

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

**GENES CANDIDATOS A MARCADORES TUMORAIS
NA PROGRESSÃO DO ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA
IDENTIFICADOS POR ANÁLISE DE HR-CGH E CGH-ARRAY**

Greicy Helen Ribeiro Gambarini Paiva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora em Genética.

Botucatu – SP

2009

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

**GENES CANDIDATOS A MARCADORES TUMORAIS
NA PROGRESSÃO DO ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA
IDENTIFICADOS POR ANÁLISE DE HR-CGH E CGH-ARRAY**

Doutoranda: Greicy Helen Ribeiro Gambarini Paiva

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora em Genética.

Botucatu - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Rosemeire Aparecida Vicente*

Paiva, Greicy Helen Ribeiro Gambarini.

Genes candidatos a marcadores tumorais na progressão do adenocarcinoma de próstata identificados por análise de HR-CGH e CGH-ARRAY / Greicy Helen Ribeiro Gambarini Paiva. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Prof^a. Dr.^a Silvia Regina Rogatto

Assunto CAPES: 20200005

1. Próstata – Câncer. 2. Metástase.

CDD 616.99263

Palavras-chave: Câncer de próstata; CGH-ARRAY; HR-CGH; Metástase; QRT-PCR.

*À minha mãe Lydia, ao meu pai Guedes, e às
minhas irmãs Grazielle e Gisele, pelo incentivo que
me permitiu chegar até aqui...*

*Ao meu esposo Ricardo, pelo amor, carinho,
compreensão e companheirismo...*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Sílvia Regina Rogatto, pela orientação, pelas oportunidades, pelo apoio e, sem dúvidas, pelo exemplo excepcional de dedicação à pesquisa que contribuíram fundamentalmente para a minha formação.

À Dra. Cláudia Aparecida Rainho, Ao Dr. João Lauro Viana de Camargo, ao Dr. José Carlos de Souza Trindade, ao Dr. José Carlos de Souza Trindade Filho, ao Dr. Carlos Márcio Nóbrega de Jesus, à Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira, à Dra. Dirce Maria Carraro e ao Dr. Fernando Augusto Soares pela colaboração na execução desse estudo.

A toda equipe do Laboratório NeoGene que contribuíram, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho. Aos colegas de trabalho: Rodrigo, Shadia, Fabio, Livia, em especial à Flavia e à Sandra pela ajuda imprescindível.

Aos funcionários: José Carlos, Ronaldo, Du, Milena, Cristina, Luciano, Cícera, Lúcia, Denise, Lucas, Andréia, Glaucia, Hayddee, Sérgio, Luciene e Maria Helena pela presteza ao me ajudar nas diversas vezes que precisei.

Aos pacientes e familiares por consentirem com a doação das amostras, essenciais para a realização desse estudo.

À Priscila, à Patricia, à Gleisy, à Lígia, à Wellcy pela amizade sincera, por dividirem comigo as tristezas e vibrarem com as conquistas.

Às minhas eternas amigas Juliana, Fran e Adriana, que mesmo distantes continuam tão próximas.

Aos companheiros de trabalho do setor de Citogenética do IHP, pela oportunidade, compreensão e amizade nos últimos meses.

À Dra. Glória e ao Dr. Ricardo por me mostrarem uma nova maneira de ver e encarar a vida.

A todos os professores que me ensinaram ao longo desses anos, especialmente à Profa. Maria Ângela, por me despertar o interesse pela ciência, à Profa. Maria Izabel e à Profa. Dra. Olinda Kajihara, pelo ensino da língua portuguesa, ao Prof. Dr. Valter Augusto Della Rosa, que me ensinou a arte da citogenética humana e me iniciou no universo científico, mas que acima de tudo me mostrou que a ciência se faz com a verdade, a ética, o respeito e a humildade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia mais comumente diagnosticada entre homens no ocidente. Embora tratamentos efetivos para a doença localizada estejam disponíveis atualmente, não há terapia curativa para tumores metastáticos. Além disso, os marcadores diagnósticos utilizados na clínica não conseguem discriminar totalmente a evolução diferencial da doença. Desta forma, o conhecimento das diferenças biológicas entre tumores primários confinados ao órgão e metástases é essencial para o desenvolvimento de novos marcadores e identificação de alvos terapêuticos. Neste estudo a análise baseada na metodologia de HR-CGH cromossômico foi realizada para identificar alterações de ganhos e perdas genômicas em três grupos de amostras: o grupo I, que compreende amostras pareadas de tumor primário e respectivas metástases (11 casos); o grupo II, constituído de pacientes que apresentaram seguimento clínico favorável por mais de 10 anos (5 casos); e o grupo III, constituído por diferentes biópsias do mesmo paciente (5 pacientes com 2 biópsias cada). As amostras foram microdissecadas (amostras a fresco: a partir de lâminas de referência; em blocos de parafina: a laser) e após a obtenção de DNA foram amplificadas (amostras de arquivo: PCR-SCOMP) ou marcadas por *nick-translation* para a realização de HR-CGH. Os resultados de HR-CGH foram comparados com os dados obtidos da análise de CGH-array num subgrupo de amostras e revelaram concordâncias significativas. Os resultados obtidos na presente investigação revelaram perdas dos cromossomos 1p, 2, 3q, 4p, 5q, 7, 8, 9q, 10q, 11q, 12q, 14q, 15q, 16q, 17q, 18q, 19, 20q e 22q em 80% dos casos avaliados. Além disso, perdas em 17q11.2-25, por exemplo, foram detectadas exclusivamente nos tumores do grupo I e nas suas metástases, e não nos tumores do grupo II, sugerindo que esta alteração deve ser importante na indução de um caráter mais agressivo do tumor. A validação dos resultados de HR-CGH, e confirmados por CGH-array foi realizada pela análise de expressão gênica pelo método de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) em cinco genes: *ARID1A*, *MTSS1*, *NME1*, *S100A4* e *TOP2A*, sendo os três primeiros supressores tumorais e os dois últimos oncogenes. Foram avaliadas as expressões gênicas em 74 amostras de CaP a fresco, 18 CaP de blocos de parafina, seis hiperplasias nodulares de próstata (HNP), 19 margens cirúrgicas histologicamente normais (tecido adjacente) e três amostras de próstata normais obtidas de necropsias (SVO). Para o gene *ARID1A* as análises mostraram que níveis normais ou diminuídos da expressão do gene estão associados à maior risco de recorrência bioquímica ($P=0,0223$, $OR=5,40$, $IC_{95\%}=1,26-23,05$) e à diminuição do tempo de sobrevivência livre de doença (SLD) em comparação com os pacientes com expressão aumentada do gene

($P=0,0131$; $HR=2,706$; $IC_{95\%}= 1,320-10,70$), sendo as medianas de SLD de 17 e de 72 meses, respectivamente. Esses resultados indicam que níveis normais ou diminuídos do transcrito de *ARID1A* nos CaP estão relacionados com pior evolução clínica. Este resultado está em concordância com os achados de perdas desta região gênica detectadas nas análises de HR-CGH e CGH-array no grupo de pacientes do grupo I. A análise do gene *MTSS1* mostrou associação estatisticamente significativa entre níveis mais baixos do gene e níveis mais altos de PSA pós-prostatectomia ($\geq 0,2ng/mL$) ($P=0,0376$), sugerindo um papel deste gene na recidiva da doença. Esses resultados confirmam os achados de perda por CGH-array no grupo de amostras com metástases. As análises da expressão do *NME1* em relação aos parâmetros avaliados neste estudo não revelaram resultados significativos, e, portanto, não validaram os resultados encontrados por CGH-array e HR-CGH. É possível, que outros genes mapeados nesta região possam estar envolvidos. Para o gene *S100A4* os resultados mostraram que o subgrupo de pacientes com níveis mais altos de expressão do gene apresentaram associação marginalmente significativa ($P=0,048$) com a presença de pelo menos um fator de pior prognóstico (escores de 1 a 5). Além disso, foi observada associação significativa ($P=0,008$) entre maiores níveis de expressão do *S100A4* e tumores com *extensão extra prostática* ($P=0,020$; $OR=5,66$, $IC95\%=1,171-27,37$). Esses resultados sugerem que o aumento da expressão de *S100A4* estaria relacionado à maior capacidade invasiva das células tumorais. Com relação ao gene *TOP2A*, o presente estudo revelou o aumento de expressão do gene em 84% das amostras de CaP avaliadas, sendo que 41% delas apresentou alto nível de expressão ($QR>10$). Nossos resultados mostraram que os níveis mais altos de *TOP2A* nos tumores primários estão associados aos maiores escores de Gleason, sugerindo que este gene pode estar envolvido com o caráter mais agressivo dos tumores de próstata. Em conclusão, nesse estudo os resultados das análises de HR-CGH permitiu a identificação de diversas regiões cromossômicas envolvidas em perdas e ganhos genômicos, refletindo a complexidade das alterações genéticas dos tumores de próstata. Além disso, a análise de genes mapeados em algumas regiões detectadas como alteradas nos tumores, em especial os genes *ARID1A* e *TOP2A*, mostrou que estes dois genes têm potencial para serem utilizados como marcadores diagnósticos de tumores com caráter mais agressivo, e com isso, permitir uma conduta clínica mais adequada nestes casos.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the most commonly diagnosed non-cutaneous malignancy and the second leading cause of cancer mortality in men from Occident. Although effective treatments for the localized disease are available, there is no efficient therapy for metastatic tumors. Additionally, clinical diagnostic markers are not able to completely discriminate the differential evolution of the disease. The knowledge of biological differences between localized primary tumors and metastasis can establish new molecular markers and therapeutic targets. In this study, an analysis based on HR-CGH methodology was performed to identify imbalances genomic in three groups of samples: group I, paired samples of primary tumors and its metastasis (11 cases); group II, patients that exhibited favorable follow-up over 10 years (5 cases); and group III, different biopsies from the same patient (5 patients with 2 biopsies each). The tumor samples were submitted to microdissection procedures (fresh samples: from reference slides; paraffin embedded samples: laser), DNA extracted and amplified (archive sample: PCR-SCOMP) or labeled by nick-translation to HR-CGH. The HR-CGH results were compared with data obtained from CGH-array analysis of a subgroup of samples and revealed significant concordances. In the present investigation, there were observed losses on chromosomes 1p, 2, 3q, 4p, 5q, 7, 8, 9q, 10q, 11q, 12q, 14q, 15q, 16q, 17q, 18q, 19, 20q and 22q in 80% of the cases. Losses in 17q11.2-25, for instance, were detected exclusively in tumor from group I and its metastasis, but were not found in tumors from group II, suggesting that this alteration must be important in the progression of the disease. Five genes were selected after the comparison between the HR-CGH and CGH-array data. The tumor suppressor genes *ARID1A*, *MTSS1*, *NME1* and *S100A4* and *TOP2A* (oncogenes) were evaluated by quantitative real time PCR (qRT-PCR). Gene expression pattern was evaluated in 74 samples of PCa, 18 paraffin embedded PCa, six prostate nodule hyperplasias (PNH), 19 histopathologically adjacent normal tissues and three samples from normal prostate tissue obtained from necropsies (SVO). Normal or reduced expression levels of *ARID1A* gene are associated with patients that presented higher risk of biochemical recurrence ($P=0,0223$, $OR=5,40$, $IC_{95\%}=1,26-23,05$) and shorter survival disease-free (SLD) in the comparison with high expression levels of this gene ($P=0,0131$; $HR=2,706$; $IC_{95\%}= 1,320-10,70$), medians of SLD of 17 and 72 months, respectively. These results indicated that normal or reduced levels of the transcript of *ARID1A* in PCa are related with a worse outcome of the disease. The losses found by HR-CGH and CGH-array involving this region detected in patients from group I confirmed the results obtained by qRT-PCR for *ARID1A*. The *MTSS1* expression analysis showed an

statistically significant association between reduced levels of transcript and PSA post-prostatectomy $\geq 0,2\text{ng/mL}$ ($P=0.0376$), suggesting its involvement with recurrence of the disease. These results confirmed those detected by CGH-array in the group of patients that presented metastasis. No significant associations were detected between the *NME1* expression level and clinical and histopathological parameters. It is possible that other mapped genes in this region are involved in the disease. A marginally significant association ($P=0.048$) was detected in a subgroup of patients showing *S100A4* higher expression levels and at least one worst prognosis parameter (scores from 1 to 5). Furthermore, it was found a significant association ($P=0.008$) between *S100A4* high expression levels and tumors with extra-prostate invasion ($P=0.020$; OR=5.66, IC95%=1.171-27.37). The *S100A4* increased expression levels could be related to invasive phenotype in prostate tumoral cells. Eight four percent of PCa evaluated presented high expression levels of *TOP2A* gene, 41% of them showed QR>10. The *TOP2A* highest levels were associated with higher Gleason's scores, suggesting the involvement of this gene in more aggressive carcinomas. In conclusion, HR-CGH analysis allowed the identification of the several chromosomal imbalances reflecting the complexity of genetic alterations in prostate carcinomas. Additionally, the genes selected for individual analysis, specially *ARID1A* and *TOP2A* genes, showed its potential to be used as aggressiveness markers in prostate adenocarcinoma allowing a more appropriate clinical conduct.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem do gel de agarose 2% corado por brometo de etídio, para a checagem da qualidade do RNA extraído para duas amostras de arquivo em blocos de parafina. **37**
- Figura 2.** Padrão de marcação da HR-CGH para a amostra P3. **45**
- Figura 3.** Representação gráfica da frequência de perdas e ganhos cromossômicos detectados por HR-CGH. **46**
- Figura 4.** Ideogramas indicando as regiões de perdas e ganhos genômicos significativos, obtidos após a análise em banda G reversa. **47**
- Figura 5.** Alterações presentes em mais de 70% das amostras representados no diagrama de Venn segundo o grupo estudado (grupo I: tumores primários e suas metástases; grupo II: bom prognóstico e grupo III diferentes biópsias do mesmo paciente). **51**
- Figura 6.** Alterações cromossômicas detectadas por HR-CGH para cada grupo de metástases de acordo com o órgão acometido. **53**
- Figura 7.** Diagrama de Venn apresentando as alterações comuns entre as amostras de metástases e CaP agrupadas segundo o sítio acometido. **55**
- Figura 8.** Diagrama de Venn apresentando as alterações comuns entre as amostras de CaP que evoluíram para metástase em testículo, as comuns entre os CaP que evoluíram para metástases em linfonodos, as comuns entre os CaP que apresentaram bom prognóstico (grupo II) e sua sobreposição. **56**
- Figura 9.** Representação esquemática em diagrama de Venn apresentando as alterações comuns entre as amostras de CaP que evoluíram para metástase (grupo I), as comuns entre todas as metástases, as comuns entre os CaP de bom prognóstico (grupo II) e entre os grupos. **59**
- Figura 10.** Ideogramas mostrando a localização cromossômica dos genes selecionados para validação por qRT-PCR. **63**
- Figura 11.** Curvas-padrão dos genes alvo *ARID1A* (a), *MTSS1* (b), *NME1* (c), *S100A4* (d), *TOP2A* (e) e endógenos *GAPDH* (f) e *HPRT* (g). **67**
- Figura 12.** Curvas de amplificação para os genes alvo *ARID1A* (a), *MTSS1* (b), *NME1* (c), *S100A4* (d), *TOP2A* (e) e endógenos *GAPDH* (f) e *HPRT* (g). **68**
- Figura 13.** Curvas de dissociação para os genes alvo *ARID1A* (a), *MTSS1* (b), *NME1* (c), *S100A4* (d), *TOP2A* (e) e endógenos *GAPDH* (f) e *HPRT* (g). **69**
- Figura 14.** Quantificação relativa (QR) dos genes avaliados nos CaP (n=74), HNP (n=6) e tecido adjacente ao tumor (n=19) em relação à expressão em amostras de próstata normais (SVO, n=2). **76**
- Figura 15.** Análise da expressão de *ARID1A* nas amostras de CaP com e sem recidiva bioquímica de acordo com os valores do PSA pós-cirúrgico **79**

(n=53).

