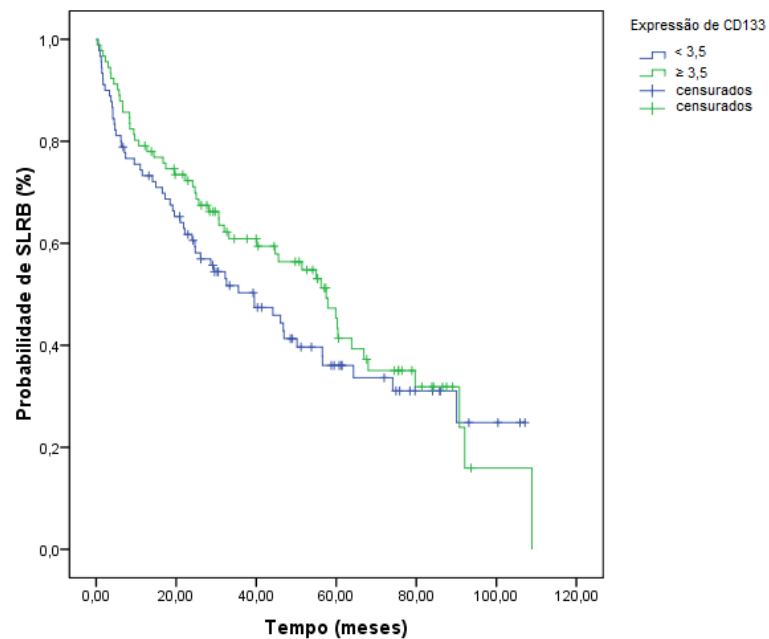


Figura 19 - Expressão de CD133 em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica

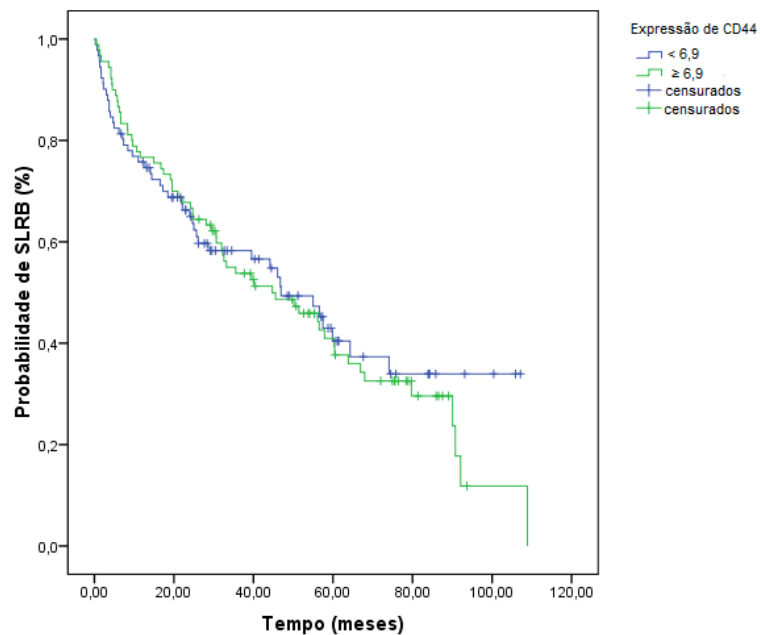


Figura 20 - Expressão de CD44 em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica

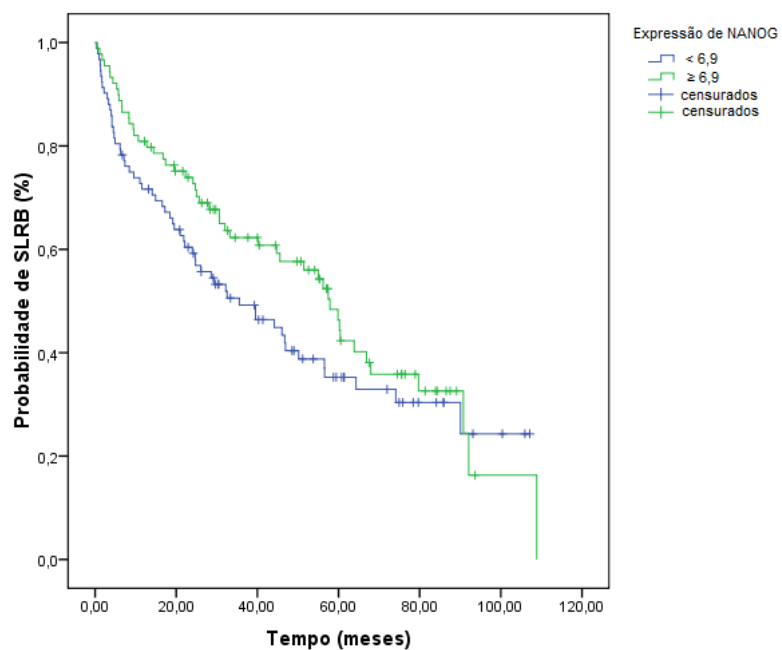


Figura 21 - Expressão de NANOG em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica

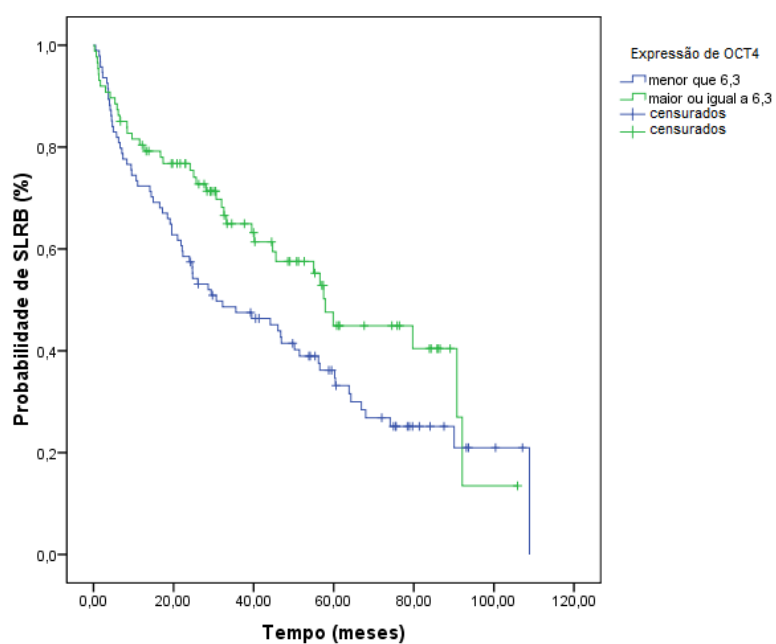


Figura 22 - Expressão de OCT4 em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica $\geq <$

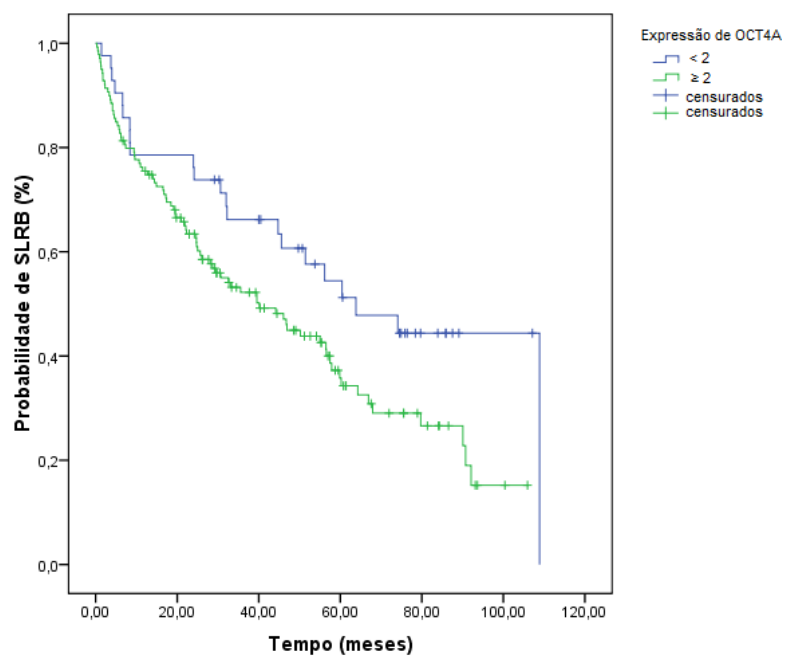


Figura 23 - Expressão de OCT4A em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica

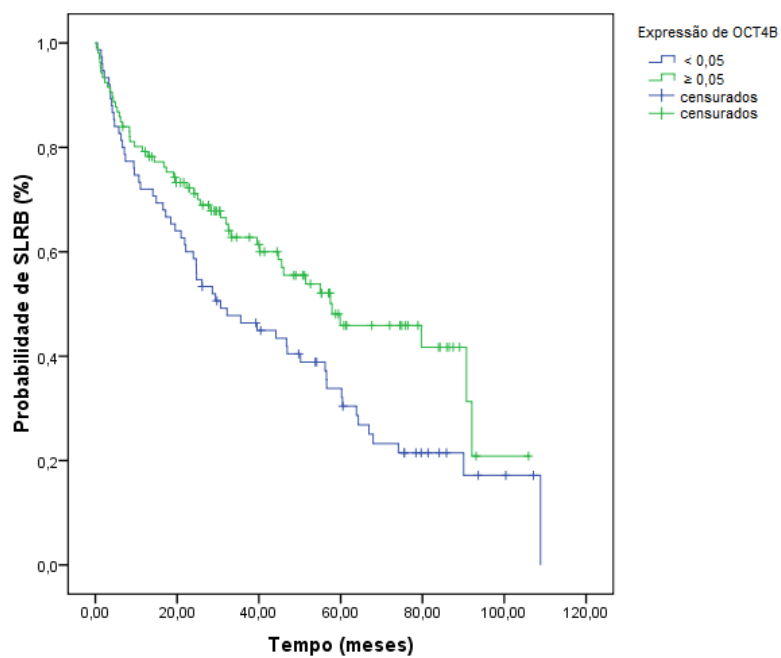


Figura 24 - Expressão de OCT4B em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica

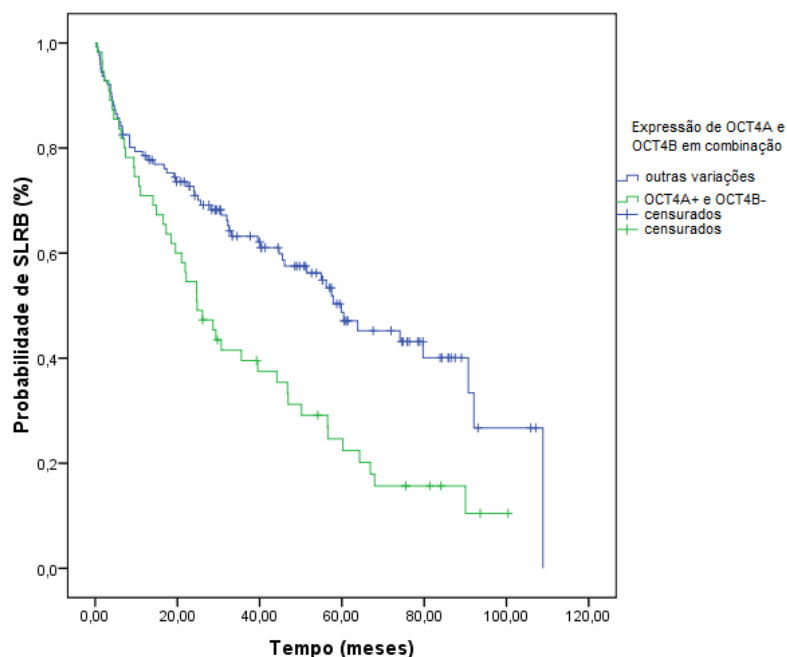


Figura 25 - Expressões combinadas de OCT4A e OCT4B em relação à sobrevida livre de recidiva bioquímica

4.7 ANÁLISE MULTIVARIADA PARA A SOBREVIDA LIVRE DE RECIDIVA BIOQUÍMICA

De acordo com a análise multivariada para a SLRB, a expressão do OCT4B se mostrou um fator prognóstico independente (o termo “presença da expressão” refere-se a valores iguais ou maiores do que a mediana da positividade da marcação obtida na IHQ), com um risco relativo (RR) de 0,568 quando comparado aos pacientes que não expressaram a mesma (o termo “ausência da expressão” refere-se a valores menores do que a mediana da positividade da marcação obtida na IHQ; $p=0,004$; IC 95%: 0,385 – 0,837; vide Tabela 12). Em outras palavras, pacientes que

expressaram OCT4B apresentaram uma maior SLRB. Juntamente com a expressão de OCT4B, a presença dos estádios TNM mais avançados III e IV (RR=1,747; $p=0,008$; IC 95%: 1,153 – 2,645) e a presença de invasão da vesícula seminal (RR=2,650; $p=0,001$; IC 95%: 1,489 – 4,716) também permaneceram como fatores prognósticos independentes (Tabela 12).

Tabela 12 - Análise multivariada para a sobrevida livre de recidiva bioquímica

Variáveis	Risco Relativo (RR)	Intervalo de Confiança (IC) de 95%	p
Expressão de OCT4B (presença)	0,568	0,385 – 0,837	0,004
Estádios TNM mais avançados (III e IV)	1,747	1,153 – 2,645	0,008
Invasão da vesícula seminal (presença)	2,650	1,489 – 4,716	0,001

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS

O aumento do escore de Gleason está diretamente relacionado a diversos aspectos histopatológicos da doença, tais como invasão do espaço linfovascular, tamanho do tumor, existência de margem cirúrgica positiva e estágio patológico, incluindo extensão extraprostática e metástase. O grau histológico da peça cirúrgica provinda da prostatectomia radical, incluindo o obtido pelo escore de Gleason, é um dos mais poderosos preditores de recidiva bioquímica após a cirurgia. Os padrões 4 e 5 são representativos de um maior risco para os pacientes. A presença de qualquer carcinoma de alto grau, inclusive sob a forma de um padrão terciário, compreendendo uma porcentagem ínfima do tumor, possui um impacto deletério nas taxas de cura do CaP. Pacientes com um escore de Gleason 7 apresentam uma evolução clínica intermediária em comparação aos pacientes que apresentam escore de Gleason até 6 e aqueles situados entre 8 e 10. ALENDÁ et al. em 2011 demonstraram que pacientes com um escore de Gleason 7(4+3) apresentaram um maior risco de recidiva bioquímica em comparação aos pacientes com um escore de Gleason 7(3+4), sendo o padrão primário 4 um fator prognóstico independente para a ocorrência da recidiva bioquímica, caracterizada pela elevação do PSA após a prostatectomia radical (HUMPHREY 2004).

As análises univariada e multivariada do presente trabalho corroboram a literatura em relação aos fatores prognósticos mais tradicionais para o CaP. Na análise univariada, pacientes com níveis de PSA pré-operatório maiores ou iguais à mediana do PSA pré-operatório (8,6 ng/ml; $p=0,007$), escore de Gleason mais avançado [7(4+3) até 10; $p=0,012$], estádios TNM III ou IV ($p<0,001$), margem cirúrgica positiva ($p=0,002$), linfonodos positivos ($p=0,003$), invasões da vesícula seminal ($p<0,001$) e angiolinfática ($p=0,019$) apresentaram uma menor SLRB. Na análise multivariada, a existência dos estádios TNM mais avançados III e IV (RR=1,747; $p=0,008$; IC 95%: 1,153 – 2,645) e de invasão da vesícula seminal (RR=2,650; $p=0,001$; IC 95%: 1,489 – 4,716) permaneceram como fatores prognósticos independentes em relação ao tempo de SLRB.

5.2 CD133, CD44 E NANOG

A expressão do CD133 tem sido associada a um prognóstico ruim em diversas neoplasias, como em câncer de pulmão (WOO et al. 2010), estômago (ZHAO et al. 2010), cólon (HORST et al. 2008; HORST et al. 2009), gliomas (BEIER et al. 2008; PALLINI et al. 2008; ZEPPERINICK et al. 2008; CHENG et al. 2009; PALLINI et al. 2011), neuroblastoma (TONG et al. 2008; SARTELET et al. 2012), mama (ZHAO et al. 2011), pâncreas (MAEDA et al. 2008), reto (SAIGUSA et al. 2009; YASUDA et al. 2009; KOJIMA et al. 2010; SAIGUSA et al. 2010) e carcinoma hepatocelular (SASAKI et al. 2010). Aparentemente contradizendo a maioria dos estudos na literatura, DA

COSTA et al. em (2011) demonstraram que pacientes com carcinoma das células renais que expressaram baixos níveis de CD133 apresentaram uma maior probabilidade de progressão da doença e de morte devido ao câncer. Por outro lado, há trabalhos nos quais o CD133 não apresentou nenhum valor prognóstico (KOJIMA et al. 2008; FERRANDINA et al. 2009a; SALNIKOV et al. 2010; THILL et al. 2011).

O CD133 é um dos marcadores mais importantes de CT hematopoiéticas e neurais, inclusive já foi utilizado na identificação de CT prostáticas nos trabalhos de RICHARDSON et al. (2004) e de MIKI et al. (2007). Pôde-se observar um considerável aumento na quantidade de trabalhos que utilizaram o CD133 como um marcador de CTT, dentre os quais podemos citar os estudos de TIRINO et al. (2009) em câncer de pulmão, TREROTOLA et al. (2010) em CaP e LEE HJ et al. (2011) em câncer de pâncreas. No entanto, SHMELKOV et al. (2008) levantaram uma grande preocupação em relação ao uso do CD133 como um marcador universal de CTT. Esses autores demonstraram que ambas as células metastáticas de câncer de cólon CD133⁺ e CD133⁻ geraram tumores em camundongos NOD/ SCID xenotransplantados, sendo que as últimas foram, inclusive, capazes de produzir tumores maiores.

No presente estudo, através da IHQ, foi observada somente marcação citoplasmática para o CD133. Apesar de diversos trabalhos demonstrarem que o CD133 encontra-se majoritariamente na membrana (KOJIMA et al. 2008; LI et al. 2009a; LIU et al. 2009; WANG Q et al. 2009) outros estudos reportaram também a presença de marcação citoplasmática

(SONG et al. 2008; ZHANG M et al. 2008; SASAKI et al. 2010; TAKAHASHI et al. 2010). Trabalhos recentes em carcinoma pancreático demonstraram que a marcação IHQ de membrana para o CD133 é característica de células bem orientadas, polarizadas e diferenciadas, enquanto que a marcação citoplasmática é encontrada em pequenas populações de células, o que sugere esse padrão de marcação em células tumorais como sendo um indicativo de potenciais CSC (TAKAHASHI et al. 2010).

O CD44 é uma molécula envolvida em diversos processos, tendo um papel importante na adesão célula-célula e célula-matriz, sinalização celular, *homing* dos linfócitos, inflamação, migração celular e metástase. Cerca de 30% do CaP sofre uma transição do fenótipo indolente para o agressivo; para que ocorra essa mudança, é necessário que haja uma alteração da expressão das glicoproteínas envolvidas na adesão celular, entre elas o CD44, permitindo, assim, que as células tumorais se desprendam, interajam com proteínas que digiram a matriz celular, migrem através da mesma e invadam os canais linfovasculares (ICZKOWSKI 2010).

A expressão do CD44 tem sido associada a um mau prognóstico em câncer de pulmão (KO et al. 2011), laringe (DE JONG et al. 2010), mama (BROWN et al. 2011; LEE HE et al. 2011; OLSSON et al. 2011), linfoma folicular (HIGASHI et al. 2009), estômago (WANG et al. 2011), câncer colorretal (HUH et al. 2009; HUANG et al. 2012), câncer do trato biliar (LEE et al. 2008), condrossarcoma (HEYSE et al. 2010) e carcinoma de células renais (ALTINEL et al. 2008). Em oposição, a perda da expressão do CD44 também tem sido associada à malignidade no câncer colorretal (LUGLI et al.

2010), no carcinoma das células escamosas da cavidade oral (MOSTAAN et al. 2011) e no carcinoma da tireoide (BÖHM et al. 2000).

Conforme já dito anteriormente, o CD44 apresenta-se sob a forma do CD44s, expresso ubiquamente, e de suas variantes, CD44v, produzidas por *splicing* alternativo (ao todo são 10 variantes). Na próstata normal, o CD44s é um marcador de células basais, o compartimento de CT do epitélio prostático. Estudos, tanto em nível proteico quanto em nível de mRNA, demonstraram que as células lumbais da próstata normal apresentam baixos níveis de CD44. De acordo com a literatura, há uma queda na expressão do CD44 (mRNA e proteína) a medida que ocorre a progressão do CaP. Essa queda na expressão de CD44 tem sido associada a tumores de alto grau, aneuploidia e metástase. LOU et al. em 1999 demonstraram que a hipermetilação do promotor do *CD44* estava envolvida na queda da expressão do CD44 durante a progressão do CaP para um fenótipo metastático. Corroborando esse estudo, KITO et al. em 2001 demonstraram uma correlação estatística entre o status de metilação do *CD44* e os estádios clínicos da doença, sugerindo um papel importante desse evento na progressão do CaP. GAO et al. em 1997 foram os primeiros a identificar o CD44 como um gene supressor de metástase no CaP. Curiosamente, SIMON et al. em 2009 demonstraram uma forte expressão de CD44s em carcinoma prostático neuroendócrino, uma variante rara do CaP que apresenta similaridades ao adenocarcinoma padrão de Gleason 5. Pelo fato do CD44s marcar as CT prostáticas (células basais), o carcinoma neuroendócrino pode originar-se a partir dessas células e o CD44 pode,

então, exercer uma função diferente da exercida nas células tumorais não-neuroendócrinas (KALLAKURY et al. 1996; DE MARZO et al. 1998; ICZKOWSKI 2010; YANG et al. 2010; KHAMIS et al. 2011).

Com base na literatura, aparentemente o CD44 exerce papéis biológicos distintos nos diversos tipos de órgãos e neoplasias. É bastante provável que o aumento da expressão de CD44 em tumores derivados de epitélios que normalmente não expressam essa molécula esteja associado a um fenótipo mais agressivo, com o CD44 promovendo o crescimento tumoral e a metástase. O epitélio prostático normal expressa essa molécula, portanto, a presença desta no CaP pode estar relacionada a um fenótipo menos maligno, com o CD44 atuando como uma molécula de adesão intercelular que promove a preservação da arquitetura das células, desfavorecendo o comportamento metastático do tumor (NOORDZIJ et al. 1997).

O NANOG, juntamente com o OCT4, são fatores de transcrição essenciais para a manutenção da auto-renovação e pluripotencialidade das CTE. A co-expressão destes somada a outros fatores é suficiente para a reprogramação dos fibroblastos humanos e de camundongos em células pluripotentes. PAN et al. em 2010 demonstraram que o NANOG é altamente expresso em cistoadenocarcinoma de ovário, correlacionando-se ao estágio clínico e grau patológico. NIRASAWA et al. em 2009 sugeriram que os níveis de mRNA do NANOG podem se constituir em uma nova ferramenta para o diagnóstico do câncer de pulmão, independente do estágio clínico. De acordo com JETER et al. em 2009, células que expressavam NANOG

encontraram-se em maior número no CaP em relação à próstata normal, sendo que o decréscimo da expressão dessa molécula inibiu a progressão do câncer nas células tumorais de próstata, mama e cólon. Esse elegante trabalho também demonstrou que o efeito inibitório da progressão tumoral provocado pelo decréscimo na expressão de NANOG associou-se à inibição da proliferação celular, à expansão clonal e ao crescimento clonogênico das células tumorais. Portanto, essa molécula expressa nas células neoplásicas possui uma função biológica na regulação do desenvolvimento tumoral. Em um estudo interessante, JETER et al. em 2011 demonstraram que o NANOG promoveu a aquisição de características de CTT (tais como a capacidade regenerativa tumoral e o aumento do crescimento clonal) e a progressão do CaP para o fenótipo resistente à castração androgênica. Num trabalho recente de 2012, GONG et al. demonstraram que o NANOG é altamente expresso nas CTT prostáticas, sugerindo a utilização dessa molécula como um marcador para isolar e identificar tais células em CaP.