- Figura 16.** Curvas de sobrevida livre de doença (SLD) de acordo com os níveis de expressão do gene *ARID1A* nas amostras de CaP. **80**
- Figura 17.** Análise da expressão de *MTSS1* nas amostras de CaP com e sem recidiva bioquímica de acordo com os valores do PSA pós-cirúrgico, excluindo-se as amostras com valores de PSA<0,2ng/mL e com seguimento clínico inferior a 24 meses (n=53). **88**
- Figura 18.** Curvas de sobrevida livre de doença (SLD) de acordo com os níveis de expressão do gene *MTSS1* nas amostras de CaP (n=71). **89**
- Figura 19.** Quantificação relativa (QR) do gene *MTSS1* em amostras CaP obtidas a partir de tecido fixado e em blocos em parafina, CaP a fresco, HNP e tecido adjacente ao tumor em relação à expressão em amostras de próstata normais. **90**
- Figura 20.** Análise da expressão de *S100A4* nas amostras de CaP em relação às características clínico-histopatológicas. **93**
- Figura 21.** Análise da expressão de *TOP2A* com relação ao escore de Gleason nas amostras CaP. **96**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Relatos publicados em câncer de próstata usando CGH-arrays, as diferentes plataformas e as metodologias de validação empregadas em cada estudo.	12
Tabela 2.	Informações clínicas dos pacientes selecionados para o estudo de HR-CGH e CGH-array.	17
Tabela 3.	Caracterização clínica, histopatológica e dados de seguimento dos pacientes cujas amostras foram usadas na análise de expressão gênica.	20
Tabela 4.	Relação dos genes, localização e seqüência dos iniciadores usados na análise de qRT-PCR.	38
Tabela 5.	Critérios considerados na análise de risco segundo características clínicas e morfológicas.	41
Tabela 6.	Caracterização das regiões mínimas comuns de perdas e ganhos cromossômicos (detectada em 90% das amostras) entre o tumor primário e sua metástase (grupo I), identificados por HR-CGH.	48
Tabela 7.	Comparação entre as alterações de ganhos e perdas genômicas entre as amostras do grupo IP e II resultantes das análises de HR-CGH e CGH-array.	58
Tabela 8.	Regiões mínimas de perdas e ganhos comuns às duas amostras de cada paciente do grupo III detectadas por HR-CGH.	61
Tabela 9.	Regiões mínimas que diferenciam os grupos de CaP I e II e o que foram detectadas nos casos do grupo III. Em negrito estão destacadas as regiões mínimas presentes em mais de 60% das amostras de um grupo e ausentes no outro.	62
Tabela 10.	Genes selecionados mapeados nas regiões genômicas alteradas detectadas por HR-CGH.	64
Tabela 11.	Determinação da eficiência da qRT-PCR para os pares de iniciadores dos genes alvo e endógenos.	66
Tabela 12.	Valores numéricos para cálculo da quantificação relativa referentes a avaliação da expressão por qRT-PCR dos genes alvo <i>ARID1A</i> , <i>MTSS1</i> , <i>NME1</i> , <i>S100A4</i> , <i>TOP2A</i> e dos endógenos <i>GAPDH</i> e <i>HPRT</i> em amostras de carcinoma de próstata (CaP), de hiperplasias nodulares da próstata (HNP) e nas margens do tecido adjacente ao tumor (Adj.) comparadas com amostras de tecido prostático normal (proveniente de necropsias - SVO).	70
Tabela 13.	Padrão de expressão dos genes <i>ARID1A</i> , <i>MTSS1</i> , <i>NME1</i> , <i>S100A4</i> e <i>TOP2A</i> nas amostras avaliadas.	75
Tabela 14.	Expressão relativa dos genes <i>ARID1A</i> , <i>MTSS1</i> , <i>NME1</i> , <i>S100A4</i> e <i>TOP2A</i> e parâmetros clínico-histopatológicos de amostras de carcinoma primário de próstata, hiperplasia nodular de próstata e tecido adjacente ao tumor de pacientes com CaP	82

Tabela 15.	Expressão relativa dos genes <i>ARID1A</i> e <i>MTSS1</i> , e parâmetros clínico-histopatológicos de amostras de carcinoma primário de próstata de arquivos em blocos de parafina.	85
Tabela 17.	Categorização do nível de expressão de <i>TOP2A</i> em níveis de 0 a 5 para os 73 CaP.	97
Tabela 18	Alterações no número de cópias característico dos subtipos descritos por Lapointe <i>et al.</i> (2007), identificados usando o método SAM (<i>Significance Analysis of Microarrays</i>).	116
Tabela 19	Análise comparativa caso a caso entre os subtipos descritos por Lapointe <i>et al.</i> (2007) e os resultados de HR-CGH.	117
Tabela 20.	Caracterização dos dois diferentes focos tumorais de cada paciente avaliado do grupo III e informações relevantes.	122

LISTA DE ABREVIATURAS

Adj – tecido adjacente ao tumor

CaP – Câncer de Próstata

CGH – Hibridação Genômica Comparativa

Ct – Ciclo do Threshold

HE – Hematoxilina e Eosina

HNP - Hiperplasia Nodular Prostática

HPB – Hiperplasia Prostática Benigna

HR-CGH – Hibridação Genômica Comparativa de Alta Resolução

IM – amostras de metástases de CaP do grupo I

IP – amostras de adenocarcinoma primários do grupo I

MCt – Média do ciclo do Threshold

MVI – Invasão Microvascular

PIN – Neoplasia Intraepitelial Prostática

PSA – Antígeno Prostático Específico

PSADT – PSA doubling-time

QR – Quantificação Relativa

qRT-PCR – RT-PCR quantitativa em tempo real

SCOMP – Single Cell Comparative Genomic Hybridization

SLD – Sobrevida Livre da Doença

SVO – amostras de próstata normal

ÍNDICE

Introdução	1
<i>Câncer de Próstata</i>	1
<i>Alterações Genéticas e CaP</i>	6
<i>CGH Cromossômico, Câncer de Próstata e suas Metástases</i>	8
<i>CGH-arrays</i>	11
Objetivos	15
Material e Métodos	16
<i>Caracterização da amostra</i>	16
<i>Processamento do Tecido</i>	29
Amostras congeladas	29
Amostras de arquivo em blocos de parafina	29
<i>Métodos utilizados na análise de HR-CGH</i>	30
Extração de DNA	30
SCOMP (Single Cell Comparative Genomic Hybridization)	30
Incorporação de Nucleotídeos Marcados	31
Hibridação Genômica Comparativa de Alta Resolução	32
Análise dos dados	33
<i>Métodos utilizados na validação por qRT-PCR</i>	34
Isolamento do RNA total das amostras congeladas	34
Isolamento do RNA total das amostras de blocos de parafina	35
Obtenção de cDNA	36
<i>Validação dos resultados de HR-CGH e CGH-array pela metodologia de RT-PCR quantitativa em tempo real</i>	37
Seleção dos genes candidatos	37
Análise dos dados	40
Análise estatística	43
Resultados	44
<i>HR-CGH</i>	44
Grupo I	48
Grupo II	57
Grupo III	59
Comparações entre os CaP dos Grupos I, II e III	60
<i>Validação dos resultados de HR-CGH e CGH-array pela metodologia de qRT-PCR</i>	62

Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR	66
Análise da qualidade do RNA extraído das amostras em blocos de parafina	74
Análise da expressão do gene <i>ARID1A</i>	74
Amostras a fresco	74
Amostras fixadas e em blocos de parafina	81
Análise da expressão do gene <i>MTSS1</i>	86
Amostras a fresco	86
Amostras fixadas e em blocos de parafina	89
Análise da expressão do gene <i>NME1</i>	90
Análise da expressão do gene <i>S100A4</i>	91
Análise da expressão do gene <i>TOP2A</i>	93
Discussão	101
<i>HR-CGH</i>	101
<i>Validação dos resultados de HR-CGH e CGH-array pela metodologia de qRT-PCR</i>	124
1. <i>ARID1A (AT rich interactive domain 1A) (Aliases: RP1-50O24.1, B120, BAF250, BAF250a, BM029, C1orf4, P270, SMARCF1)</i>	124
2. <i>MTSS1 (Metastasis Suppressor 1) (Aliases: DKFZp781P2223, FLJ44694, KIAA0429, MIM, MIMA, MIMB)</i>	128
3. <i>NME1 (non-metastatic cells 1) (Aliases: AWD, GAAD, NDPK-A, NDPKA, NM23, NM23-H1)</i>	131
4. <i>S100A4 (S100 calcium binding protein A4) (Aliases: 18A2, 42A, CAPL, FSP1, MTS1, P9KA, PEL98)</i>	134
5. <i>TOP2A (topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa) (Aliases: DNA topoisomerase II, 170 kD; DNA topoisomerase II, alpha isozyme)</i>	139
Considerações Finais	143
Referências	146
Apêndice	171
A) Resultado da análise comparativa com 70% de similaridade entre todas as amostras de cada grupo e entre todos os CaP dos três grupos de amostras.	171
B) Alterações comuns entre as amostras de metástases e dos CaP agrupadas de acordo com a localização da metástase.	172
Anexo	173
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	173

INTRODUÇÃO

Câncer de Próstata

A próstata é um órgão glandular e fibromuscular, localizado no interior da cavidade pélvica. Sob o ponto de vista anatômico, a próstata é formada por três zonas glandulares e pelo estroma fibromuscular (McNeal et al., 1988). A zona de transição envolve a uretra prostática proximal e compreende 5% do tecido glandular. A maioria das Hiperplasias Prostáticas Benignas (HPB), também denominadas hiperplasias nodulares da próstata (HNP), e cerca de 20% dos cânceres de próstata (CaP) ocorrem nessa área. A zona central representa aproximadamente 20-25% da massa glandular total da próstata e se encontra envolvendo os ductos ejaculatórios. Aproximadamente 5 a 10% dos CaP estão localizados nessa região prostática. A zona periférica é a de maior tamanho situada posterior e lateralmente. Corresponde à região apical da próstata, envolvendo a zona central e compreendendo 70-75% do tecido glandular. A maioria (70%) dos CaP e as Neoplasias Intraepiteliais Prostáticas (PIN) ocorre nesta área. O estroma fibromuscular ocupa a superfície anterior da próstata e é constituído principalmente de músculo liso.

Histologicamente a próstata é composta por glândulas túbulo-alveolares arranjadas em lóbulos envolvidos por um estroma, contidos dentro da cápsula prostática (LeDuc, 1939; Brandes et al., 1964). As glândulas são constituídas por ácinos e ductos prostáticos, formados por um epitélio glandular composto por duas camadas celulares: basal e secretora. Os ácinos e os ductos estão imersos em uma matriz estromal, tecido fibromuscular, vascular e conectivo. No estroma é possível distinguir dois tipos celulares distintos: os miofibroblastos e as células musculares lisas. A camada basal do epitélio glandular é formada por uma ou duas camadas de células basais localizadas entre a membrana basal e a camada de células secretoras. Esta por sua vez é formada por uma camada de células colunares que se projetam para o lúmen glandular. Uma diferença entre estas duas camadas celulares é a expressão do Antígeno Prostático Específico (PSA) e da fosfatase ácida que ocorre apenas nas células secretoras (Grignon et al., 1988). A expressão do receptor de andrógenos ocorre nestas duas camadas, a qual está significativamente aumentada nas células

secretoras. Outra diferença entre estas duas camadas de células refere-se à expressão de determinadas citoqueratinas que pode ser indicativa do grau de diferenciação das células epiteliais (Alberti et al., 2000).

Os cânceres de próstata são comumente subdivididos por sítios de origem: acinar e de ducto proximal (adenocarcinoma, carcinoma mucinoso, carcinoma cístico adenóide, tumor carcinóide, carcinoma indiferenciado) ou de ducto distal (carcinoma de célula transicional, carcinoma de célula escamosa, carcinoma papilífero, carcinoma ductal com características endometrióides). A estrutura acinar ou o ducto proximal da próstata são responsáveis pela origem de 98% dos cânceres prostáticos (Hanks et al., 1993). A grande maioria dos CaP é representada pelo adenocarcinoma acinar que constitui uma variante histológica com comportamento biológico e perfil genético molecular distintos (Bostwick e Dundore, 1997).

As lesões prostáticas são heterogêneas e de natureza multifocal. Essa heterogeneidade encontrada à análise histológica é representada por uma justaposição de glândulas benignas, focos pré-neoplásicos e neoplásicos que variam em severidade.

O câncer de próstata (CaP) é a segunda causa de morte por câncer em homens no Brasil. Dados de Incidência e Morte por Câncer estimam a ocorrência de 49.530 novos casos para o ano de 2008 (Brasil, INCA, 2008). Como a maioria dos carcinomas de próstata não apresenta sintomas clínicos até estágios tardios de progressão, quando as opções terapêuticas são limitadas, a busca por novas estratégias capazes de detectar precocemente o CaP tem tido forte ênfase nos últimos anos.

Os fatores primários utilizados como indicadores prognósticos do CaP são estadiamento, grau histológico e PSA (Koff *et al.*, 2005). Quando diagnosticados, os adenocarcinomas de próstata são classificados pelo sistema TNM, que define o estadiamento tumoral, levando em consideração a extensão do tumor primário (T), a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais (N) e a ausência ou presença de metástase à distância (M) (Epstein *et al.*, 2004) e pelo sistema de graduação de Gleason, que considera a diferenciação histológica da neoplasia (Epstein *et al.*, 2004).

Neste sistema, o escore é dado baseado na soma dos dois focos neoplásicos com graus mais prevalentes (exemplo: 3+3, 3+4) com uma variação de 2 a 10. Tumores com baixos escores de Gleason geralmente são menores em volume e tem baixo potencial metastático, enquanto tumores com altos escores tendem a ser maiores e apresentarem potencial metastático aumentado. O escore de Gleason pré-operatório está correlacionado com indicadores importantes de extensão da doença, tais como envolvimento de linfonodos e metástase à distância (Gleason, 1977). Em termos de prognóstico, os escores 2-4 são classificados como bem diferenciados; 5-6 como moderadamente diferenciados; 7 como moderadamente para pobremente diferenciados; e 8-10 como pobremente diferenciados. Um escore 7 de Gleason pode, além disso, ser sub-classificado em [3+4] ou [4+3] e o pior prognóstico associado com [4+3] pode afetar a decisão ao tratamento (DeMarzo *et al.*, 2003).

A dosagem dos níveis de PSA é considerada normal até 4,0 ng/mL e têm se mostrado eficiente na detecção da doença em estágios, nos quais, a terapia com alto potencial de cura, prostatectomia radical, possa ser empregada. Entretanto, há críticas quanto à eficácia desse exame, as quais se referem à sua inespecificidade em diferenciar o câncer de doenças benignas, como a hiperplasia nodular de próstata e prostatites, e à existência de casos de CaP com valores baixos de PSA, como por exemplo no caso de pacientes com história familiar para esta neoplasia e tumores hormônio-independentes (DeMarzo *et al.*, 2007).

Após prostatectomia radical os pacientes com CaP, normalmente apresentam níveis de PSA próximos a zero, valores acima de 0,4ng/mL indicam pior prognóstico e estão associados a progressão da doença metastática, entretanto, considera-se PSA $\geq 0,2$ ng/mL como evidência de recorrência bioquímica na predição de metástases a distância em pacientes com recorrência local da doença (Stephenson *et al.*, 2006). O PSADT (PSA doubling-time) tem se mostrado um método eficiente para aumentar a sensibilidade do PSA em prever o risco de recorrência da doença após a cirurgia. Este se trata de um cálculo usando regressão linear logarítmica que estima o tempo de duplicação do PSA em meses após a cirurgia. Considera-se

que quanto menor o PSADT, maior é a chance de recorrência tumoral (Roberts *et al.*, 2001).

Segundo Partin *et al.* (1997), a combinação dessas três variáveis (PSA, TNM e escore de Gleason) contribui significativamente para a predição do estágio patológico, podendo se estimar o risco de recorrência da doença em: baixo, moderado e alto risco, de acordo com as diretrizes estabelecidas pela *National Comprehensive Cancer Network (NCCN - Clinical Practice Guidelines in Oncology, version 2. 2007)*.

Outra característica com importância prognóstica é a capacidade do tumor invadir as estruturas angiolímfáticas, a qual não é abordada pelo sistema TNM. Antunes *et al.* (2006) avaliaram a relação da invasão microvascular (MVI) com outras características patológicas e sugerem seu uso como um fator prognóstico independente em pacientes com CaP. Segundo os autores 11% de 428 pacientes com CaP submetidos a prostatectomia radical apresentaram MVI. Desses, 44,6% apresentaram recorrência enquanto apenas 20,2% dos pacientes sem MVI tiveram recorrência ($p < 0,001$). Além disso, a MVI se mostrou uma característica prognóstica independente da recorrência bioquímica.

Embora estes parâmetros clínicos e histológicos sejam úteis na classificação dos tumores prostáticos eles não são capazes de prever quais cânceres órgão-confinados poderão progredir e quais permanecerão indolentes. Baseado nisso e no fato de que a prostatectomia é um tratamento agressivo e que afeta a qualidade de vida dos pacientes (Stanford *et al.*, 2000; Steineck *et al.* 2002), faz-se necessário identificar marcadores prognósticos que possam discriminar quais carcinomas prostáticos realmente requerem cirurgia ou terapias pós-cirúrgicas.

As alterações genômicas que caracterizam e presumivelmente dirigem a transformação neoplásica podem ser a chave para explicar a heterogeneidade clínica dos CaPs. Dados preliminares sugerem que anormalidades cromossômicas detectadas por análises de bandamento cromossômico ou hibridação genômica comparativa (CGH) possuem valor prognóstico (Lundgren *et al.*, 1992; Alers *et al.*, 2000).

A CGH, em particular, é uma técnica de citogenética molecular que permite a identificação de um amplo espectro de regiões cromossômicas freqüentemente afetadas por anormalidades genômicas não-balanceadas. Em CaP, perdas dos braços cromossômicos 8p, 13q, 6q, 10q, 16q e 18q e ganhos de 7, 8q e Xq tem sido descritos por vários grupos (Visakorpi *et al.*, 1995; Cher *et al.*, 1996; Alers *et al.*, 2000; 2001; Fu *et al.*, 2000; Mattfeldt *et al.*, 2002; Wolter *et al.*, 2002a; 2002b; Chu *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2004).

Dentre as vantagens desta metodologia, está a possibilidade de localização de seqüências em excesso ou ausentes no genoma tumoral, a triagem para aberrações não balanceadas, a não necessidade de preparações cromossômicas das amostras tumorais e a detecção de deleções de 10-20 Mb que não podem ser distinguidas por bandamento G. Entretanto, este nível de sensibilidade é considerado relativamente baixo. Mais recentemente, avanços na técnica de CGH permitiram a detecção de aneusomias de pequenas regiões cromossômicas de até 3Mb (Kirchhoff *et al.*, 1999). Simulações no *software* usado na análise da CGH indicam que a resolução teórica desta técnica permite a detecção de desequilíbrios genômicos de até 2Mb (Kirchhoff *et al.*, 2001; Ness *et al.*, 2002). Este procedimento é conhecido como CGH de alta resolução (HR-CGH). O método baseia-se na detecção das alterações usando o intervalo de referência padrão. Este intervalo varia com a média do intervalo de confiança de 99,5% da razão média de cada perfil de uma amostra teste comparada ao intervalo de confiança de 99,5% da amostra de referência. Quando não há sobreposição entre estes dois intervalos, a região cromossômica correspondente é designada alterada. O intervalo de referência que adapta o padrão básico dos perfis de todas as análises é automatizado para parear perfeitamente as análises individuais. Schoumans *et al.* (2004) demonstraram que a HR-CGH pode ser usada para detectar deleções inferiores a 1,8Mb, entretanto, em alguns casos rearranjos >5Mb não são detectados. Duplicações heterozigotas são mais difíceis de serem detectadas do que deleções, pelo fato de que a razão verde:vermelho para as duplicações é 3:2 enquanto que para deleções é 1:2. Segundo os autores, a resolução da CGH é variável e pode depender da região cromossômica envolvida. Variações nas condições da hibridação, bem como a condensação cromossômica e a presença de

seqüências repetitivas, podem interferir na qualidade da CGH, não permitindo a detecção de determinadas alterações genômicas.

Alterações Genéticas e CaP

Uma variedade de relatos de alterações genéticas em carcinomas de próstata detectada por diferentes metodologias evidencia algumas regiões cromossômicas como não casualmente envolvidas no início e progressão da doença. Alterações cromossômicas recorrentes foram relatadas envolvendo perdas em 5q, 8q, 10p, 10q, 13q, 16q, 17p, e Y e ganhos afetando os cromossomos 7, 8q, 17p, 17q e Xq (Brothman *et al.*, 1991; Lundgren *et al.*, 1992; Micale *et al.*, 1992; Arps *et al.*, 1993; Alcaraz *et al.*, 1994; Cher *et al.*, 1994; Macoska *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994; Cher *et al.*, 1995; Qian *et al.*, 1995; Visakorpi *et al.*, 1995; Cher *et al.*, 1996; Ittmann 1996; König *et al.*, 1996; Matsuura *et al.*, 1996; Trybus *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1996; Zitzelsberger *et al.*, 1996; Kasahara *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2002; Wolter *et al.*, 2002a; Chu *et al.*, 2003).

As alterações mais relevantes em literatura compreendem aquelas afetando os cromossomos 8 e 10. Uma variedade de relatos descreve diferentes regiões cromossômicas no cromossomo 8 como não casualmente envolvidas em carcinomas de próstata, incluindo perda de 8p12 (Huang *et al.*, 1996), 8p21-23 (Matsuyama *et al.*, 1994; Visakorpi *et al.*, 1995; Vocke *et al.*, 1996), 8p22 (Arps *et al.*, 1993; Macoska *et al.*, 1993; Matsuyama *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1996; Wolter *et al.*, 2002a), e em 8p (Beheshti *et al.*, 2002; Mattfeld *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2003; Kraus *et al.*, 2003). Um estudo usando a metodologia de hibridação genômica comparativa em 45 amostras de CaP mostrou que a perda de 8p pode ser considerada como um marcador de estadiamento do câncer de próstata. Esta alteração foi mais comum em casos com maiores escores de Gleason (Chu *et al.*, 2003). Em adição, a trissomia do cromossomo 8 foi associada a maiores escores de Gleason (Takahashi *et al.*, 1994; Qian *et al.*, 1995; Wolter *et al.*, 2002a).

A perda de 10q é observada em 50 a 80% dos CaP. No mínimo dois locos independentes parecem estar relacionados em 10q23.1 e 10q24-q25 (Atkin e Baker, 1985; Lundgren *et al.*, 1992; Arps *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 2003). Acredita-se que a perda de 10q é um evento tardio em relação à perda de 8p, pois ocorre mais freqüentemente em carcinomas do que em neoplasias intraepiteliais, são mais freqüentemente observados em doença metastática (Trybus *et al.*, 1996) e em tumores mais avançados (Ittmann, 1996). Entretanto, a perda em 10q foi considerada um evento inicial na carcinogênese da próstata, principalmente por estarem presentes também em tumores localizados (Cher *et al.*, 1996; Trybus *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 2003).

Várias alterações genéticas foram selecionadas para representar estágios específicos ou subgrupos da doença. Ribeiro *et al.*(2006), baseados em resultados de avaliações cromossômicas, propuseram um modelo genético de progressão para carcinogênese da próstata, no qual perdas de 8p e 13q são tidas como eventos iniciais e distintos, preferencialmente seguidas por ganho de 8q e perda de 6q, 16q e 18q. Em contrapartida, um conjunto de eventos tardios leva a recorrência e metástase de tumores de próstata, os quais seriam geneticamente mais complexos.

Alguns genes foram relacionados com o CaP, como o *HER-2*, *PAI* e *RAF* mapeados no cromossomo 7 (Vogel *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2006; Nishio *et al.*, 2006; Jorgenson *et al.*, 2007), o gene *RB* envolvido em aproximadamente 50% dos CaP (Cooney *et al.*, 1996; Melamed *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 2005), o *APC* descrito em 20% dos tumores avançados (Brewster *et al.*, 1994), *TP53*, *CHEK2* (Yang *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 2006), *BRCA1* (Arason *et al.*, 1993; Langston *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 2006) ou genes distais a ele (Cher *et al.*, 1994; Visakorpi *et al.*, 1995), o *TP27* (Macri e Loda, 1999; Tsihlias *et al.*, 1999; Shapira *et all.*, 2006), o *TP16* (Jarrard *et al.*, 1999; Zhang *et al.*,2006a), o *AR* (Visakorpi *et al.*, 1995; Haapala *et al.*, 2007), os genes relacionados à atividade da telomerase (Sommerfeld *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998) e os genes reguladores de apoptose, como o *BCL2* (McDonnel *et al.*, 1997; Revelos *et al.*, 2005), entre outros.

Os dados apresentados revelam uma grande heterogeneidade no perfil de alterações genéticas em carcinomas de próstata, no entanto não foi

identificado um evento genético específico responsável pelo desenvolvimento inicial e progressão dos CaP (Sattler *et al.*, 1999; Nupponen e Visakorpi, 2000; Haapala *et al.*, 2001; Steiner *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2006).

Há a necessidade de compreensão dos fatores de risco envolvidos e do conhecimento preciso da biologia dos cânceres de próstata. Resultados atuais de estudos moleculares sugerem que estas informações levarão a muitas aplicações clínicas, incluindo a identificação de marcadores tumorais úteis ao diagnóstico, seleção de tratamento e prognóstico.

CGH Cromossômico, Câncer de Próstata e suas Metástases

O câncer de próstata normalmente se inicia com uma lesão pequena e bem diferenciada. Entretanto, alguns carcinomas aumentam em tamanho e progridem para lesões moderadamente diferenciadas e, posteriormente para indiferenciadas podendo evoluir para metástases. No modelo clássico de formação de metástases, células tumorais invadiriam vasos sanguíneos e/ou linfáticos atingindo a circulação e, a partir daí, se alojariam em outros órgãos (Mostofi e Price, 1973; Herlyn and Malkowicz, 1991; Woodhouse *et al.*, 1997).

Estudos recentes têm demonstrado que a alteração na expressão de genes pró-metastáticos ocorre já nas fases iniciais do câncer de próstata, juntamente com a expressão anormal de genes que induzem ao crescimento do tumor primário (Alberti, 2008). Outros estudos sugerem que a disseminação à distância de células do tumor primário é um evento inicial no processo da carcinogênese (Husemann *et al.*, 2008). O desenvolvimento das técnicas para a detecção e caracterização de células tumorais, permitindo a análise de células únicas, principalmente da medula óssea e sangue periférico dos pacientes com câncer, tem evidenciado que a medula óssea serviria como um “reservatório” para diversos tipos de células tumorais (Pantel e Brakenhoff, 2004; Pantel e Alix-Panabieres, 2007). Células provenientes do tumor primário ficariam alojadas na medula óssea, de onde elas re-circulariam até atingirem órgãos distantes com melhores condições para o seu crescimento. Essa via recentemente sugerida para a formação de metástases tem se baseado no fato de que células tumorais foram detectadas no sangue periférico de pacientes com câncer de mama meses após a remoção completa do tumor, o que indica

que estas células poderiam estar re-circulando entre sítios metastáticos (Meng et al., 2004; Muller et al., 2005).

Holcomb et al (2008) isolaram células epiteliais da medula óssea de pacientes com câncer de próstata localizado (n=48) e com doença metastática disseminada (n=11) e caracterizaram as alterações genômicas por CGH. Eles encontraram múltiplas alterações de perdas e ganhos, incluindo perda de 8p e ganhos de 8q e Xq, nas células dos pacientes com doença metastática. As alterações identificadas nas amostras de medula óssea correspondiam às detectadas nos respectivos tumores primários e às alterações relatadas em literatura para o câncer de próstata, evidenciando que essas células foram disseminadas do tumor primário da próstata. Os autores sugeriram que perdas de regiões cromossômicas contendo genes de adesão celular confeririam a capacidade de progressão para doença metastática.

Os sítios mais freqüentemente afetados por metástases dos carcinomas primários de próstata são linfonodos, ossos, pulmões e, raramente, bexiga, fígado e cérebro (Dutt et al., 2000; Patel et al., 1989). Metástases testiculares constituem um evento raro sendo encontradas mais freqüentemente em necropsias (0,02 a 2,5% das necropsias) ou incidentalmente após orquiectomias terapêuticas para doença avançada. Os carcinomas prostáticos raramente emitem metástase para o testículo, havendo aproximadamente 200 casos descritos em literatura (Dutt et al., 2000).

Amostras provenientes de metástases são extremamente limitadas principalmente pelo fato, destes pacientes não serem submetidos à cirurgia para exereses da metástase e, muitas vezes, nem mesmo por exames de biópsias. Um dos primeiros relatos incluindo metástases é o de Cher et al.(1996) que analisaram, pela CGH, 31 amostras de tecidos de dois grupos de pacientes com CaP. O grupo I era constituído por 20 amostras de metástases prostáticas (18 linfáticas pélvicas, coletadas durante a prostatectomia radical, e duas ósseas). Os 18 pacientes com metástases linfáticas não receberam nenhum tratamento para o CaP prévios à cirurgia. Os dois pacientes com metástases ósseas foram tratados um mês antes da biópsia por terapia de privação androgênica. O grupo II era formado por 11 amostras, sendo quatro de tumores primários, 6 de tumores pélvicos recorrentes e uma de metástase do

epitélio escrotal, de 11 pacientes que apresentaram progressão da doença após longo tempo de terapia de privação de andrógenos. As alterações encontradas nos dois grupos analisados foram similares, sugerindo que tumores metastáticos não tratados apresentavam alterações cromossômicas necessárias para a recorrência ocorrida durante a privação de andrógenos.

No segundo estudo publicado, Alers *et al.* (2000) avaliaram pela CGH amostras de 56 pacientes (23 carcinomas primários de próstata, 18 metástases regional em linfonodos e 15 metástases à distância). Os autores encontraram um alto nível de ampliações nas regiões 1q21, 1q25 e Xq12-q23 em câncer metastático; um significativo acúmulo de alterações genéticas em metástases à distância, incluindo perda da região 10q24 e ganho de 7q11.2 e/ou 7q31. Identificaram também ganho de 7pq e/ou 8q em metástases a distância. Estas alterações foram consideradas como discriminadoras genéticas potenciais entre tumores primários e metastáticos.

Zitzelsberger *et al.*(2001) estudaram, pela CGH, amostras de 17 pacientes. Em 16 pacientes foram avaliados os adenocarcinomas de próstata, em 12/16 amostras de PIN e em 4/16 as metástases em linfonodos. Foram incluídos no estudo três glândulas não-neoplásicas (adjacentes aos tumores primários) e outra amostra de metástase. Os autores relataram uma grande heterogeneidade de perdas e ganhos cromossômicos, concordantes com dados da literatura, e uma nova região de perda em 4q foi descrita para os adenocarcinomas. Os resultados indicaram que há um acúmulo de alterações cromossômicas durante o desenvolvimento e progressão do câncer e uma origem precoce de aberrações tumor-específicas em áreas PIN.

Num estudo mais recente, Kraus *et al.* (2003) estabeleceram duas linhagens celulares de células epiteliais derivadas da medula óssea de pacientes com CaP, com a finalidade de realizarem novas estratégias de alta resolução para delinear as alterações genéticas associadas a metástases. A CGH cromossômica foi realizada simultaneamente com o DNA de um tumor primário e com o respectivo DNA da linhagem celular, a fim de comparar as alterações genéticas de ambos. Algumas alterações foram similares para o tumor primário e a respectiva linhagem celular, sendo as mais comuns as que incluíam ganho de material de 3p e uma relativa baixa representação de 8p em

relação a 8q. Esses resultados indicaram que as alterações cromossômicas encontradas na linhagem celular não eram resultado das condições de cultura, mas eram derivadas diretamente do tumor primário.

CGH- arrays

O método de triagem de alta resolução, CGH baseado em *microarrays* (CGH-arrays, CGH microarrays, CGH-matriz - aCGH), foi descrito em 1997 (Solinas-Toldo *et al.*, 1997). Este procedimento tem implicações importantes para a análise de genomas tumorais, para o desenvolvimento de biomarcadores preditivos e na identificação de genes envolvidos na progressão tumoral. A metodologia de aCGH permite a detecção quantitativa em alta resolução das alterações no número de cópias em genomas tumorais (Bruder *et al.*, 2001; Hui *et al.*, 2002; Hui *et al.*, 2001; Pinkel *et al.*, 1998; Veltman *et al.*, 2003; Snijders *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2004; Kempinski *et al.*, 2006; Saramäki *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2008), possibilitando também associações com características clínicas (Wilhelm *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2004; Tornillo *et al.*, 2005; Lapointe *et al.*, 2007). O princípio metodológico é semelhante ao da CGH cromossômica, entretanto, supera suas limitações de resolução pelo uso de clones imobilizados em uma lâmina de vidro em posição bem definida. Este aumento de resolução da técnica permite o aumento na detecção de não-balanceamentos genômicos em comparação com a CGH cromossômica (Rogatto e Rainho, 2004).

Como os clones contêm informações das seqüências que podem ser diretamente conectadas com bancos de dados genômicos, podem-se obter informações de genes particulares mapeados nas regiões envolvidas. Alterações de número de cópias detectadas por CGH-array facilitam a identificação de genes responsáveis pelo câncer, bem como doenças genéticas relacionadas à seqüência (Veltman *et al.*, 2002; Albertson e Pinkel, 2003; Mantripragada *et al.*, 2004, Shaffer e Bejjani, 2006; Shaffer e Bui, 2007; Andrieux, 2008; Davidsson *et al.*, 2008; Slavotinek *et al.*, 2008).