A despeito dos resultados interessantes gerados pelos inúmeros trabalhos existentes na literatura em relação ao CD133, CD44 e ao NANOG, no presente estudo não se pôde observar nenhuma correlação estatisticamente significativa da expressão desses marcadores em relação às variáveis e ao tempo de SLRB. Tal fato pode ser devido a diversos fatores, tais como utilização de diferentes anticorpos e protocolos de IHQ, qualidade das amostras de tecido utilizadas, tamanho da casuística, diferenças no grau dos tumores e no estadiamento dos pacientes, a opção pelo uso de um TMA nas reações de IHQ ao invés de cortes totais e

diferenças nos sistemas adotados para a geração do escore da marcação IHQ.

5.3 OCT4

A maioria dos estudos tem se focado no OCT4A, que está associado às propriedades das CT. No entanto, conforme demonstrado por WANG X et al. (2009b) e GAO et al. (2012), o OCT4B merece a devida atenção pois a sua expressão foi associada às respostas a diversos tipos de estresse celular, tais como choque térmico e estresse genotóxico. A utilização de primers inespecíficos, de anticorpos e de outros reagentes não padronizados corretamente que são incapazes de diferenciar as distintas isoformas do OCT4 tem gerado uma confusão na literatura, chegando ao ponto de surgir questionamentos a respeito da validade dos resultados obtidos por inúmeros estudos que não levaram em consideração a distinção entre as isoformas do OCT4. Para evitar esse tipo de problema, foram utilizados no presente estudo os mesmos anticorpos monoclonais usados por KAROUBI et al. em 2010, que são capazes de fazer tal distinção (KAROUBI et al. 2010).

O anticorpo policlonal da R&D Systems (no presente trabalho referido como OCT4) reconhece a região C-terminal, idêntica nas 2 isoformas de OCT4, conforme já mencionado anteriormente, portanto, é capaz de reconhecer tanto OCT4A quanto OCT4B. O anticorpo monoclonal da Santa Cruz (no presente trabalho referido como OCT4A) reconhece os AA 1 – 134, localizados na região N-terminal de OCT4 e exclusivos da isoforma OCT4A,

portanto, reconhece esta isoforma apenas. Por último, o anticorpo monoclonal da R&D Systems (no presente trabalho referido como OCT4B) reconhece a isoforma contendo 265 AA do OCT4B, segundo especificações do fabricante. Conforme os resultados gerados através da imunofluorescência e do western-blot aplicados às células DU-145, a especificidade de tais anticorpos foi comprovada. Na imunofluorescência, o OCT4A apresentou uma localização celular nuclear, enquanto que o OCT4B encontrou-se majoritariamente no citoplasma; no caso do anticorpo OCT4, as 2 localizações celulares foram encontradas. Já no western-blot, uma banda proteica de 45 kDa foi gerada para o OCT4A, outra de 33 kDa correspondia ao OCT4B e 2 bandas, uma de 45 kDa e outra de 33 kDa, foram geradas no caso do anticorpo OCT4.

Semelhante ao trabalho de BAE et al. (2010), no presente estudo também foi identificada a expressão de OCT4A nos tecidos de adenocarcinoma prostático. SOTOMAYOR et al. em 2009 também detectaram a expressão de OCT4A em suas amostras de CaP, no entanto, somente numa rara população de células neuroendócrinas. Os estudos de MONSEF et al. (2009) e RIJLAARSDAM et al. (2011) demonstraram que somente a isoforma OCT4B é expressa no CaP. Desse modo, ainda há uma confusão na literatura a respeito da expressão de OCT4A nesse tipo de câncer. A IHQ em si possui limitações conhecidas, dentre as quais podemos citar a qualidade dos anticorpos, fixação inadequada do material em formalina, recuperação antigênica errônea e falta de padronização das reações. No caso do presente estudo, tais limitações foram reduzidas devido

a uma padronização das condições pré-analíticas. Tanto as reações de IHQ quanto a análise das imagens foram feitas de forma automatizada, à exceção das lâminas de TMA referentes aos anticorpos OCT4 e OCT4B, cuja IHQ foi feita manualmente por razões já anteriormente citadas.

Em relação ao *OCT4A*, 6 pseudogenes foram identificados, enquanto nenhum foi relatado no genoma humano para o OCT4B. Conforme demonstrado por SUO et al. em 2005, dos 6 pseudogenes existentes para o *OCT4A*, somente 2, *OCT4P1* e *OCT4P5*, respectivamente mapeados nas bandas cromossômicas 10q21 e 8q24, são transcritos nos cânceres. De acordo com esse trabalho, *OCT4P1* é transcrito somente nos tecidos neoplásicos, enquanto que o *OCT4P5* é transcrito tanto nestes quanto em linhagens celulares tumorais. Teoricamente, apenas *OCT4P1* pode gerar uma proteína, que é formada por 360 AA e possui 95% de similaridade à proteína OCT4A. Em razão disso, a detecção de OCT4A através da IHQ torna-se problemática, uma vez que ainda não há anticorpos no mercado que sejam capazes de distinguir entre essas 2 proteínas (PANAGOPOULOS et al 2008; WANG e DAI 2010).

A fim de distinguir entre OCT4A e OCT4P1, WANG e DAI em 2010 sugeriram uma reação de transcriptase reversa seguida de um PCR, ou RT-PCR (do inglês, *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), utilizando primers específicos para o *OCT4P1* e *OCT4A* (a fim de evitar a amplificação de falsos positivos), ou uma restrição enzimática. Uma das limitações do presente estudo foi que tais experimentos não foram realizados, portanto, não há como confirmar se a marcação IHQ gerada com o anticorpo

monoclonal da Santa Cruz foi devido à proteína OCT4A, OCT4P1 ou a ambas.

De acordo com PANAGOPOULOS et al. (2008), a proteína OCT4P1 apresenta similaridades em relação à proteína OCT4A: localiza-se no núcleo e ativa o processo de transcrição. A região desse pseudogene faz com que este seja um alvo atrativo às aberrações genéticas associadas a neoplasias (banda cromossômica 8q24.21, próxima ao SNP rs6983267, associada a um risco aumentado de desenvolver câncer colorretal e CaP). Por esse motivo, *OCT4P1* representa um potencial candidato a constituir um fator de risco para o desenvolvimento do CaP. A expressão desse pseudogene foi relatada em câncer de pulmão, tireóide, bexiga, esôfago, colo uterino e cólon, sendo ausente nas células provindas do músculo estriado, da pele normal e da cultura de fibroblastos, o que sugere a participação do *OCT4P1* no processo carcinogênico. Em um trabalho recente de 2010, KASTLER et al. demonstraram que o *OCT4P1* é superexpresso em CaP, constituindo o único membro da família do *OCT4* a ser expresso no carcinoma prostático, colocando em dúvida os trabalhos que relataram a expressão de OCT4A em CaP, inclusive o presente trabalho (PANAGOPOULOS et al. 2008).

A maioria dos estudos existentes na literatura referentes ao OCT4A sugere esse marcador como sendo de mau prognóstico. LINN et al. em 2010 hipotetizaram que a re-expressão de OCT4A nas células tumorais prostáticas representou uma função importante na carcinogênese, constituindo um possível mecanismo através do qual tais células adquiriram e mantiveram um fenótipo resistente a drogas no CaP. ZHANG J et al.