Para o nosso conhecimento, até o momento há 20 relatos em literatura usando CGH-array em adenocarcinomas de próstata (Clark *et al.*, 2003; Kraus *et al.*, 2003; Hermans *et al.*, 2004; Paris *et al.*, 2004; 2005; Wolf *et al.*, 2004;

2005; van Dekken *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2004, Brookman-Amissah *et al.*, 2005; van Duin *et al.*, 2005; Chaudhary e Schimdt, 2006; Iljin *et al.*, 2006; Verhagen *et al.*, 2006; Saramaki *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Vukovic *et al.*, 2007; Wicker *et al.*, 2007; Lapointe *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008). A **Tabela 1** apresenta um resumo dos relatos publicados, as diferentes plataformas utilizadas e os métodos de validação empregados em cada um desses estudos.

Tabela 1. Relatos publicados em câncer de próstata usando CGH-arrays, as diferentes plataformas e as metodologias de validação empregadas em cada estudo.

Autores	Plataforma usada	Amostras	Validação
Clark <i>et al.</i> , 2003	cDNA - 5603 seqüências conhecidas	Linhagens PC3, DU145, LNCaP	<i>Southern blot</i>
Kraus <i>et al.</i> , 2003	BACs, PACs e PI contendo 2464 seqüências	Linhagens PC-E1 e PC-r1	CGH cromossômico, M-FISH
Hermans <i>et al.</i> , 2004	BAC contendo 2400 seqüências	11 CaP Linhagens PC3, LNCaP, DU145 e TSU	Alelotipagem
van Dekken <i>et al.</i> , 2004	BACs - 2400 clones	10 CaP de arquivos	Nd
Yano <i>et al.</i> , 2004	BACs e PACs - 287 clones	11CaP	LOH, CGH cromossômico
Paris <i>et al.</i> , 2004	BAC – 2460 clones	64 CaP	RT-PCR em tempo real
Wolf <i>et al.</i> , 2004	16K cDNA array	Linhagens PC3, DU145, LNCaP e CWR22R	CGH cromossômico
Paris <i>et al.</i> , 2005	BACs – clones	64 CaP	Kattan nomograma
van Duin <i>et al.</i> , 2005	BAC com 702 contigs em 8q	4 CaP Linhagem PC3	FISH
Wolf <i>et al.</i> , 2005	cDNA - 16K seqüências	Nd	<i>Microarrays</i> para regiões NMD
Brookman-Amissah <i>et al.</i> , 2005	BACs 5800 clones	Linhagem de CaP derivada de um paciente e epitélio benigno	Marcadores de microsatélite
Verhagen <i>et al.</i> , 2006	BACs - 2600 clones	40 CaP	FISH e alelotipagem
Saramaki <i>et al.</i> , 2006	16K cDNA array	LinhagensLNCaP, PC3, DU145, 22Rv1 e LAPC4 13 CaP	qT-PCR e FISH
Chaudhary e Schimdt, 2006	BACs - 2632 clones	Linhagem DU145	qT-PCR
Iljin <i>et al.</i> , 2006	Oligonucleotideos CGH44A e 44B (Agilent Technologies)	19 CaP avançados e Linhagens VCaP, 22Rv1, DU145, LNCaP, e PC3	RT- PCR

Liu <i>et al.</i> , 2006	SNPs (single nucleotide polymorphisms) - 100K (Affymetrix GeneChip)	22 CaP e 22 amostras pareadas de tecido não-neoplásico	Nd
Vukovic <i>et al.</i> , 2007	Spectral genomics arrays	Linhagens DU145, PC3, LNCaP, e duas culturas 1532T e 1542T	SKY e mBAND
Wicker <i>et al.</i> , 2007	1 Mb <i>whole-genome</i> BAC e Oligonucleotídeos CGH44B (Agilent Technologies)	19 CaP	Nd
Lapointe <i>et al.</i> , 2007	cDNA - 22 K	55 CaP e 9 metástases em linfonodos pélvicos	FISH
Jiang <i>et al.</i> , 2008	cDNA - 14 K	48 CaP e 9 amostras de próstata não-neoplásicas	RT-PCR em tempo real

Nd: informações não disponíveis.

Estudos de alterações no número de cópias em CaP identificaram diversas regiões freqüentemente alteradas no genoma e levaram a identificação de importantes genes supressores tumorais e oncogenes. Alguns exemplos incluem o gene *PTEN* na região deletada 10q23 (Li *et al.*, 1997), *ATBF1* na deleção 16q22 (Sun *et al.*, 2005), *KLF5* na deleção 13q21 (Chen *et al.*, 2003), *AR* no ganho de Xq12 (Visakorpi *et al.*, 1995), e *MYC* no ganho em 8q24 (Jenkins *et al.*, 1997). No entanto, outros genes supressores tumorais e oncogenes existem nas regiões freqüentemente alteradas e contribuem para a vantagem seletiva das células tumorais. Além disso, não foram identificados genes específicos em outras regiões comumente deletadas, provavelmente devido à combinação de tamanhos relativamente grandes das regiões afetadas e/ou efeitos relativamente pequenos dos genes.

Vários métodos permitiram a identificação de alterações de número de cópias do DNA em CaP nos últimos 20 anos. No entanto, as diferentes resoluções dos métodos testados, o tamanho amostral, o tipo histológico e fonte (tumores primários/localizados, tumores metastáticos/recorrentes, linhagens celulares) tornam difícil a compreensão e a interpretação dos resultados e, conseqüentemente, sua aplicação na prática clínica. Contudo, vários candidatos a biomarcadores moleculares têm resultado destes estudos e alguns deles com grande potencial para aplicação ao diagnóstico, prognóstico e resposta a tratamento.

Sun *et al.* (2007) fizeram uma revisão de todos os estudos publicados (até abril de 2006) no banco de dados PubMed que avaliaram alterações

genômicas por CGH em câncer de próstata. A maioria desses estudos utilizou a metodologia CGH cromossômico e menos de 8% avaliaram os tumores por CGH-array. Foram incluídos 41 estudos, com 872 tumores de próstata numa análise combinada para estimar a frequência das alterações em cânceres avançados e localizados. A frequência de perdas ou ganhos foi estimada para cada uma das 850 bandas baseando-se no número de tumores que tinham perdas ou ganhos entre todos os tumores examinados. Enquanto a região cromossômica 8p foi a mais comumente envolvida em perda, ocorrendo em aproximadamente um terço de todos os tumores e em metade dos tumores avançados, 8q foi a região mais comum de ganho, afetada em cerca de um quarto de todos os tumores e em metade de todos os tumores avançados. A segunda e a terceira regiões de perdas mais frequentes foram 13q e 6q e a segunda região de ganho mais freqüente foi 7q, envolvida em cerca de 10% de todos os tumores e em aproximadamente um quarto dos tumores avançados. Segundo os autores, os resultados dessa análise evidenciando as regiões cromossômicas mais freqüentemente envolvidas em perdas ou ganhos nos diferentes estudos avaliados, sugerem que essas regiões devem ser priorizadas na busca por genes supressores tumorais e oncogenes no CaP.

OBJETIVOS

- Analisar o perfil de ganhos e perdas genômicas pela metodologia de HR-CGH em três diferentes grupos: **grupo I** – tumores primários e metástases (dos mesmos pacientes); **grupo II** - amostras de pacientes com seguimento clínico superior a 10 anos e sem evidência de recorrência e ou metástase; **grupo III** – avaliar a heterogeneidade genética em diferentes focos tumorais de um mesmo paciente;
- Comparar os resultados da HR-CGH com os de CGH-array (metodologia empregada em um outro estudo da equipe, realizada em um subgrupo destas amostras) em tumores primários e metástases e nas amostras do grupo II para identificar regiões genômicas candidatas a marcadores de metástase;
- Validar genes candidatos envolvidos em perdas e ganhos consensos, utilizando a metodologia RT-PCR quantitativa em tempo real ou imunohistoquímica
- Comparar e correlacionar os resultados da pesquisa com os dados clínicos, histopatológicos e de seguimento clínico.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da amostra

As amostras utilizadas nesse estudo foram obtidas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP, com a colaboração do Dr. José Carlos Souza Trindade Filho, Departamento de Urologia e do Dr João Lauro Vianna de Camargo, Departamento de Patologia. O tempo de seguimento clínico dos pacientes variou de um mês a treze anos. Todas as amostras desse estudo foram coletadas antes do paciente receber qualquer tratamento hormonal ou radioterápico. Este projeto foi aprovado pelo CONEP (Parecer 304/2000, **Anexo**) e todos os pacientes ou familiares assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que se encontram nos arquivos do Hospital.

Para a análise de HR-CGH as amostras foram divididas em três grupos (**Tabela 2**). O grupo I compreende amostras pareadas de tumor primário e metástase do mesmo paciente (11 casos). Todos estes casos apresentaram metástase ao diagnóstico. O grupo II é composto por casos que apresentaram seguimento clínico favorável por mais de 10 anos (5 casos). O grupo III é composto por focos tumorais coletados de diferentes localizações prostáticas do mesmo paciente submetido a prostatectomia radical e com curto período de seguimento clínico (5 pacientes com 2 amostras cada).

Na análise de validação de genes candidatos (investigação da expressão de transcritos pela RT-PCR quantitativa em tempo real) foram utilizadas 75 amostras tumorais a fresco (provenientes de prostatectomia radical), 19 amostras de tecidos normais adjacentes ao tumor (margem cirúrgica), seis casos de hiperplasias nodular de próstata (HNP), duas amostras de tecido prostático normal obtidas de necropsias de homens com idade inferior a 49 anos. Além disso, foram obtidas 18 amostras de carcinoma de próstata fixadas em parafina. Na **Tabela 3** estão apresentadas as amostras incluídas neste estudo e as características clínicas e histopatológicas dos pacientes.

Tabela 2. Informações clínicas dos pacientes selecionados para o estudo de HR-CGH e CGH-array.

Nº	Caso	Tumor primário	Metástase de CaP	Idade	Escore de Gleason	PSA (ng/mL)		TNM	História familiar de câncer	Tratamento pré ou pós cirúrgico/biópsia	Data cirúrgica/ biópsia - último retorno	Seguimento (meses)
						pré-cirúrgico/ biópsia	pós-cirúrgico/ biópsia					
Grupo I												
1	P1[†]	Adenocarcinoma de próstata (+)	Óssea (+)	59	8(5+3)	50,52	n.r.	T3aNxM1b	Não	Não	17/06/96-23/06/97	12* - doença metastática disseminada
2	P2	Adenocarcinoma de próstata (-)	Óssea (+)	67	n.r.	n.r.	n.r.	TxNxM1b	Tios Ca?	Não	01/03/93-15/09/93	6 - óbito pela doença
3	P3[†]	Adenocarcinoma de próstata (+)	Linfonodo (+)	77	7(5+2)	n.r.	n.r.	T3NxM1a	Não	Não	28/02/89-10/01/03	167* - doença metastática disseminada
4	P5	Adenocarcinoma de próstata (-)	Óssea (+)	85	9(5+4)	4,57	n.r.	T2NxM1b	Não	Orquiectomia bilateral 21/08/92 , negativo para neoplasia	21/08/92-14/09/92	1* - doença metastática disseminada

5	P7	Adenocarcinoma de próstata (+)	Linfonodo (-)	70	7(3+4)	n.r.	290,04	T3N1Mx	Não	Orquiectomia bilateral 21/07/99 , negativo para neoplasia	10/04/95-14/03/00	59*
6	P8	Adenocarcinoma de próstata (-)	Óssea (+)	82	n.r.	n.r.	n.r.	T3NxM1b	Não	Orquiectomia bilateral 08/04/88 , negativo para neoplasia	08/04/88-11/07/88	3* - doença metastática disseminada
7	P9[†]	Adenocarcinoma de próstata (+)	Linfonodo (+)	61	9(4+5)	12,17	2,53	T3N1Mx	Não	Hormonal: Androcur e Zoladex desde 09/2002	05/06/02-13/09/05	39
8	P11[†]	Adenocarcinoma de próstata (+)	Testículo (+)	53	5(2+3)	66,25	n.r.	T3NxM1c	n.r.	n.r.	17/05/96-24/05/96	Perdido Seguimento
9	P12	Adenocarcinoma de próstata (+)	Testículo (+)	47	9(5+4)	29,0	1836,54	T3aN0M1c	Não	Orquiectomia bilateral 03/03/83 , positivo para neoplasia. Hormonal: Androcur desde 28/01/02 . Radioterapia em 08/2004 .	18/12/01-28/12/04	36 – doença metastática disseminada, óbito pela doença em 28/12/04
P13[†]		Adenocarcinoma de próstata (+)	Testículo (+)	73	9(5+4)	212,0	n.r.	T3NxM1c	n.r.	Orquiectomia bilateral 16/06/83 , positivo para neoplasia.	12/11/02-16/06/03	Perdido Seguimento

11	P14 [†]	Adenocarcinoma de próstata (+)	Testículo e implante peritoneal (+)	61	9 (4+5)	85,0	150,0	T3NxM1c	n.r.	Orquiectomia Direita 11/08/83 , negativo para neoplasia – Criptorquidia esquerda – orquiectomia 08/03/84 , positivo para neoplasia.	09/03/04- 16/08/04	5*
----	------------------	--------------------------------	-------------------------------------	----	---------	------	-------	---------	------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------	----

Grupo II

1	78	Adenocarcinoma de Próstata (+)	Negativa	69	7(3+4)	8,1	0,03	pT3aN0M0	Não	Não	01/1993- 03/2005	146
2	P29 [†]	Adenocarcinoma de Próstata (+)	Negativa	68	5(2+3)	10,5	0,02	T2cN0M0	Ti _o CaP ?	Não	15/07/96- 12/2006	125
3	P30 [†]	Adenocarcinoma de Próstata (+)	Negativa	61	6(3+3)	0,4	0,0	T2cN0M0	Não	Não	11/12/96- 12/2006	120

4	P31[†]	Adenocarcinoma de Próstata (+)	Negativa	71	Grau 3 (não consta o escore)	n.r.	1,75	pT1bN0M0	Irmãos Ca ?	Radioterapia em 08/1987	16/07/87-08/06/05	215 – óbito por outras causas
5	P32[†]	Adenocarcinoma de Próstata (+)	Negativa	70	6(3+3)	n.r.	0,1	T2cN0M0	n.r.	Hormonal: Zoladex de 1999 a 2001 Androcur desde 2001	02/10/96-16/11/06	121
Grupo III												
1	15	Adenocarcinoma de próstata (+)	Negativa	68	7(3+4)	12,10	0,10	T2bN0M0	Irmão Ca pâncreas, primo Ca?	Não	18/04/01-3/5/2003	25*
2	48[†]	Adenocarcinoma de próstata (+)	Negativa	56	6(3+3)	2,5	0,0	pT2bN0M0	Pai CaP ? Irmão HNP	Não	15/08/01-06/2007	88
3	70[†]	Adenocarcinoma de próstata (+)	Negativa	71	7(4+3)	9,94	0,03	T2cN0M0	n.r.	Não	08/11/01-05/2004	74 - óbito por enfisema pulmonar
4	166	Adenocarcinoma de próstata (-) e PIN (+)	Negativa	65	8(3+5)	6,93	n.r.	T2cN0M0	Não	Não	12/05/05- n.r.	Perdido Seguimento

5	177	Adenocarcinoma de próstata (+)	Negativa	61	7(3+4)	11,0	0,0	T2cN0M0	Não	Não	15/02/06- 24/04/07	14
Total de 21 pacientes												

(+) Casos avaliados também por CGH-array; (+) amostra utilizada nesse estudo, (-) amostra não incluída, (n.r.) não referido, (*) sem informações recentes,(?) tipo de câncer não determinado, (HNP) Hiperplasia nodular de próstata, (PIN) Neoplasia Intraepitelial de Próstata.

Tabela 3. Caracterização clínica, histopatológica e dados de seguimento dos pacientes cujas amostras foram usadas na análise de expressão gênica

Nº	Caso	Idade	Escore de Gleason	PSA pré (ng/mL)	PSA pós (ng/mL)	pTNM*	História Familiar de Câncer	Metástase, outro câncer primário ou outra informação	Data cirurgia/ óbito- Último retorno	Seguimento (meses)
Carcinoma de Próstata (CaP) a fresco										
1º	1T	65	7(4+3)	13,94	0,23	pT2b	-	-	12/11/2001 13/5/2008	78
2	2T	56	7(3+4)	21,9	0,46	pT3b	-	Ca língua	3/9/2001 9/2/2006	53
3	3T	64	7(4+3)	9,2	0,03	pT3a	-	-	24/4/2002 24/9/2004	29
4	4T	72	7(4+3)	7,32	0	pT3a	-	-	25/8/2003 5/4/2006	31
5	7T	55	7(4+3)	14	0,92	pT3a	-	-	11/4/2003 1/1/2008	57
6	8T	48	7(3+4)	7,6	0,05	pT2b	-	-	19/5/2003 1/1/2008	55
7	9T	58	7(3+4)	8,6	0,05	pT2b	+	-	12/12/2003 16/1/2008	49

21/11/2003

8	10T	61	7(3+4)	17,8	0,94	pT2b	-	Linfoma	15/4/2008	53
16/6/2004										
9	11T	54	7(3+4)	7,3	0,05	pt2a	-	-	22/2/2005	8
23/6/2004										
10	12T	60	7(3+4)	4,22	0,94	pT3a	-	-	26/1/2006	19
3/7/2004										
11	13T	64	7(3+4)	7,5	0,05	pT3a	+	-	24/1/2008	43
2/7/2004										
12	14T	71	7(3+4)	7,1	0,2	pT3a	-	CEC laringe	25/3/2008	45
9/8/2004										
13	15T	56	7(3+4)	9,6	0,05	pT4a	-	-	14/3/2008	43
9/12/2005										
14	16T	66	7(3+4)	33,61	0,3	pT2b	-	-	30/4/2008	29
8/11/2004										
15	17T	55	7(4+3)	22,1	0	pT3a	-	-	30/3/2007	29
22/10/2004										
16	18T	72	7(3+4)	6,8	0,05	pT3a	-	-	10/4/2008	42

13/12/2004

17	19T	60	7(3+4)	5,2	0,05	pT3a	-	-	5/3/2008	39
7/4/2005										
18	20T	79	7(4+3)	8,63		pT2b	-	-	6/2/2007	22
1/6/2005										
19	21T	62	7(3+4)	20,28	0,32	pT3a	-	-	13/2/2008	32
23/6/2005										
20	22T	73	7(3+4)	21,87	0,12	pT3b	+	-	1/7/2008	36
25/7/2005										
21	23T	63	7(3+4)	7,6	0,4	pT3a	-	-	22/1/2008	30
28/7/2003										
22	24T	50	7(3+4)	18,16	1,76	pT2b	+	-	5/9/2005	25
3/6/2002										
23	25T	57	7(3+4)	4,6	0,03	pt2a	-	-	2/6/2006	48
28/9/2002										
24	26T	58	7(3+4)	2,4	0	pT2b	+	-	5/3/2008	65
18/1/2003										
25	27T	69	7(3+4)	20,3	0	pT4a	-	-	1/1/2006	35

										9/2/2004	
26	28T	62	7(3+4)	5,74	0,05	pT2b	-	-		11/3/2008	49
27	29T	65	7(4+3)	16,5	0,05	pT3a	-	Ca pulmão		28/7/2004	44
28	30T	70	7(3+4)	10,3	0,01	pT3a	-	-		27/8/2004	18
29	31T	61	7(3+4)	5,7	0,05	pt2a	-	-		5/1/2004	30
30	32T	63	7(3+4)	3,93	0,01	pT2b	-	-		10/12/2004	34
31	33T	67	7(3+4)	23,3	0,42	pT3b	-	-		16/2/2005	31
32	34T	74	7(3+4)	6,3	0,05	pt2a	-	-		27/4/2005	36
33	35T	60	7(3+4)	32,05	0,31	pT3a	-	-		1/7/2006	5
34	36T	68	7(3+4)	6,21	0,02	pT2b	-	-		2/9/2006	21

Perdido seguimento

									28/11/2005
53	174	60	6(3+3)	8,09	0	pT2c	-	26/10/2007	23
								15/2/2006	
54	176	62	7(4+3)	37,21	0,2	pT3a	-	23/8/2007	18
								15/3/2006	
55	181	71	7(3+4)	9,5	0,02	pT2c	Irmãos CaP	8/4/2008	25
								22/3/2006	
56	182	65	6(3+3)	5,38	0	pT2c	-	23/10/2007	19
								5/4/2006	
57	184	64	8(5+3)	7,39	0,3	pT3a	Pai Ca Bexiga	22/1/2008	21
								27/4/2006	
58	186	53	8(3+5)	11,36	0	pT3a	-	17/10/2007	18
								19/4/2006	
59^b	187	63	7(3+4)	5,48	1,08	pT2c	Irmão CaP	7/1/2008	21
								3/5/2006	
60^b	188	65	7(3+4)	7,22	0,84	pT2c	Mãe Ca mama	14/9/2007	20
61	189	70	7(3+4)	6,87	0	pT3a	-	11/5/2006	19
							Ca basocelular em face		

14/12/2007

62	190	71	6(3+3)	3,1	0	pT2c	-	17/5/2006	20
63	195	59	7(3+4)	21,4	0,04	pT2c	-	22/4/2008	20
64	198	49	7(3+4)	4,1	0	pT2c	-	16/10/2007	11
65	199	65	6(3+3)	7,3	0	pT2c	-	16/9/2007	10
66	200	60	7(3+4)	11,67	0	pT3a	-	27/3/2007	4
67	201	64	7(4+3)	37,95	0,7	pT3b	-	6/11/2007	17
68	202	71	7(3+4)	13,75	0	pT2c	-	28/8/2007	7
69	203	69	8(3+5)	>4,0	0	pT3a	-	21/6/2007	16
70	205	67	7(3+4)	5,96	0,03	pT2c	-	28/2/2007	9

27/11/2007

71	207	56	7(3+4)	8,5	0,2	pT2c	-	Ca renal e metástase hepática	25/3/2008	10
									14/3/2007	
72	209	52	6(3+3)	4,5	0	pT3a	-		25/4/2007	7
									27/11/2007	
73	213	65	6(3+3)+ áreas 5	7	0	pT3a	-		18/7/2007	4
									9/11/2007	
									2/8/2007	
74	217	62	6(3+3)	6,95	nd	pT3a	-	Perdido seguimento		Nd
									15/8/2007	
75	218	74	6(3+3)	4,84	nd	pT2c	-	Perdido seguimento		Nd
Hiperplasia Nodular de Prostata (HNP) a fresco										
1	160	68	7(4+3)	4,64	0	pT2c	-		26/1/2005	30
									10/7/2007	
2	208	72	5(2+3)	8,56	3,85	pT2c	-		26/3/2007	12
									25/3/2008	
									23/5/2007	
3	211	67	6(3+3)	7,8	0	pT2c	-		9/1/2008	8

		áreas 5				8/1/2008		
				17/10/2006				
					Perdido seguimiento		Nd	
7	196	64	9(4+5)	7	s.i.	pT3b	-	
								14/2/2007
8	204	63	6(3+3)	6,97	0	pT2c	-	3
								28/2/2007
9	205	67	7(3+4)	5,96	0,03	pT2c	-	9
								7/3/2007
10	206	61	7(3+4)	7,77	0	pT2a	-	10
								26/3/2007
11	208	72	5(2+3)	8,56	2,07	pT2c	-	12
								23/5/2007
12	210	68	6(3+3)	11,08	0	pT2b	-	8
								23/5/2007
13	211	67	6(3+3)	7,8	0	pT2c	-	8
								4/7/2007
14	212	52	6(3+3)	nd	0,29	pT2a	-	1
15	213	65	6(3+3)+	7	0	pT3a	-	4

areas 5				9/11/2007						
<hr/>										
20/7/2007										
16	214	68	7(3+4)	8	0	pT3a	-	-	13/11/2007	4
19/7/2007										
17	215	52	6(3+3)	3,97	0	pT2a	-	-	5/11/2007	4
1/8/2007										
18	216	75	6(3+3)	9,44	0	pT2c	-	-	25/9/2007	1
2/8/2007										
19	217	62	6(3+3)	6,95	0	pT3a	-	-	Perdido seguimento	12
Tecido prostático normal (amostras de necropsias) a fresco										
1º										
1	SVO	40	nd	nd	nd	nd	-	-	2/2/2007	óbito por outras causas
3º										
2	SVO	49	nd	nd	nd	nd	-	-	12/2/2007	óbito por outras causas
Carcinoma de Próstata (CaP) em blocos de parafina										
28/3/2001										
1	1F1	68	6(3+3)	10,5	1,12	T2a	-	-	25/5/2007	74
2	22F2	63	7(3+4)	5,13	0	T2c	-	-	02/05/2001	75

08/08/2007

3^c	27F1	67	9(4+5)	39,32	0,47	T3c	-	08/08/2007	78
4	40F1	69	6(3+3)	4,59	0	T2b	-	11/05/2006	59
5	46F1	66	8(5+3)	9,94	0,02	T3c	-	11/07/2001 22/11/2002	16
6	48F2	56	6(3+3)	2,48	0	T2	Pai CaP? e irmão HNP	15/8/2001 11/6/2007	70
7	65F1	65	7(3+4)	3,38	0	T2c	Pai CaP	31/10/2001 11/07/2007	69
8^{a,d}	74F2	52	9(4+5)	12,39	0	T2c	Quimioterapia antes PTR (tumor abdominal)	5/12/2001 11/7/2007	67
9	78F1	69	6(3+3)	8,1	0	T3a	-	03/04/2002 04/01/2007	57
10	80F1	56	8(3+5)	25,7	0,42	T3c	-	29/04/2002 28/09/2007	65
11	83F1	66	7(3+4)	7,33	0,05	T2c	Pai com CaP Mãe Ca fígado	15/5/2002 30/1/2006	43
12	85F1	72	6(3+3)	8,76	0	T2c	-	5/6/2002	63

4/9/2007

13	88F1	65	8(4+4)	6,8	0,4	T3a	Irmão CaP	-	5/6/2006	46
11/9/2002										
14	91F1	63	6(3+3)	9,16	0	T2a	Irmão HNP - primo CaP	-	6/8/2007	59
29/06/2005										
15	168F1	70	9(5+4)	4,45	0	T3a	filha Ca mama	-	19/10/2007	28
13/07/2005										
16	169F1	53	6(3+3)	1,53	0	T2c	-	-	10/01/2008	30
12/4/2006										
17	185F1	59	7(3+4)	3,5	0	T3a	-	-	7/1/2008	21
15/7/1996										
18	P29	68	5(2+3)	10,5	0,02	?	Tio CaP	-	1/12/2006	125

Tecido prostático normal (amostras de necropsias) em blocos de parafina

1	SVO 3	49	nd	nd	nd	nd	-	-	12/2/2007	óbito por outras causas
2	SVO 4	52	nd	nd	nd	nd	-	-	27/2/2007	óbito por outras causas

(*) todos os pacientes desse estudo apresentaram N0 e M0 ao diagnóstico; **(a)** orquiectomia bilateral; **(b)** radioterapia; **(c)** hormonioterapia; **nd.:** informação não disponível; **PTR:** prostatectomia radical; **HD:** hipótese diagnóstica; **Ca:** câncer.

Processamento do Tecido

Amostras congeladas

As amostras a fresco de carcinomas prostáticos, primários e não tratados, coletadas e armazenadas a -80°C foram microdissecadas manualmente. A partir de cortes de congelação seqüenciais de 5 µm, realizado em criostato (*Leica*), foram preparadas lâminas como referência, sendo coradas com hematoxilina e eosina (*HE*). Utilizando-se microscópio óptico delimitou-se a área de maior concentração de células tumorais (>80%) e sob lupa estereoscópica se deu a microdissecção. A primeira e a última lâmina resultantes da porção da região microdissecada foram coradas com hematoxilina-eoxina para avaliação da consistência entre ambas.

Para a análise de qRT-PCR as amostras congeladas foram microdissecadas após ser delimitada a região de maior concentração de células tumorais (>80%) nas lâminas de referência (coradas com *HE*). Para que o material permanecesse congelado, foi utilizado nitrogênio líquido durante o procedimento. Utilizou-se lâminas de corte novas (*Disposable Microtome Blades - Leica*) e material estéril (pinças, placas de Petri, tubos de 1,5mL) para a manipulação dos tecidos.

Amostras de arquivo em blocos de parafina

Além das amostras a fresco, foram incluídas amostras de arquivo em blocos de parafina na análise de HR-CGH, as quais foram microdissecadas a laser. As amostras incluídas em parafina passaram por cortes histológicos de 5-10 µm para a confecção de lâminas. Os cortes foram então microdissecados a laser para seleção e captura de 500-2000 células tumorais, com a utilização do aparelho *Pix Cell II Laser Capture Microdissection* (Arcturus, Inc., Califórnia, EUA), pertencente ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina – UNESP Botucatu, com a colaboração da Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira.

As amostras de arquivo em blocos de parafina (**Tabela 3**) utilizadas na validação por qRT-PCR foram microdissecadas manualmente com a utilização de *punchs* estéreis de 4-5mm de diâmetro de acordo com o tamanho da área tumoral. Lâminas contendo cortes histológicos de cada bloco foram avaliadas e sendo

selecionados apenas os blocos que continham uma concentração de área tumoral maior que 5 mm de diâmetro e, nessa área, a prevalência de mais de 70% de células tumorais. De cada região microdissecada (fragmento) foi dado o escore de Gleason, sendo este o constante na **Tabela 3**.

Métodos utilizados na análise de HR-CGH

Extração de DNA

O tecido tumoral microdissecado e o resultante da microdissecção a laser, aderido ao *Cap Sure*, foram colocados em tubos de microcentrífuga. O DNA foi então extraído segundo o procedimento de Isola *et al.*, (1994) com modificações. Brevemente, os cortes microdissecados foram submetidos a retirada da parafina com xilol, lavagem em álcool, e em seguida incubados em tampão de digestão (10 mM Tris pH 8,3; 1 mM EDTA; 0.5% Tween 20; 500 ug/mL de Proteinase K) durante 12 horas a 37°C. Os tubos com as amostras microdissecadas a laser foram invertidos para permitir a ação dos tampões de digestão, procedeu-se a centrifugação e então o *cap* foi removido e observado para verificar a permanência de células não-digeridas.

Em seguida, a enzima foi inativada por aquecimento a 95°C durante 10 minutos. O DNA foi extraído utilizando-se 1mL de solução de fenol saturado, seguido de 1mL solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e por fim 1mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O sobrenadante final foi transferido para outro tubo onde foi feita a precipitação do DNA adicionando-se etanol absoluto gelado e acetato de amônio 7M que permaneceu durante a noite a -20°C. Após centrifugação a 14.000 rpm por 20 minutos o precipitado obtido foi dissolvido e quantificado em espectrofotômetro (*Nanodrop Technologies*, USA).

SCOMP (Single Cell Comparative Genomic Hybridization)

O DNA obtido (300-1200ng) foi diretamente utilizado na metodologia de SCOMP. As reações de clivagem com a endonuclease de restrição *MseI*, ligação dos adaptadores e primeira amplificação pela PCR foram realizadas no mesmo tubo para prevenir a perda de fragmentos genômicos. Inicialmente, o DNA foi submetido à

clivagem com 24U da endonuclease de restrição *MseI* (alta concentração, *New England Biolabs*), em tampão universal (10mM de Tris-acetato pH 7.5, 10mM de acetato de magnésio, 50mM de acetato de potássio) a 37°C durante 3 horas. A enzima foi inativada a 65°C durante 5 minutos.

Em um tubo separado, os adaptadores foram formados pelo pareamento dos oligonuclotídeos LIB1 (5'-AGTGGGATTCCTGCTGTCAGT-3') e ddMseI (5'-TAACTGACAGCdd-3'). Uma solução contendo 15nM de cada oligonucleotídeo em tampão universal foi submetida a um gradiente decrescente de temperatura de 65° a 15°C (1 minuto por °C). Após o pareamento dos oligonucleotídeos adaptadores, foram adicionados 1µL de dATP 10mM e 5U de T4 DNA ligase (*Invitrogen – Life Technologies*). Esta mistura foi transferida ao DNA tratado com a endonuclease *MseI* e incubada a 15°C por 12 horas.