(2010) relataram que a expressão de OCT4A contribuiu à iniciação, promoção e progressão do carcinoma de ovário do tipo seroso. Em câncer de pulmão, ZHANG XY et al. (2010) demonstraram que os pacientes que expressaram OCT4 apresentaram uma taxa de mortalidade mais alta quando comparada a dos pacientes que não expressaram esse marcador. GUO et al. em 2011 sugeriram que certos fatores regulatórios e genes associados às CTE, como o OCT4, são ativados nos gliomas humanos, acelerando a progressão da doença.

Em oposição, MATSUOKA et al. (2012) associaram a expressão de OCT4A a um prognóstico bom em câncer gástrico. Esse grupo de pesquisadores utilizou um anticorpo policlonal que reconhecia a região C-terminal do OCT4, sendo, portanto, capaz de identificar tanto OCT4A quanto OCT4B nas amostras do referido estudo, levando a uma confusão nos resultados, pois os autores não identificaram qual isoforma foi expressa.

Conforme já mencionado anteriormente, há um grande debate no meio científico a respeito dos dados conflitantes gerados por inúmeros trabalhos a respeito da expressão de OCT4 nos diversos tipos celulares. Em 2007, LIEDTKE et al. levantaram a questão dos pseudogenes como sendo a responsável por essa confusão. Em 2010, WANG e DAI argumentaram que os transcritos gerados através do *splicing* alternativo (*OCT4B* e *OCT4B1*) e os produtos proteicos resultantes da tradução alternativa (*OCT4B-265*, *OCT4B-190* e *OCT4B-164*) do *OCT4* humano contribuíam para a má interpretação dos resultados. Até o papel do OCT4 como sendo um marcador de CT foi questionado por ZANGROSSI et al. em 2007.

No presente trabalho, a proteína identificada na marcação IHQ referente ao anticorpo monoclonal da Santa Cruz, que pode ser tanto OCT4A quanto OCT4P1, representou um fator de mau prognóstico, relacionando-se a um menor tempo de SLRB em pacientes que exibiram uma maior expressão desta em comparação aos que demonstraram uma menor expressão ($p=0,04$). Se tal proteína for, de fato, OCT4P1, pode-se concluir que esta também representa um fator de mau prognóstico, como o OCT4A. Em razão das similaridades existentes entre OCT4A e OCT4P1, não seria incoerente hipotetizar que ambas tenham funções parecidas no câncer.

Em relação ao anticorpo OCT4, pacientes que tiveram uma maior expressão desse marcador exibiram uma maior SLRB em relação aos pacientes que apresentaram uma menor expressão do mesmo ($p=0,03$), de um modo similar ao resultado gerado em relação à expressão do OCT4B. Na IHQ, todas as amostras exibiram marcação citoplasmática. No western-blot foram identificadas 2 bandas proteicas correspondentes ao OCT4A (ou OCT4P1) e ao OCT4B. Por último, a imunofluorescência demonstrou localizações nuclear e citoplasmática. Portanto, não se pode concluir de uma maneira mais concreta qual isoforma do OCT4 foi expressa nesse conjunto de amostras. Tendo isso em mente, é preferível a utilização de anticorpos monoclonais específicos para cada isoforma do OCT4 ou, caso haja a opção por um policlonal ou por um monoclonal que reconheça a região C-terminal da proteína (comum a todas as isoforma), que seja realizada posteriormente a caracterização das variantes através de outras técnicas, como o RT-PCR

e a digestão enzimática.

Em relação ao OCT4B, o presente trabalho demonstrou que os pacientes com CaP que apresentaram uma maior expressão dessa proteína exibiram um maior tempo de SLRB em comparação aos pacientes que exibiram uma menor expressão do marcador ($p=0,02$). Pacientes que expressaram OCT4A (ou OCT4P1) e não expressaram OCT4B ao mesmo tempo exibiram o menor tempo de SLRB quando comparado aos outros pacientes que apresentaram outras combinações de marcação de OCT4A (ou OCT4P1) e OCT4B ($p=0,001$). Através da análise multivariada para a SLRB, a expressão de OCT4B permaneceu como um fator prognóstico independente ($p=0,004$; IC 95%: 0,385 – 0,837). Pacientes que expressaram OCT4B apresentaram uma maior SLRB em comparação aos pacientes que não expressaram esse marcador. Portanto, pode-se dizer que nesse conjunto de amostras, OCT4B comportou-se como um fator protetor em pacientes com CaP que exibiram sua expressão. Essa observação pode ser explicada, em partes, pelo resultado obtido através do western-blot, que revelou uma banda proteica do tamanho aproximado de 33 KDa, correspondente ao OCT4B-265. De uma forma indireta, tal achado corrobora o trabalho de GAO et al. (2012). Segundo o citado artigo, a isoforma OCT4B-265 é superexpressa sob a influência do estresse genotóxico, promovendo a apoptose via p53. Esse tipo de estresse celular provoca danos ao DNA, acarretando no aparecimento de mutações e na posterior tumorigênese. As células respondem a essa agressão de 2 formas: quando o dano é reparável, estas podem retardar o ciclo celular a fim de ganhar

mais tempo para que se faça o reparo do DNA; caso contrário, se o dano for irreparável, as mesmas podem entrar em apoptose a fim de evitar que o DNA errôneo seja perpetuado. Desse modo, o estímulo à apoptose gerado pelo aumento da expressão do OCT4B nas células submetidas ao estresse genotóxico constitui um mecanismo protetor para o organismo como um todo (GAO et al. 2012).

Os achados do presente trabalho evidenciam a importância que o OCT4B pode ter no CaP, uma vez que pode contribuir na identificação de um grupo de pacientes com um melhor prognóstico, influenciando, inclusive, na opção por uma determinada linha de tratamento. No entanto, este se trata apenas de um estudo preliminar. Na concepção de D'ANGELICA (2012), para que ocorra o surgimento de um verdadeiro biomarcador, há a necessidade de confirmar os resultados em um maior número de pacientes, em trabalhos prospectivos onde haja a participação de múltiplas instituições e laboratórios, além de uma definição clara do que significa uma expressão alta ou baixa do marcador. Estudos mecanísticos coordenados por clínicos e pesquisadores a fim de elucidar o significado da presença do OCT4B nos pacientes também seriam de suma importância.

6 CONCLUSÕES

As expressões de CD133, CD44 e NANOG não se correlacionaram a nenhuma variável, nem ao tempo de SLRB.

Pacientes que tiveram uma maior expressão de OCT4A (ou OCT4P1) apresentaram uma menor SLRB quando comparado aos pacientes que exibiram uma menor expressão dessa proteína; o inverso ocorreu para o OCT4B, ou seja, pacientes que tiveram uma maior expressão de OCT4B apresentaram uma maior SLRB em relação aos pacientes que exibiram uma menor expressão dessa proteína.

A expressão de OCT4B manteve-se como fator prognóstico independente na análise multivariada, sendo que os pacientes que expressaram essa proteína apresentaram uma maior SLRB. De alguma forma, a expressão de OCT4B constituiu-se como um fator protetor no conjunto de pacientes do presente estudo.

Tendo em vista que as diferentes isoformas do OCT4 podem exercer um papel importante na carcinogênese, estas precisam ser analisadas separadamente, com a sua posterior caracterização e validação através de diferentes metodologias, tais como IHQ, western-blot, imunofluorescência, digestão enzimática e RT-PCR; para tal feito, é imprescindível a utilização de ferramentas adequadas (anticorpos e primers específicos que sejam capazes de distinguir as diferentes isoformas).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Remaileh M, Gerson A, Farago M, et al. Oct-3/4 regulates stem cell identity and cell fate decisions by modulating Wnt/ β -catenin signalling. **EMBO J** 2010; 29:3236-48.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:3983-8.

Alenda O, Ploussard G, Mouracade P, et al. Impact of the primary Gleason pattern on biochemical recurrence-free survival after radical prostatectomy: a single-center cohort of 1,248 patients with Gleason 7 tumors. **World J Urol** 2011; 29:671-6.