Após a ligação dos adaptadores, utilizou-se o kit *Expand Long PCR System* (Roche) para a amplificação primária. A reação foi realizada em um volume final de 41µL contendo 2.5mM de cada dNTP, 3,0µL de Expand Long Template buffer 1, 1,0µL Expand Long Template Pol. Mix 3,5U/µL e 35µL de água ultra pura estéril. A amplificação foi realizada em um termociclador programável PTC 200 (*MJ Research*) e consistiu de 1 ciclo de 68°C por 3 minutos; 15 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 30 segundos com 1 segundo adicional/ciclo; 8 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos com 1 segundo adicional/ciclo e 68°C por 1 minuto e 45 segundos com 1 segundo adicional/ciclo; 22 ciclos de 94°C por 40 segundos, 65°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto e 53 segundos com 1 segundo adicional/ciclo e 1 ciclo de 68°C por 3 minutos e 40 segundos. Os produtos amplificados foram purificados usando o *QIAquick PCR Amplification Kit* (QIAGEN).

Incorporação de Nucleotídeos Marcados

Dois µL do produto purificado de cinco dessas amostras foram utilizados como molde numa segunda reação de amplificação para marcação dos fragmentos. As condições de reação foram de 3,0µL de Expand Long Template buffer 1, 6,0µL do oligonucleotídeo LIB1 10µM, 8,75mM de 7/8 Nucleotide Mix 10mM de cada dGTP, dATP e dCTP, 5mM de dTTP e 1,75µL de digoxigenina 11-dUTP (para o DNA de referência) ou biotina 16-dUTP (para o DNA teste). As condições de amplificação foram de 1 ciclo de 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos; 10

ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos com 20 segundos adicionais/ciclo.

O oligonucleotídeo LIB1 foi removido pelo tratamento com a enzima de restrição *TruI*, conforme as instruções recomendadas pelo fornecedor. A enzima foi inativada a 65°C por 3 horas. Alíquotas contendo 8µg de DNA teste (marcado com biotina 16-dUTP) e 8µg do DNA de referência (marcado com digoxigenina 11-dUTP) foram co-precipitadas na presença de Human Cot-1 DNA e de DNA de espermatozóide de salmão. Foram adicionados 10µL de acetato de sódio 3M e 400µL de etanol absoluto gelado. O tubo foi mantido a -20°C durante 12 horas ou, alternativamente, a -70°C durante 1 hora. Após centrifugação a 14000 rpm, 4°C durante 45 minutos, o precipitado foi lavado em etanol a 70%, centrifugado e seco a temperatura ambiente.

Hibridação Genômica Comparativa de Alta Resolução (HR-CGH)

Os DNAs foram dissolvidos em 30µL de Hybrisol VII à 75°C por 15 minutos e mantidos à 37°C por, no mínimo, 1h para pré-anelar.

Para o preparo das lâminas, foram separadas aquelas com metáfases obtidas a partir da cultura de linfócitos (Moorhead et al., 1960), de boa qualidade, sem sobreposições e idade aproximada de 30 dias estocadas em temperatura ambiente. As lâminas foram desidratadas em etanol 70%, 80% e 90% por 5 minutos cada, e secas em temperatura ambiente. Após a secagem das lâminas incubou-se em 10% pepsina e 0,01N HCl a 5min (37°C). As lâminas foram transferidas em 2XSSC por 5 min (37°C), seguidas de desidratação em série de etanol 70%, 80% e 90%. Incubaram-se as preparações cromossômicas em 70% formamida/2XSSC durante 2 minutos à 72°C para desnaturação. Após a desnaturação, transferiu-se imediatamente para uma série de etanol 70%, 80% e 100% gelado por 5 minutos cada. A hibridação se processou após a secagem da lâmina pela adição da sonda em lamínula, aplicação sobre a lâmina, vedação com *rubber cement* e incubação em câmara escura à 37°C por 72 horas. Posteriormente se processou a lavagem em formamida 50%/2XSSC por 5 minutos, duas vezes à 45°C (solução pré-aquecida). Bloqueio com 20µL de *Block I* (0,1M Tris HCL; 0,15M NaCl; 0,5%BSA – Boehringer, Mannheim, Germany) e 20µL de TNB (0,1% Tween 20; 3%BSA; 4XSSC) por 30 minutos à 37°C (câmara escura). O DNA biotilado foi detectado utilizando avidina-fluoresceína isotiocianato (FITC) (Roche), enquanto o DNA com a digoxigenina foi detectado pelo uso de anti-dig-

rodamina (Boehringer Mannheim, Germany), na proporção de 9:1. As lâminas foram sobrepostas com lamínula e incubadas em câmara escura durante 30 minutos à 37°C. Procedeu-se a lavagem em 2XSSC/0,1% de Tween 20 à 45°C durante 5 minutos, por quatro vezes. As lâminas foram contra-coradas com 25µL de DAPI/Antifade (Vector).

Análise dos dados

Foi utilizado o sistema HR-CGH da *Applied Spectral Imaging* (Version 4.0) para captura e análise da imagem. O *software* utilizado para a análise das imagens calcula uma média de FITC:rodamina e expressa este achado como um padrão verde:vermelho para cada metáfase com um limite de 99,5% de confiança. O limite inferior e superior para definição de ganhos e perdas foi estabelecido por um experimento de CGH controle com IMR32, uma linhagem celular de neuroblastoma. Foi construída uma biblioteca de amostras normais marcadas diferencialmente para que fosse utilizado o sistema de Hibridação Genômica Comparativa de Alta Resolução (HR-CGH). Foram utilizadas cinco amostras (normal X normal) marcadas diferencialmente (biotina X digoxigenina). Foram capturadas e analisadas 40 metáfases de cada uma delas. Os intervalos de referência são extraídos da biblioteca que delimita o padrão normal dos experimentos considerando os mesmos critérios de seleção de metáfases, padrão de hibridação e condições gerais de análise pelo programa usado. O intervalo de referência é assinalado em azul e representa o intervalo de confiança normal. As barras indicando perdas (vermelho) e ganhos (verde) aparecem quando o intervalo de referência da amostra não se sobrepõe ao do intervalo de referência. O arquivo gerado da biblioteca de casos normais foi utilizado na comparação de cada um dos casos.

Para cada caso, foram capturadas 20-25 metáfases, analisadas por bandamento G reverso numa resolução de 800 bandas. Cromossomos sobrepostos foram excluídos da análise. Na análise do perfil de interpretação para ganhos e perdas foram consideradas somente células que mostraram um padrão homogêneo de hibridação (em média 15 a 18 células).

Métodos utilizados na validação por qRT-PCR

Isolamento do RNA total das amostras congeladas

A extração de RNA total foi realizada com a utilização do *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante. Em resumo, aproximadamente 30mg de tecido tumoral microdissecado foi adequadamente pulverizado em cadinho com nitrogênio líquido. Após a pulverização, adicionou-se 600µL do tampão RLT que permaneceu em temperatura ambiente até adquirir consistência líquido-viscosa pela lise das células do tecido. Esse material foi transferido para um tubo de 2mL, agitado manualmente durante 1 minuto e centrifugado por 3 minutos a 13.200 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo e foi adicionado 350µL de etanol 70% (preparado com água DEPC - Diethylpyrocarbonate). Essa mistura foi transferida para a mini coluna acoplada em tubo coletor e foi centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Adicionou-se 700µL do tampão RW1 na mini coluna e centrifugou-se por 15 segundos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. A seguir, 500µL do tampão RPE foi adicionado na mini coluna e esta foi centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. A lavagem da mini coluna com o tampão RPE foi repetida. Após centrifugar a mini coluna por 2 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente, esta foi transferida para um tubo de 1,5mL e foi adicionado nela de 15 a 25µL de água livre de RNase, de acordo com a quantidade de amostra. A mini coluna acoplada ao tubo foi centrifugada por 1 minuto a 10.000 rpm em temperatura ambiente. O RNA foi incubado por 2 minutos a 65°C e em seguida colocado imediatamente em gelo.

Em quatro amostras (172, 176, 187 e 190) foi utilizado o protocolo de extração de RNA por Trizol (Invitrogen). Aproximadamente 30mg de tecido tumoral microdissecado foi adequadamente pulverizado em cadinhos com nitrogênio líquido. Após a pulverização, adicionou-se 1mL de Trizol, que permaneceu em temperatura ambiente até adquirir consistência líquido-viscosa pela lise das células do tecido. Esse material foi transferido para um tubo de 2mL que foi levado ao vórtex (20 segundos) e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir foi adicionado 300µL de clorofórmio, homogeneizado, incubado por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 14.000 rpm a 2°C por 25 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de 1,5mL, onde se adicionou 500µL de isopropanol gelado para a precipitação do RNA. O tubo contendo a fase aquosa foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e depois foi centrifugado durante 30 minutos a 14.000 rpm a 2°C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA foi lavado com 1000µL de etanol 75% (diluído em água DEPC). Centrifugou-se por mais 15

minutos a 14.000 rpm a 2°C e, após remoção do sobrenadante, o material foi mantido em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos para secagem do *pellet*. O RNA foi ressuscitado em 25µL de água DEPC, incubado por 15 minutos a 65°C e, em seguida, colocado imediatamente em gelo durante 5 minutos.

Isolamento do RNA total das amostras de blocos de parafina

Para a extração das amostras em blocos de parafina usou-se o *Kit Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit FFPE Tissues* (Ambion), segundo as recomendações do fabricante. Em resumo, o fragmento microdissecado, contendo aproximadamente 35mg, foi adequadamente pulverizado em criotubos com o auxílio de bastões de vidro estéreis e nitrogênio líquido. Após a pulverização, adicionou-se 1mL de xilol (Merck) para a retirada da parafina. Essa mistura foi agitada em *vórtex*, aquecida a 50°C por 3 minutos e centrifugada por 2 minutos em temperatura ambiente em velocidade máxima. Essa lavagem foi repetida por mais duas vezes. O xilol foi removido, o sedimento foi lavado com 1mL de etanol 100% (Merck) e novamente centrifugado por 2 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez. O etanol foi removido e a amostra foi seca ao ar por 15 minutos. A seguir, foi adicionado 400µL de tampão de digestão, 4 µL de protease e incubado em banho seco por 3 horas a 50°C. Foi acrescentado 480µL de *Isolation Additive* e agitado em *vórtex*. Adicionou-se 1,1 mL de etanol 100%, homogeneizando com pipeta. A mistura amostra/etanol foi transferida para um filtro acoplado em um tubo coletor e estes foram centrifugados a 10.000 rpm por 60 segundos. A seguir 700 µL de *Wash 1* foi adicionado no filtro e centrifugado por 30 segundos a 10.000 rpm, 500 µL de *Wash 2/3* foi adicionado no filtro e centrifugado por 30 segundos a 10.000 rpm. Após essas lavagens, foi realizada a digestão com DNase por 30 minutos e a amostra foi submetida novamente a lavagens com as soluções *Wash 1* e *Wash 2/3* como nos passos anteriores. O filtro foi transferido para um novo tubo estéril e foi acrescentado 30 µL de água DEPC (livre de RNase) para eluir o RNA.

Obtenção de cDNA

Uma alíquota do RNA (1,5µL) foi checada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e as bandas de RNA, 18S e 28S, foram visualizadas em luz ultravioleta (**Figura 1**). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop, MD – 1000, Spectrophotometer).

De acordo com o resultado da quantificação do RNA, as amostras foram diluídas a uma concentração final de 1µg/µL. O RNA das amostras congeladas foi tratado com *DNAseI Amplification Grade* (Invitrogen - 1U/µL), antes da reação de transcrição. As amostras de RNA de arquivos de parafina passam por esse tratamento durante o processo de extração com o *Kit Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit FFPE Tissues* (Ambion).

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

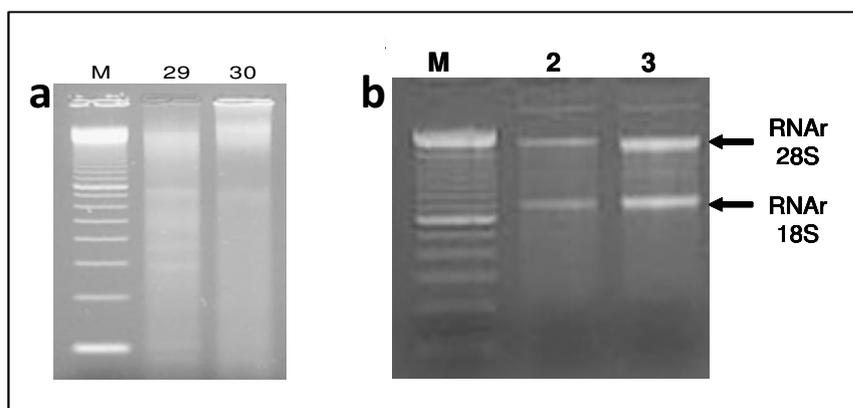


Figura 1. Imagem do gel de agarose 2% corado por brometo de etídio, para a checagem da qualidade do RNA extraído para duas amostras de arquivo em blocos de parafina (**a**); para duas amostras a fresco congeladas (**b**). M= marcador de 100 pares de bases (pb).

Validação dos resultados de HR-CGH e CGH-array pela metodologia de *RT-PCR* quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Seleção dos genes candidatos

Todos os genes candidatos validados por análise de expressão quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foram selecionados com base nos resultados das análises comparativas entre HR-CGH e CGH-array (metodologia empregada em um outro estudo do grupo, o qual avaliou um subconjunto destas amostras).

Foram selecionadas as regiões cromossômicas: 1p36.1(perda), 1q21.2 (ganho), 8q24 (perda) e 17q12-21.3 (perda e ganho) que se apresentaram freqüentemente envolvidas em perdas ou ganhos genômicos. A hipótese era que as regiões de perda possivelmente conteriam *genes supressores tumorais* que, uma vez perdidos, poderiam estar contribuindo para a tumorigênese prostática. Por outro lado, as regiões de ganho poderiam conter *oncogenes*, que teriam sua expressão gênica aumentada. A escolha dos genes candidatos à validação se deu por análise *in silico*, identificando os genes mapeados nessas regiões cromossômicas e que apresentavam função conhecidamente relacionada ao processo tumoral.

Para a região 1p36.1 foram obtidos 57 genes, dentre eles foi escolhido um candidato, o gene **ARID1A**. Os genes **MTSS1**, **S100A4**, **NME1** e **TOP2A** mapeados em 8q24, 1q21.2 e 17q12-21.3, respectivamente, foram selecionados por se encontrarem nas regiões alteradas e por apresentarem função compatível com a esperada para o evento genômico observado.

As seqüências desses genes foram obtidas nos bancos de dados públicos: *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* e *Ensembl*. Os iniciadores utilizados para a amplificação dos genes alvo **ARID1A**, **MTSS1**, **NME1**, **S100A4**, **TOP2A** e endógenos **GAPDH** e **HPRT** foram delineados utilizando o *software Primer Express®* versão 2.0 (PE *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). A diluição dos iniciadores foi realizada para a obtenção de concentração-final de 10µM. As seqüências dos iniciadores utilizados para RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Relação dos genes, localização e seqüência dos iniciadores usados na análise de qRT-PCR.

Gene	Localização cromossômica	Seqüência dos iniciadores	Tamanho do Fragmento (pb)
ARID1A	1p36.1	Forward 5' CAGAGAGCACATGGGCATTAGAT 3' Reverse 5' CAACCCTGGGAGCTGACTGAG 3'	92
MTSS1	8q24.1	Forward 5' TGTCTGCAGCAGCCTGAACA 3' Reverse 5' CGGCCATCACGCCACAGTTT 3'	91
NME1	17q21.3	Forward 5' GTTTCACCCTGAGGAACT 3' Reverse 5' AGGGAGAACTCACAGCTC 3'	201
S100A4	1q21.2	Forward 5' CAAGTACTCGGGCAAAGAGG 3' Reverse 5' TGCAGGACAGGAAGACACAG 3'	194
TOP2A	17q12-21	Forward 5' AGAAGACAGCAGCAAAAAGTCAGTC 3' Reverse 5' ACCAGAATTCAAAGCTGGATCC 3'	101
GAPDH	12p13	Forward 5' GGCTCCAAGGAGTAAGACC 3' Reverse 5' AGGGGTCTACTAGGCAACTG 3'	100
HPRT	Xq26.1	Forward 5' TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG3' Reverse 5' GGCCTCCCATCTCCTTCATC3'	100

As etapas da PCR, para este estudo, foram realizadas em termociclador automático *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A eficiência da PCR com cada par de iniciadores foi avaliada pela construção de uma curva-padrão para cada gene investigado. Para isto, foram realizadas diluições seriadas a partir de um *pool* de cDNA de amostras de CaP e controles (*pool* de cDNA puro e diluições: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625). Essas diluições foram testadas em duplicadas para todos os genes, seguindo o protocolo descrito adiante. O valores dos Cts (ciclo do *threshold*) para cada diluição de cDNA e as concentrações respectivas de RNA (\log_{10} RNA) foram plotados num gráfico para obtenção da curva-padrão. A partir da curva-padrão foi calculada a equação da reta, bem como o valor da inclinação da reta ou *slope*. O cálculo da eficiência da amplificação foi realizado segundo a fórmula: $E=10^{(-1/slope)}$. Para todos os genes avaliados a eficiência foi superior

a 90%. A partir das curvas-padrão determinou-se que a diluição das amostras seria de 1:25, por apresentar valores de Ct entre 20 e 30 para todos os genes estudados.