Altinel M, Arpali E, Turhan N, Gonenc F, Yazicioglu A. Increased expression of CD44s in conventional renal cell carcinomas with renal vein or vena cava thrombosis. a retrospective evaluation of the expression of CD44s by immunohistochemical analysis in conventional RCC patients and in conventional RCC patients with renal vein or vena cava thrombosis. **Urol Int** 2008; 81:452-5.

Ambady S, Malcuit C, Kashpur O, et al. Expression of NANOG and NANOGP8 in a variety of undifferentiated and differentiated human cells. **Int J Dev Biol** 2010; 54:1743-54.

Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. **Stem Cells** 2008; 26:3068-74.

Bae KM, Su Z, Frye C, et al. Expression of pluripotent stem cell reprogramming factors by prostate tumor initiating cells. **J Urol** 2010; 183:2045-53.

Beier D, Wischhusen J, Dietmaier W, et al. CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors. **Brain Pathol** 2008; 18:370-7.

Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. **Nat Genet** 2008; 40:499-507.

Böhm JP, Niskanen LK, Pirinen RT, et al. Reduced CD44 standard expression is associated with tumour recurrence and unfavourable outcome in differentiated thyroid carcinoma. **J Pathol** 2000; 192:321-7.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat Med** 1997; 3:730-7.

Booth HA, Holland PW. Eleven daughters of NANOG. **Genomics** 2004; 84:229-38.

Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, et al. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. **J Clin Invest** 2011; 121:1064-74.

Burger PE, Xiong X, Coetzee S, et al. Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102:7180-5.

Calvo A, Xiao N, Kang J, et al. Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors. **Cancer Res** 2002; 62:5325-35.

Cazares LH, Drake RR, Esquela-Kirscher A, Lance RS, Semmes OJ, Troyer DA. Molecular pathology of prostate cancer. **Cancer Biomark** 2011; 9:441-59.

Chan KS, Espinosa I, Chao M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:14016-21.

Chang DF, Tsai SC, Wang XC, Xia P, Senadheera D, Lutzko C. Molecular characterization of the human NANOG protein. **Stem Cells** 2009; 27:812-21.

Cheng JX, Liu BL, Zhang X. How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors? **Cancer Treat Rev** 2009; 35:403-8.

Chiou SH, Wang ML, Chou YT, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. **Cancer Res** 2010; 70:10433-44.

da Costa WH, Rocha RM, da Cunha IW, da Fonseca FP, Guimaraes GC, Zequi SD. CD133 immunohistochemical expression predicts progression and cancer-related death in renal cell carcinoma. **World J Urol** 2011 Oct 4. [Epub ahead of print]

Davidson KC, Adams AM, Goodson JM, et al. Wnt/ β -catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2012; 109:4485-90.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:10158-63.

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

D'Angelica MI. Circulating CD133: a promising biomarker, but what are we measuring? **Ann Surg Oncol** 2012; 19:351-2.

de Jong MC, Pramana J, van der Wal JE, et al. CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. **Clin Cancer Res** 2010; 16:5329-38.

Delahunt B, Miller RJ, Srigley JR, Evans AJ, Samaratunga H. Gleason grading: past, present and future. **Histopathology** 2012; 60:75-86.

De Marzo AM, Bradshaw C, Sauvageot J, Epstein JI, Miller GJ. CD44 and CD44v6 downregulation in clinical prostatic carcinoma: relation to Gleason grade and cytoarchitecture. **Prostate** 1998; 34:162-8.

Dunn MW, Kazer MW. Prostate cancer overview. **Semin Oncol Nurs** 2011; 27:241-50.

Eaton CL, Colombel M, van der Pluijm G, et al. Evaluation of the frequency of putative prostate cancer stem cells in primary and metastatic prostate cancer. **Prostate** 2010; 70:875-82.

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

Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. **Cell Death Differ** 2008; 15:504-14.

Fan X, Liu S, Su F, Pan Q, Lin T. Effective enrichment of prostate cancer stem cells from spheres in a suspension culture system. **Urol Oncol** 2010; 30:314-8.

Farashahi Yazd E, Rafiee MR, Soleimani M, Tavallaei M, Salmani MK, Mowla SJ. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, generates a stable truncated protein with a potential role in stress response. **Cancer Lett** 2011; 309:170-5.

Ferrandina G, Martinelli E, Petrillo M, et al. CD133 antigen expression in ovarian cancer. **BMC Cancer** 2009a; 9:221.

Ferrandina G, Petrillo M, Bonanno G, Scambia G. Targeting CD133 antigen in cancer. **Expert Opin Ther Targets** 2009b; 13:823-37.

Frame FM, Hager S, Pellacani D, et al. Development and limitations of lentivirus vectors as tools for tracking differentiation in prostate epithelial cells. **Exp Cell Res** 2010; 316:3161-71.

Germann M, Wetterwald A, Guzmán-Ramírez N, et al. Stem-like cells with luminal progenitor phenotype survive castration in human prostate cancer. **Stem Cells** 2012; 30:1076-86.

Gao AC, Lou W, Dong JT, Isaacs JT. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. **Cancer Res** 1997; 57:846-9.

Gao Y, Wang X, Han J, et al. The novel OCT4 spliced variant OCT4B1 can generate three protein isoforms by alternative splicing into OCT4B. **J Genet Genomics** 2010; 37:461-5.

Gao Y, Wei J, Han J, et al. The novel function of OCT4B isoform-265 in genotoxic stress. **Stem Cells** 2012; 30:665-72.

Goldstein AS, Huang J, Guo C, Garraway IP, Witte ON. Identification of a Cell of Origin for Human Prostate Cancer. **Science** 2010; 329:568-71.

Gong C, Liao H, Guo F, Qin L, Qi J. Implication of expression of Nanog in prostate cancer cells and their stem cells. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci** 2012; 32:242-6.

Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. Proliferation of immature tumor vessels is a novel marker of clinical progression in prostate cancer. **Cancer Res** 2009; 69:4708-15.

Guo Y, Liu S, Wang P, et al. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. **Histopathology** 2011; 59:763-75.

Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? **Nat Med** 2009; 15:1010-2.

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.

Han KR, Seligson DB, Liu X, et al. Prostate stem cell antigen expression is associated with gleason score, seminal vesicle invasion and capsular invasion in prostate cancer. **J Urol** 2004; 171:1117-21.

Hanker L, Karn T, Ruckhaeberle E, et al. Clinical relevance of the putative stem cell marker p63 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 122:765-75.

Hart AH, Hartley L, Ibrahim M, Robb L. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. **Dev Dyn** 2004; 230:187-98.

Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. **Eur Urol** 2011; 59:61-71.

Heyse TJ, Malcherczyk D, Moll R, et al. CD44: survival and metastasis in chondrosarcoma. **Osteoarthritis Cartilage** 2010; 18:849-856.

Higashi M, Sugaya Y, Soeta S, Yokota A, Ishii G, Harigaya K. CD44 expression during tumor progression of follicular lymphoma. **Oncol Rep** 2009; 22:1135-40.

Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. **Br J Cancer** 2008; 99:1285-9.

Horst D, Scheel SK, Liebmann S, et al. The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. **J Pathol** 2009; 219:427-34.

Huang X, Sheng Y, Guan M. Co-expression of stem cell genes CD133 and CD44 in colorectal cancers with early liver metastasis. **Surg Oncol** 2012; 21:103-7.

Huh JW, Kim HR, Kim YJ, et al. Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: association with prognosis. **Pathol Int** 2009; 59:241-246.

Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. **Mod Pathol** 2004; 17:292-306.

Iczkowski KA. Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer. **Am J Transl Res** 2010; 3:1-7.

Jeter CR, Badeaux M, Choy G, et al. Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development. **Stem Cells** 2009; 27:993-1005.

Jeter CR, Liu B, Liu X, et al. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. **Oncogene** 2011; 30:3833-45.

Kallakury BV, Yang F, Figge J, et al. Decreased levels of CD44 protein and mRNA in prostate carcinoma. Correlation with tumor grade and ploidy. **Cancer** 1996; 78:1461-9.

Karoubi G, Cortes-Dericks L, Gugger M, Galetta D, Spaggiari L, Schmid RA. Atypical expression and distribution of embryonic stem cell marker, OCT4, in human lung adenocarcinoma. **J Surg Oncol** 2010; 102:689-98.

Kasper S. Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. **Stem Cell Rev** 2008; 4:193-201.

Kellner S, Kikyo N. Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. **Histol Histopathol** 2010; 25:405-12.

Khamis ZI, Iczkowski KA, Sang QX. Metastasis suppressors in human benign prostate, intraepithelial neoplasia, and invasive cancer: their prospects as therapeutic agents. **Med Res Rev** 2011 Jan 16. [Epub ahead of print]

Kito H, Suzuki H, Ichikawa T, et al. Hypermethylation of the CD44 gene is associated with progression and metastasis of human prostate cancer. **Prostate** 2001; 49:110-5.

Ko YH, Won HS, Jeon EK, et al. Prognostic significance of CD44s expression in resected non-small cell lung cancer. **BMC Cancer** 2011; 11:340.

Kojima M, Ishii G, Atsumi N, et al. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. **Cancer Sci** 2008; 99:1578-83.

Kojima M, Ishii G, Atsumi N, et al. CD133 expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. **Cancer Sci** 2010; 101:906-12.

Korsten H, Ziel-van der Made A, Ma X, van der Kwast T, Trapman J. Accumulating progenitor cells in the luminal epithelial cell layer are candidate tumor initiating cells in a PTEN knockout mouse prostate cancer model. **PLoS One** 2009; 4:e5662.

Lawson DA, Witte ON. Stem cells in prostate cancer initiation and progression. **J Clin Invest** 2007; 117:2044-50.

Lawson DA, Xin L, Lukacs RU, Cheng D, Witte ON. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:181-6.

Lee HE, Kim JH, Kim YJ, et al. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. **Br J Cancer** 2011; 104:1730-8.

Lee HJ, You DD, Choi DW, et al. Significance of CD133 as a cancer stem cell markers focusing on the tumorigenicity of pancreatic cancer cell lines. **J Korean Surg Soc** 2011; 81:263-70.

Lee SM, Lee KE, Chang HJ, et al. Prognostic significance of CD44s expression in biliary tract cancers. **Ann Surg Oncol** 2008; 15:1155-60.

Leong KG, Wang BE, Johnson L, Gao WQ. Generation of a prostate from a single adult stem cell. **Nature** 2008; 456:804-8.

Li CY, Li BX, Liang Y, et al. Higher percentage of CD133+ cells is associated with poor prognosis in colon carcinoma patients with stage IIIB. **J Transl Med** 2009a; 7:56.

Li CY, Lee CJ, Simeone DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells. **Methods Mol Biol** 2009b; 568:161-73.

Li F, Zeng H, Ying K. The combination of stem cell markers CD133 and ABCG2 predicts relapse in stage I non-small cell lung carcinomas. **Med Oncol** 2011; 28:1458-62.

Li YF, Xiao B, Tu SF, Wang YY, Zhang XL. Cultivation and identification of colon cancer stem cell-derived spheres from the Colo205 cell line. **Braz J Med Biol Res** 2012; 45:197-204.

Liedtke S, Enczmann J, Wacławczyk S, Wernet P, Kögler G. Oct4 and its pseudogenes confuses stem cell research. **Cell Stem Cell** 2007; 1:364-6.

Lin T, Ding YQ, Li JM. Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. **Med Oncol** 2012; 29:878-85.

Linn DE, Yang X, Sun F, et al. A role for OCT4 in tumor initiation of drug-resistant prostate cancer cells. **Genes Cancer** 2010; 1:908-16.

Liu Q, Li JG, Zheng XY, Jin F, Dong HT. Expression of CD133, PAX2, ESA, and GPR30 in invasive ductal breast carcinomas. **Chin Med J (Engl)** 2009; 122:2763-9.

Lou W, Krill D, Dhir R, et al. Methylation of the CD44 metastasis suppressor gene in human prostate cancer. **Cancer Res** 1999; 59:2329-31.

Louderbough JM, Schroeder JA. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. **Mol Cancer Res** 2011; 9:1573-86.

Lugli A, Iezzi G, Hostettler I, et al. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. **Br J Cancer** 2010; 103:382-90.

Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. **Gastroenterology** 2007; 132:2542-56.

Maeda S, Shintani H, Kurahara H, et al. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. **Br J Cancer** 2008; 98:1389-97.

Maitland NJ, Collins AT. Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. **J Clin Oncol** 2008; 26: 2862-70.

Maitland NJ, Frame FM, Polson ES, Lewis JL, Collins AT. Prostate cancer stem cells: do they have a basal or luminal phenotype? **Horm Cancer** 2011; 2:47-61.

Matsuoka J, Yashiro M, Sakurai K, et al. Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma. **J Surg Res** 2012; 174:130-5.

Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, et al. Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. **Cancer Res** 2002; 62:6405-9.

Meng HM, Zheng P, Wang XY, et al. Overexpression of nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. **Cancer Biol Ther** 2010; 9:295-302.

Microarray Station. Tissue microarrays: tissue microarrays an introduction. Available from: <URL:<http://www.microarraystation.com/tissue-microarray>> [2012 jun 12]

Miki J, Furusato B, Li H, et al. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. **Cancer Res** 2007; 67:3153-61.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Próstata**. Disponível em: URL:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata> [2012 jul 05].

Monsef N, Soller M, Isaksson M, Abrahamsson PA, Panagopoulos I. The expression of pluripotency marker Oct 3/4 in prostate cancer and benign prostate hyperplasia. **Prostate** 2009; 69:909-16.

Moscatelli D, Wilson EL. PINing down the origin of prostate cancer. **Sci Transl Med** 2010; 2:43ps38.

Mostaan LV, Khorsandi MT, Sharifian SM, et al. Correlation between E-cadherin and CD44 adhesion molecules expression and cervical lymph node metastasis in oral tongue SCC: Predictive significance or not. **Pathol Res Pract** 2011; 207:448-51.

Nakamura K, Iinuma H, Aoyagi Y, Shibuya H, Watanabe T. Predictive value of cancer stem-like cells and cancer-associated genetic markers for peritoneal recurrence of colorectal cancer in patients after curative surgery. **Oncology** 2010; 78:309-15.

Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. **Semin Cancer Biol** 2008; 18:260-7.

Nettersheim D, Biermann K, Gillis AJ, Steger K, Looijenga LH, Schorle H. NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development. **Epigenetics** 2011; 6:114-22.

Neumeister V, Agarwal S, Bordeaux J, Camp RL, Rimm DL. ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis. **Am J Pathol** 2010; 176:2131-8.

Nirasawa S, Kobayashi D, Tsuji N, Kuribayashi K, Watanabe N. Diagnostic relevance of overexpressed Nanog gene in early lung cancers. **Oncol Rep** 2009; 22:587-91.

Noordzij MA, van Steenbrugge GJ, Verkaik NS, Schröder FH, van der Kwast TH. The prognostic value of CD44 isoforms in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. **Clin Cancer Res** 1997; 3:805-15.

Oldridge EE, Pellacani D, Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells: Are they androgen-responsive? **Mol Cell Endocrinol** 2011 Jul 23. [Epub ahead of print].

Olsson E, Honeth G, Bendahl PO, et al. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. **BMC Cancer** 2011; 11:418.

Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. **Eur J Cancer** 2010; 46:1271-7.

Palapattu GS, Wu C, Silvers CR, et al. Selective expression of CD44, a putative prostate cancer stem cell marker, in neuroendocrine tumor cell of human prostate cancer. **Prostate** 2009; 69:787-98.

Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna GL, et al. Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. **Clin Cancer Res** 2008; 14:8205-12.

Pallini R, Ricci-Vitiani L, Montano N, et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis. **Cancer** 2011; 117:162-74.