As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços, contendo duplicatas de cada amostra e controle negativo, num volume final de 10µL para cada reação, sendo 5µL do reagente Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0,2µL de cada iniciador 10µM (iniciadores *forward* e *reverse*) e 1 µL de cDNA diluído 1:25 para os genes *ARID1A*, *MTSS1*, *S100A4*, *NME1* e *GAPDH*; e 1:10 ou cDNA puro para o gene *TOP2A* e *GAPDH*. Todos os genes alvo e o endógeno de cada amostra foram detectados na mesma placa de reação. As condições de reação para todos os iniciadores foram: 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15seg e 60°C por 1 min. Ao final de cada reação, a curva de dissociação para cada gene testado foi realizada de modo a observar a presença de um único pico referente a um único produto amplificado.

Para detecção da expressão do gene *TOP2A* foi utilizado o reagente Platinum SYBR Green (Invitrogen) bem como para o gene endógeno *GAPDH*. Da mesma forma, as reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços, contendo duplicatas de cada amostra e controle negativo, num volume final de 10µL para cada reação, sendo 5µL do reagente Platinum SYBR Green (Invitrogen), 0,2µL de cada iniciador 10µM (iniciadores *forward* e *reverse*), 1 µL referência passiva Rox e 1 µL de cDNA 1:10 ou cDNA puro. O gene *TOP2A* e o gene endógeno *GAPDH* de cada amostra foram detectados sempre na mesma placa de reação. As condições de reação para todos os iniciadores foram: 50°C por 10 min, 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15seg e 60°C por 1 min. Ao final de cada reação, a curva de dissociação dos genes foi realizada de modo a observar a presença de um único pico referente a um único produto amplificado. As amostras cujos resultados não foram satisfatórios foram repetidas utilizando o sistema de detecção Power Sybr Green (Applied Biosystems).

A fluorescência foi capturada e coletada a cada ciclo da PCR, sendo que a intensidade de fluorescência detectada foi diretamente proporcional à quantidade de cDNA da amostra. Os dados gerados foram analisados por um *software* específico (Applied Biosystems, Foster City, CA) e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência *versus* o número de ciclos. A análise de cada reação foi realizada determinando primeiramente o *baseline*, que consiste na quantidade de fluorescência lida durante os ciclos iniciais da PCR, onde ocorre pouca alteração de sinal. O *software* desconta os valores dessa fluorescência basal. Em seguida, foi determinado o *threshold*, que deve ser selecionado na fase exponencial da curva da

PCR. O ponto em que ocorre intersecção do *threshold* com a curva de amplificação é determinado como Ct, ou seja, o ciclo do *threshold*. Todas as amostras foram comparadas no mesmo *threshold*, porém o Ct varia de acordo com o ciclo em que a curva de amplificação cruza com o *threshold*. Assim, cada amostra apresenta um valor de C_t específico e que está relacionado com a quantidade de cDNA do gene em questão presente na amostra. A quantificação relativa (QR) foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct: ciclo do *threshold*; ΔCt - Ct do gene alvo menos o Ct do gene referência (*GAPDH*); $\Delta\Delta Ct$ - ΔCt da amostra tumoral menos o ΔCt da amostra normal).

Análise dos dados

Foram considerados genes diferencialmente expressos nas amostras de CaP, HNP e tecido adjacente com ausência de neoplasia, aqueles que apresentaram $QR \geq 2$ (genes regulados positivamente) ou $QR \leq 0,5$ (genes regulados negativamente), em relação as amostras de próstata normais (SVO). Para o gene *TOP2A* foram considerados limites máximos e mínimos diferentes dos convencionados para os demais genes, pois houve uma grande dispersão nos valores de expressão desse gene para as amostras controle (SVO). Desta forma, foram calculados a média, o desvio padrão e o intervalo de confiança dos valores de QR das amostras controle para o gene *TOP2A*. Essas análises mostraram limite inferior de 0,26 e superior de 3,66, sendo esses valores considerados então como referência para diminuição ($QR \leq 0,26$) e aumento ($QR \geq 3,66$) de expressão de *TOP2A*, respectivamente.

Quanto aos dados clínicos e histopatológicos, a graduação histológica dos tumores seguiu o sistema Gleason (Epstein et al., 2005) e o estadiamento foi dado pelo sistema TNM (Epstein et al., 2004). A idade média dos pacientes foi de 64 anos (variação de 49 a 75 anos) e a idade média dos dois casos controles foi de 44,5 (40 e 49 anos). O tempo médio de seguimento clínico dos pacientes foi de 13 meses (variação de 1 a 46 meses).

Os pacientes com CaP e submetidos a prostatectomia foram agrupados segundo o PSA pré-cirúrgico, a graduação histológica de Gleason e o estadiamento (TNM) em três grupos quanto ao risco de recorrência do tumor (baixo, moderado e alto), de acordo com os critérios apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Critérios considerados na análise de risco segundo características clínicas e morfológicas.

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

Adaptado de NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology TM: Prostate Cancer, Version 2. 2007.

Adicionalmente, foi realizada outra estratificação dos casos na tentativa de identificar os pacientes com maior risco de recorrência do tumor. Os parâmetros clínicos utilizados nesta estratificação foram: (1) *PSA pós-cirúrgico elevado* ($\geq 0,2$ ng/mL); (2) *escore de Gleason elevado*: > 7 (4+3); (3) *invasão angiolinfática*; (4) *extensão extra-prostática*; (5) *margem cirúrgica comprometida*. Quando presentes, cada um dos fatores acima recebeu uma pontuação positiva (1+). Os casos foram classificados de zero até 5 dependendo do número de indicadores de pior prognóstico que apresentavam.

A utilização do PSA pós-cirúrgico para estratificação dos casos baseou-se no uso potencial dos valores de PSA como indicadores prognósticos após prostatectomia radical. Para tanto, foi considerado como indicador de pior prognóstico o nível do PSA pós-cirúrgico maior ou igual a 0,2ng/ml (Foster et al., 1993), e que é utilizado na prática clínica dos dois serviços (Faculdade de Medicina de Botucatu e Hospital AC Camargo, SP) para os pacientes submetidos à cirurgia.

Com relação ao escore de Gleason, as amostras de CaP com escore ≤ 7 (3+4) foram classificadas como de baixo grau e as amostras de CaP com escore ≥ 7 (4+3), como de alto grau (Mc Donnell et al., 2008). O *escore de Gleason* ≥ 7 é considerado preditivo de progressão, segundo Tefilli et al. (1998).

Com relação aos parâmetros *invasão angiolinfática* e *margem cirúrgica comprometida*, foram consideradas a presença ou ausência com base nos resultados constantes nos laudos anatomopatológicos.

O parâmetro *extensão extra-prostática* foi estabelecido com base no estadiopTNM. Os tumores pT2 (confinado ao interior da próstata) podem ser subclassificados

em pT2a (apresentam 50% ou menos de envolvimento de um lobo), pT2b (envolvem mais de 50% de um lobo mas não os dois) ou pT2c (envolvem ambos os lobos). No caso dos tumores pT2 foi considerada ausência de extensão extra-prostática (revisado por Epstein et al., 2005). Os tumores pT3 (invasão da cápsula prostática) são subdivididos em pT3a (apresentam extensão extra-capsular uni ou bilateral) e pT3b (apresentam invasão das vesículas seminais). Nos casos pT3 foi considerado a presença de extensão extra-prostática.

As amostras de tecido não-neoplásico adjacente ao tumor e as HNP não podem ser classificadas quanto ao escore de Gleason e conseqüentemente, o risco de recorrência para esses casos foi realizado segundo as características anatomopatológicas presentes nos laudos das prostatectomias radicais.

Os resultados da expressão de cada um dos genes *ARID1A*, *MTSS1*, *NME1*, *S100A4* e *TOP2A* obtidos por qRT-PCR foram comparados entre os diferentes tecidos analisados, em relação aos parâmetros clínico-laboratoriais (idade, PSA pré e pós-cirúrgico) e anatomopatológicos (escore de Gleason, estadiamento, invasão angiolinfática, comprometimento de margem cirúrgica e extensão extra-prostática) isolados. O PSADT (PSA *doubling-time*) foi obtido apenas para os casos que possuíam todas as informações necessárias para o cálculo *on line* (New York, MSKCC, 2008).

Foram considerados dois grupos distintos (pacientes com PSA<0,2ng/ml e com PSA≥0,2ng/ml) nas análises comparativas entre os níveis de expressão dos genes estudados e os valores de PSA pós-cirúrgico. Somente foram incluídos no grupo PSA<0,2ng/ml os pacientes avaliados por pelo menos 24 meses após a prostatectomia, os pacientes com seguimento clínico inferior a 24 meses e PSA<0,2ng/ml foram excluídos destas análises.

Os resultados da qRT-PCR foram também analisados de acordo com as estratificações de risco, comparando os grupos de pacientes de prognóstico favorável e desfavorável e com os achados de HR-CGH e CGH-array.

Análise estatística

As comparações entre os valores de expressão determinados pela qRT-PCR com as variáveis clínicas e histopatológicas foram realizadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando duas categorias foram avaliadas e pelo teste de

Kruskal-Wallis quando três grupos foram comparados. As análises de correlação utilizaram o teste não paramétrico de Spearman r . Teste de qui-quadrado ou Fisher foi utilizado para avaliar a força de associação entre as variáveis.

As probabilidades acumuladas de sobrevida livre de doença (SLD) foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier. Para construção das curvas de sobrevida foi considerado como início do seguimento a data da prostatectomia, e como final do seguimento, a data da recidiva bioquímica para SLD. Para recidiva bioquímica foi considerada a data do primeiro exame de PSA com valor maior ou igual a 0,2ng/ml. Os pacientes que não apresentaram recidiva bioquímica até a última data de seguimento foram considerados como censurados (“censored”).

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

RESULTADOS

HR-CGH

Neste estudo foi construída uma biblioteca contendo onze casos normais utilizando o mesmo protocolo das amostras teste. Esta biblioteca foi utilizada como referência na avaliação de perdas e ganhos de seqüências de DNA. Foi possível a obtenção de alterações no número de cópias genômicas para todos os casos avaliados por HR-CGH que apresentaram um padrão de hibridação de alta qualidade (**Figura 2**).

As perdas genômicas foram mais freqüentes do que os ganhos na análise de 22 amostras de CaP (oito do grupo I, seis do grupo II e oito do grupo III) e em 11 metástases (**Figura 3**). A **Figura 4** apresenta um exemplo dos ideogramas gerados após a análise comparada entre os tumores primários e as metástases dos mesmos pacientes. Neste exemplo, estão indicadas as perdas e ganhos para dois casos de tumores de próstata que apresentaram comprometimento de linfonodos (caso P3 *versus* P3M e P9 *versus* P9M). Foi possível identificar alta similaridade entre as regiões genômicas envolvidas em perdas. De forma semelhante, foram feitas comparações entre as amostras dos diferentes grupos de tumores estudados.

A seguir serão apresentados os resultados das análises comparativas de HR-CGH para cada grupo de amostras e, na seqüência, os resultados das comparações entre esses grupos.

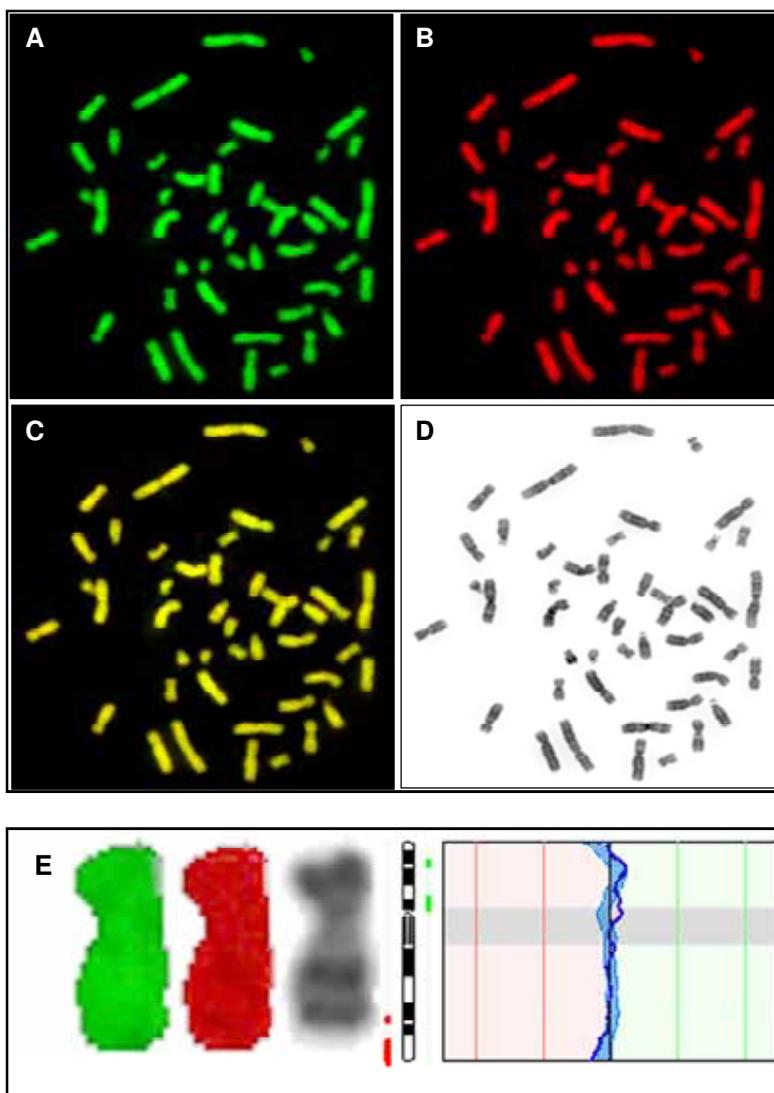
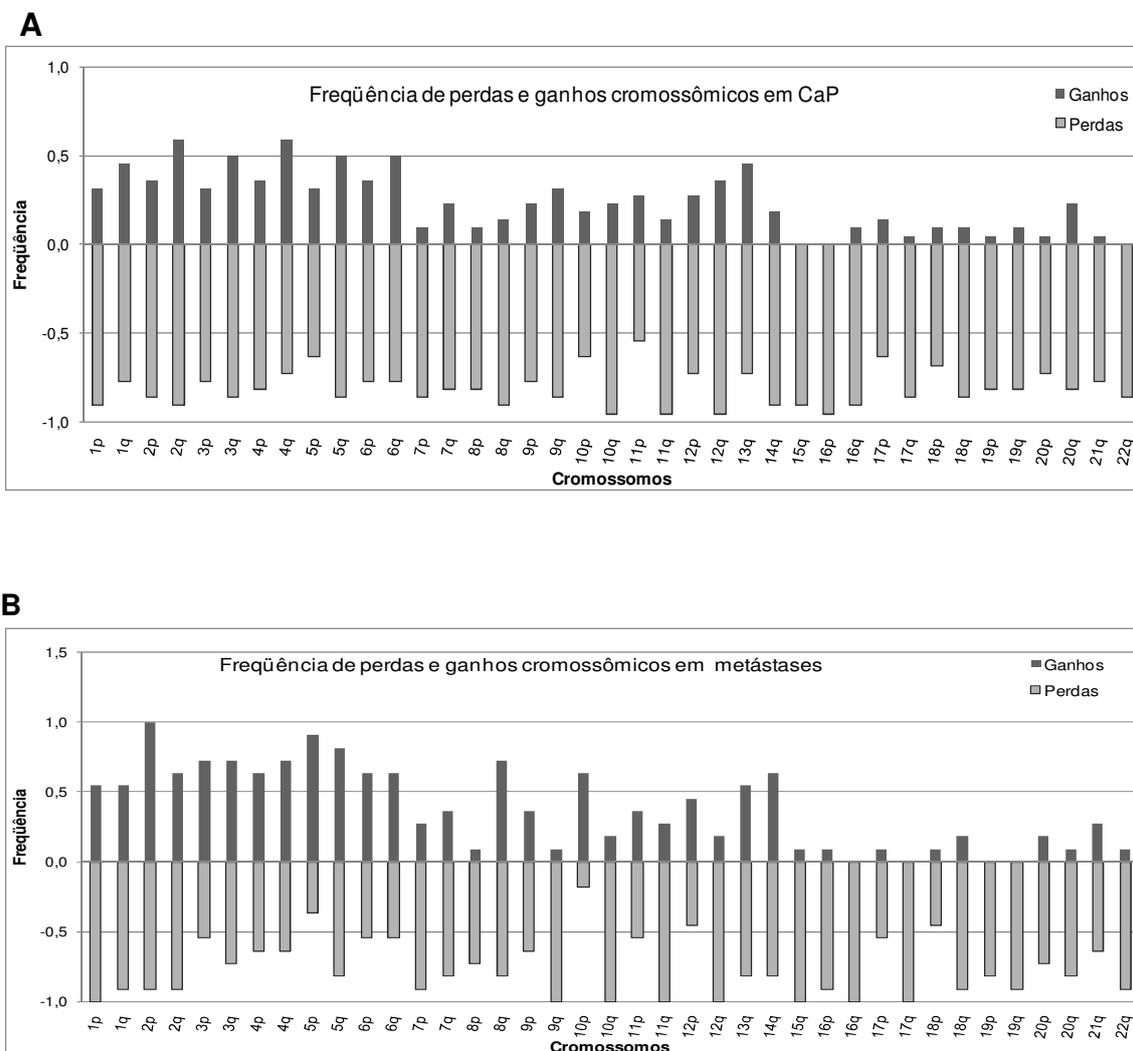


Figura 2. Padrão de marcação da HR-CGH para a amostra P3. A) Imagem capturada com filtro no espectro verde. B) No espectro vermelho. C) na sobreposição dos três filtros (azul, verde, vermelho). D) Padrão de Banda GTG (DAPI-reverso). E) A linha em azul escuro indica o perfil de alterações médio de ganhos e perdas ao longo do cromossomo 9. O intervalo azul-claro representa a variação normal entre todos os cromossomos 9 analisados da biblioteca de casos normais. A presença de alterações de perdas e ganhos é detectada quando o perfil médio do caso analisado (linha azul-escuro) ultrapassa os limites do perfil médio da biblioteca (intervalo azul-claro). O desvio da linha azul-escuro para a esquerda indica perdas e para a direita indica ganhos, representados por barras vermelhas e verdes, respectivamente, ao lado do ideograma, indicando a localização cromossômica da alteração.