Pan Y, Jiao J, Zhou C, Cheng Q, Hu Y, Chen H. Nanog is highly expressed in ovarian serous cystadenocarcinoma and correlated with clinical stage and pathological grade. **Pathobiology** 2010; 77:283-8.

Panagopoulos I, Möller E, Collin A, Mertens F. The POU5F1P1 pseudogene encodes a putative protein similar to POU5F1 isoform 1. **Oncol Rep** 2008; 20:1029-33.

Pellacani D, Packer RJ, Frame FM, et al. Regulation of the stem cell marker CD133 is independent of promoter hypermethylation in human epithelial differentiation and cancer. **Mol Cancer** 2011; 10:94.

Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. **J Cell Sci** 2004; 117:3539-45.

Rijlaarsdam MA, van Herk HA, Gillis AJ, et al. Specific detection of OCT3/4 isoform A/B/B1 expression in solid (germ cell) tumours and cell lines: confirmation of OCT3/4 specificity for germ cell tumours. **Br J Cancer** 2011; 105:854-63.

Rutella S, Bonanno G, Procoli A, et al. Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. **Clin Cancer Res** 2009; 15:4299-311.

Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:3488-98.

Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, et al. Immunohistochemical features of CD133 expression: association with resistance to chemoradiotherapy in rectal cancer. **Oncol Rep** 2010; 24:345-50.

Salnikov AV, Gladkich J, Moldenhauer G, Volm M, Mattern J, Herr I. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. **Int J Cancer** 2010; 126:950-8.

Sartelet H, Imbriglio T, Nyalendo C, et al. CD133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the AKT pathway. **Histopathology** 2012; 60:1144-55.

Sasaki A, Kamiyama T, Yokoo H, et al. Cytoplasmic expression of CD133 is an important risk factor for overall survival in hepatocellular carcinoma. **Oncol Rep** 2010; 24:537-46.

Schalken JA, van Leenders G. Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. **Urology** 2003; 62(Suppl 1):11-20.

Schatton T, Murphy GF, Frank NY, et al. Identification of cells initiating human melanomas. **Nature** 2008; 451:345-9.

Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. **J Clin Invest** 2008; 118:2111-20.

Seiter S, Arch R, Reber S, et al. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. **J Exp Med** 1993; 177:443-55.

Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes Dev** 2010; 24:1967-2000.

Sholl L, Barletta JA, Yeap BY, Chirieac LR, Hornick JL. Sox2 protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage I lung adenocarcinoma. **Am J Surg Pathol** 2010; 34:1193-8.

Silva J, Nichols J, Theunissen TW, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. **Cell** 2009; 138:722-37.

Simon RA, di Sant'Agnese PA, Huang LS, et al. CD44 expression is a feature of prostatic small cell carcinoma and distinguishes it from its mimickers. **Hum Pathol** 2009; 40:252-8.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature** 2004; 432:396-401.

Song W, Li H, Tao K, et al. Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma. **Int J Clin Pract** 2008; 62:1212-8.

Sotomayor P, Godoy A, Smith GJ, Huss WJ. Oct4A is expressed by a subpopulation of prostate neuroendocrine cells. **Prostate** 2009; 69:401-10.

Suo G, Han J, Wang X, et al. Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers. **Biochem Biophys Res Commun** 2005; 337:1047-51.

Takahashi S, Kamiyama T, Tomaru U, et al. Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients. **Oncol Res** 2010; 24:1201-12.

Tang DG, Patrawala L, Calhoun T, et al. Prostate cancer stem/progenitor cells: identification, characterization, and implications. **Mol Carcinog** 2007; 46:1-14.

Thill M, Berna MJ, Grierson R, et al. Expression of CD133 and other putative stem cell markers in uveal melanoma. **Melanoma Res** 2011; 21:405-16.

Tirino V, Camerlingo R, Franco R, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. **Eur J Cardiothorac Surg** 2009; 36:446-53.

Tong QS, Zheng LD, Tang ST, et al. Expression and clinical significance of stem cell marker CD133 in human neuroblastoma. **World J Pediatr** 2008; 4:58-62.

Trerotola M, Rathore S, Goel HL, et al. CD133, Trop-2 and $\alpha 2\beta 1$ integrin surface receptors as markers of putative human prostate cancer stem cells. **Am J Transl Res** 2010; 2:135-44.

van Leenders GJ, Schalken JA. Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: Implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 2003; 46(Suppl):S3-S10.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:755-68.

Wang Q, Chen ZG, Du CZ, Wang HW, Yan L, Gu J. Cancer stem cell marker CD133+ tumour cells and clinical outcome in rectal cancer. **Histopathology** 2009; 55:284-93.

Wang T, Ong CW, Shi J, et al. Sequential expression of putative stem cell markers in gastric carcinogenesis. **Br J Cancer** 2011; 105:658-65.

Wang X, Kruithof-de Julio M, Economides KD, et al. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. **Nature** 2009a; 461:495-500.

Wang X, Zhao Y, Xiao Z, et al. Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response. **Stem Cells** 2009b; 27:1265-75.

Wang X, Dai J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. **Stem Cells** 2010; 28:885-93.

Wang ZA, Shen MM. Revisiting the concept of cancer stem cells in prostate cancer. **Oncogene** 2011; 30:1261-71.

Wei C, Guomin W, Yujun L, Ruizhe Q. Cancer stem-like cells in human prostate carcinoma cells DU145: the seeds of the cell line? **Cancer Biol Ther** 2007; 6:763-8.

Woo T, Okudela K, Mitsui H, et al. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas. **Int J Clin Exp Pathol** 2010; 4:32-42.

Wu Y, Wu PY. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. **Stem Cells Dev** 2009; 18:1127-34.

Yang K, Tang Y, Habermehl GK, Iczkowski KA. Stable alterations of CD44 isoform expression in prostate cancer cells decrease invasion and growth and alter ligand binding and chemosensitivity. **BMC Cancer** 2010; 10:16.

Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. **Cancer Cell** 2008; 13:153-66.

Yasuda H, Tanaka K, Saigusa S, et al. Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. **Oncol Rep** 2009; 22:709-17.

Yin X, Li YW, Zhang BH, et al. Coexpression of Stemness Factors Oct4 and Nanog Predict Liver Resection. **Ann Surg Oncol** 2012 Mar 30. [Epub ahead of print]

Zangrossi S, Marabese M, Broggin M, et al. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. **Stem Cells** 2007; 25:1675-80.

Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, Ngwabyt SN, Borges I, Ruiz i Altaba A. NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. **EMBO J** 2010; 29:2659-74.

Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. **Clin Cancer Res** 2008; 14:123-9.

Zhang J, Wang X, Li M, et al. NANOGP8 is a retrogene expressed in cancers. **FEBS J** 2006; 273:1723-30.

Zhang J, Li YL, Zhou CY, Hu YT, Chen HZ. Expression of octamer-4 in serous and mucinous ovarian carcinoma. **J Clin Pathol** 2010; 63:879-83.

Zhang M, Song T, Yang L, et al. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. **J Exp Clin Cancer Res** 2008; 27:85.

Zhang S, Balch C, Chan MW, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. **Cancer Res** 2008; 68:4311-20.

Zhang XY, Dong QG, Huang JS, et al. The expression of stem cell-related indicators as a prognostic factor in human lung adenocarcinoma. **J Surg Oncol** 2010; 102:856-62.

Zhao P, Li Y, Lu Y. Aberrant expression of CD133 protein correlates with Ki-67 expression and is a prognostic marker in gastric adenocarcinoma. **BMC Cancer** 2010; 10:218.

Zhao P, Lu Y, Jiang X, Li X. Clinicopathological significance and prognostic value of CD133 expression in triple-negative breast carcinoma. **Cancer Sci** 2011; 102:1107-11.

Zhigang Z, Wenlv S. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression in human prostate cancer tissues: implications for prostate carcinogenesis and progression of prostate cancer. **Jpn J Clin Oncol** 2004; 34:414-9.

Zhou L, Jiang Y, Yan T, et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 122:795-801.

Zöller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? **Nat Rev Cancer** 2011; 11:254-67.