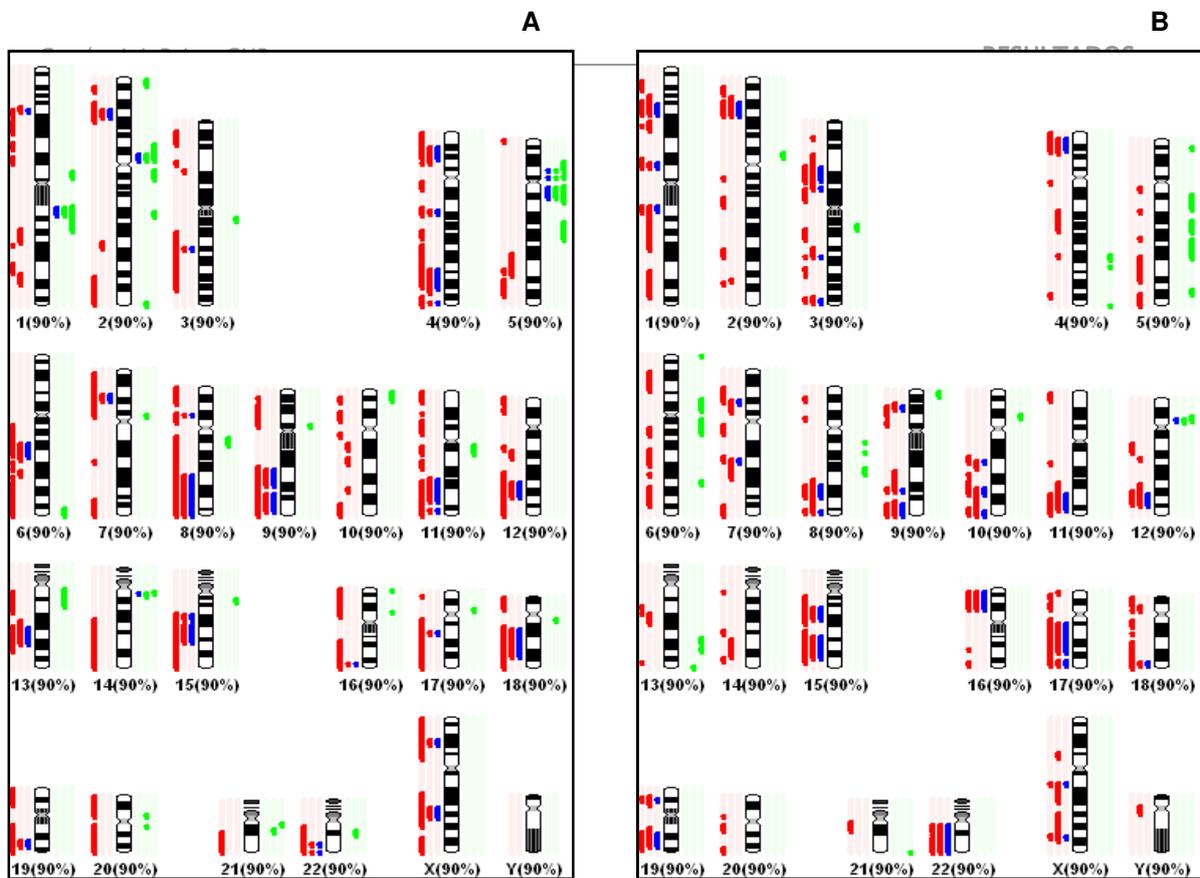


Figura 4. Ideogramas indicando as regiões de perdas e ganhos genômicos significativos, obtidos após a análise em banda G reversa. As barras vermelhas e verdes indicam as alterações genéticas significativas ($p < 0.01$) e obtidas na comparação com a biblioteca de casos normais. As barras vermelhas indicam as regiões de perdas e as verdes, as de ganho. A barra azul indica a presença de alterações no sítio genômico em 90% das amostras (% de similaridade). A figura representa o padrão de alterações nas amostras de CaP e metástases (M) em linfonodos do mesmo paciente: **A)** P3M (barras vermelhas e verdes mais internas, próximas ao cromossomo) e P3 (barras vermelhas e verdes mais externas). **B)** P9 (barras vermelhas e verdes mais internas, próximas ao cromossomo) e P9M (barras vermelhas e verdes mais externas).

Grupo I

No grupo I estão incluídos os adenocarcinomas primários (P) de próstata de pacientes que evoluíram para metástases e as metástases (M) de alguns desses pacientes. Entre as amostras de metástases incluídas nesse estudo estão: P1M, P2M, P5M e P8M (metástases ósseas); P11M, P12M, P13M e P14M1 (metástases em testículo) e P3M e P9M (metástases em linfonodo). Em sete casos havia a disponibilidade para estudo do tumor primário e metástase do mesmo paciente (P1/P1M, P3/P3M, P9/P9M, P11/P11M, P12/P12M e P14/P14M1/P14M2).

A **Tabela 6** apresenta as regiões mínimas de perdas e ganhos comuns (90% de similaridade) entre as amostras pareadas de tumor primário e suas metástases correspondentes.

Tabela 6. Caracterização das regiões mínimas comuns de perdas e ganhos cromossômicos (detectada em 90% das amostras) entre o tumor primário e sua metástase (grupo I), identificados por HR-CGH.

Amostra	Perda	Ganho
Grupo I		
P1/P1M	1p21, 1p22, 1p31, 1p32, 1q31, 2p22, 2p24, 2q36-37, 3p21, 3p23-24, 3q22-26.3, 4p15.3-16, 4q28-31.1, 4q34-35, 5p15.3, 5q31, 6q16-21, 6q22, 6q22-24, 6q25-27, 7p11.2-22, 7q35, 8p12, 8q21.1, 8q22, 8q23-24.3, 9p13-23, 9q21-34, 10p14, 10q11.2, 10q25-26, 11p13, 11p15, 11q13-14, 12q13, 12q24.2-24.3, 13q14, 14q32, 15q15-24, 16p12-13.3, 16q21-24, 17p13, 17q11.2-25, 18p11.2-11.3, 18q12, 18q12-21, 18q22-23, 19p13.1-p13.3, 19q13.1-13.4, 20p13, 20q13.1-13.3, 21q22, 22q11.2, 22q13	1p13, 1q21-22, 2p12-13, 2q11.2-12, 2q22, 3q13.1, 5p12-14, 5q14-21
P3/ P3M	1p32, 1p31, 1q32, 2p16-21, 3q22, 4p15.1-15.3, 4q21-22, 4q31.1-32, 4q35, 5q31, 6q16-21, 6q22, 7p14-15, 7q11.2-q36, 8p12, 8q22-24.3, 9q22-31, 9q31-34, 11q22-23, 11q25, 12q13-14, 12q22-24.1, 13q21-q31, 15q21-24, 16q24, 17q21, 18q12-22, 19q13.3, 22q13	1q21, 2p11.2-12, 5p12, 5p13, 5q11.2-12, 14q11.2
P9/ P9M	1p13-21, 1p31, 1p31-33, 1q21, 1q24-42, 2p21-22, 2q35, 3p12-13, 3p14-21, 3q24, 3q28-29, 4p15.2-16, 7p13-14, 7q22, 8q23-q24.1, 8q24.3, 9p21, 9q31, 9q34, 10q22, 10q24, 10q26, 11q23-24, 12q23-24.2, 13q21, 14q32, 15q15-21, 15q22-26, 16p12-13.3, 17p13, 17q12-24,	12p11.2

	17q25, 18p11.2, 18q23, 19p13.2, 19q13.2-13.4, 22q11.2-13	
P11/ P11M	1p31-36.3, 1q42-44, 2p24-25, 2q35-37, 3p24-26, 3q27-29, 4p12-15.1, 4q15.1-16, 4q12-27, 4q28-35, 5p15.2-15.3, 5q31, 5q34-35, 6p21.1-22, 6p25, 6q24, 6q26-27, 7p14, 7p21-22, 7q32-q36, 8p11.2-21, 8p21-23, 8q23-24.1, 8q24.1-24.3, 9p21-22, 9p24, 9q31-34, 10p14-15, 10q11.2, 10q23-26, 11p15, 11q13, 11q22-25, 12p12-13, 12q12, 12q22-24.3, 13q31, 13q33-q34, 14q31-32, 15q23-26, 16p11.2-13.3, 16q22-24, 17p11.2-12, 17q11.2-25, 18p11.3, 18q11.2-12, 18q22-23, 19p13.2-p13.3, 19q13.2-13.4, 20p11.2-13, 20q13.1-13.3, 21q22, 22q11.2-13	1p31, 2q14.2, 2q21, 2q22-24, 2q31, 4q28, 5q13, 5q22-23, 9q21
P12/P12M	1p32-33, 1p34.3-36.1, 4p15.3, 7p14-15, 7q34-35, 8q24.1-24.3, 9p21, 9q21-22, 9q22-34, 10q24-26, 11q22-24, 12q23-24.2, 14q24, 15q21, 15q22-25, 16p12-13.2, 16q22-24, 17q21-25, 18q21-22, 19q13.1-13.3, 20q13.1-13.2, 22q11.2-13	2p11.2-12, 3p12, 3p14, 3q13.1, 4p13, 4q21, 4q25-28, 5p13, 12p11.2-12, 14q12
P13/P13M	1p31, 1p31-34.2, 1q24-43, 2p12, 2q14.1-14.2, 2q33-34, 2q35-37, 3q13.3, 4p14, 4p15.1-15.3, 4q13, 4q26-27, 4q31.1-31.3, 4q34, 5q31-32, 6p12-21.1, 6p21.1-21.3, 7p11.2, 7p14-15, 7p21, 7q11.2, 7q21-31, 7q33-36, 8p11.2-12, 8p21-22, 8q21.1, 8q22-24.1, 10q21-22, 10q24-25, 10q26, 11q12-14, 11q21-24, 12q22-24.3, 13q14-q21, 13q22-31, 15q15-21, 15q22-25, 16p13.1, 16q24, 17q21-22, 17q24, 18q11.2-12, 18q22-23, 19p13.1-13.3, 19q13.1-13.4, 20p11.2-12, 20q11.2-13.1, 21q22, 22q13	5p13-14, 5q12
P14/P14M1	1p21, 2q21, 4p15, 5q31, 5q34, 6p12, 6q14-15, 8q24.1-24.3, 9p21, 9q32, 9q34, 10q22-23, 11q24, 12q24.1-24.2, 13q12, 15q22-23, 15q25-26, 16p11.2-12, 16p13.1, 16q12.1-12.2, 16q22-24, 17q24-25, 18q12, 18q22-23, 19p13.1-13.3, 19q13.3, 20q13.1-13.3, 22q13	-
P14/P14M2	2p21-22, 2q21, 3p12, 5q34-35, 6p12, 6q14-15, 8q11.2, 8q24.1-24.3, 10q22, 11q13, 11q24, 12q24.1-24.2, 13q12-13, 15q22, 15q23-26, 16p13.1, 17q23, 18q22-23, 19p13.1-13.3, 19q13.1-13.4, 22q13	-
P14/P14M1/P14M2	2q21, 5q34, 6p12, 6q14-16, 8q24.1-24.2, 10q24-25, 11q24, 12q24.1-24.2, 13q12, 15q22, 15q25-26, 16p13.1, 18q22-23, 19p13.1-13.3, 19q13.3, 22q13	-

A comparação entre *todas* as amostras do grupo I (P e M), com ~50% de similaridade (detectadas em mais de 9 das 19 amostras) foram perdas de: 1p31-36.3, 1q32-44, 2p22, 2q35, 2q37, 4p15.3-16, 5q31, 5q34-35, 6p21.2-21.3, 6q22, 7p13-15, 7p21-22, 7q22, 7q31, 7q34-36, 8p11.2-22, 8q23-24.3, 9p21, 9q22-34, 10q22, 10q22-

26, 11q13-14, 11q22-25, 12q22-24.3, 13q14-21, 14q31-32, 15q15-21, 15q22-26, 16p12-13.3, 16q22-24, 17q11.2-25, 18q12-23, 19p13.1-13.3, 19q13.1-13.4, 20p12-13, 20q11.2, 20q13.1-13.3, 21q22 e 22q11.2-13 e ganhos de: 2p11.2, 3q12-13.1, 4q27-28, 5p13-14 e 5q12.

A **Figura 5** apresenta as regiões mínimas de alterações genômicas comuns na comparação entre todos os tumores primários estudados, considerando 70% de similaridade (**Apêndice A**). A comparação destes achados entre todos os CaP do grupo I com os dados de CGH-array (*software* SAM) revelou concordância para as regiões 4p15.3-16, 8q22-24.3, 13q12-13, 19q13.1. Da mesma forma, a comparação entre as todas as metástases do grupo I pelas duas metodologias (HR-CGH e CGH-array) mostraram concordância para as regiões 8q24.2, 16q23-24, 17q12-22, 19q13.1-13.3. A análise de caso a caso mostrou similaridade muito maior do que a análise agrupada (dados não apresentados).

As metástases foram agrupadas segundo o tecido acometido: metástases ósseas, em testículo e em linfonodos com o objetivo de comparar as alterações comuns em cada grupo. A **Figura 6** apresenta os perfis de alterações cromossômicas de cada grupo de metástases e (**Apêndice B**) as regiões mínimas comuns de perdas e ganhos em pelo menos 3/4 metástases ósseas, 3/4 metástases em testículo e 2/2 metástases em linfonodos. Na comparação entre os dados de CGH-array e HR-CGH foram observadas perdas comuns em metástases de testículo envolvendo 7q33-36, 9q31-33, 18q12-21 e 19q13.2-13.4; em metástase de linfonodos: 3p14-21, 4p15.2 e 17q21.

Nesta comparação foi possível detectar não balanceamentos genômicos exclusivos de determinado grupo, por exemplo, a presença de determinada alteração na maioria das metástases ósseas e sua ausência nas metástases em testículo e em linfonodos. Foi verificado que apenas as metástases ósseas apresentavam ganhos genômicos em 1p13 (4/4), 6q21-22 (4/4) e 8q13 (4/4). As metástases em testículo apresentaram perdas de 2q14.1-14.2 (4/4), 7q22 (4/4), 11q14 (4/4) e 12p13 (4/4) e ganhos de 3q26.3 (2/4) como alterações exclusivas desse grupo. Nas metástases em linfonodos não foram observadas alterações exclusivas e que as diferenciassem.

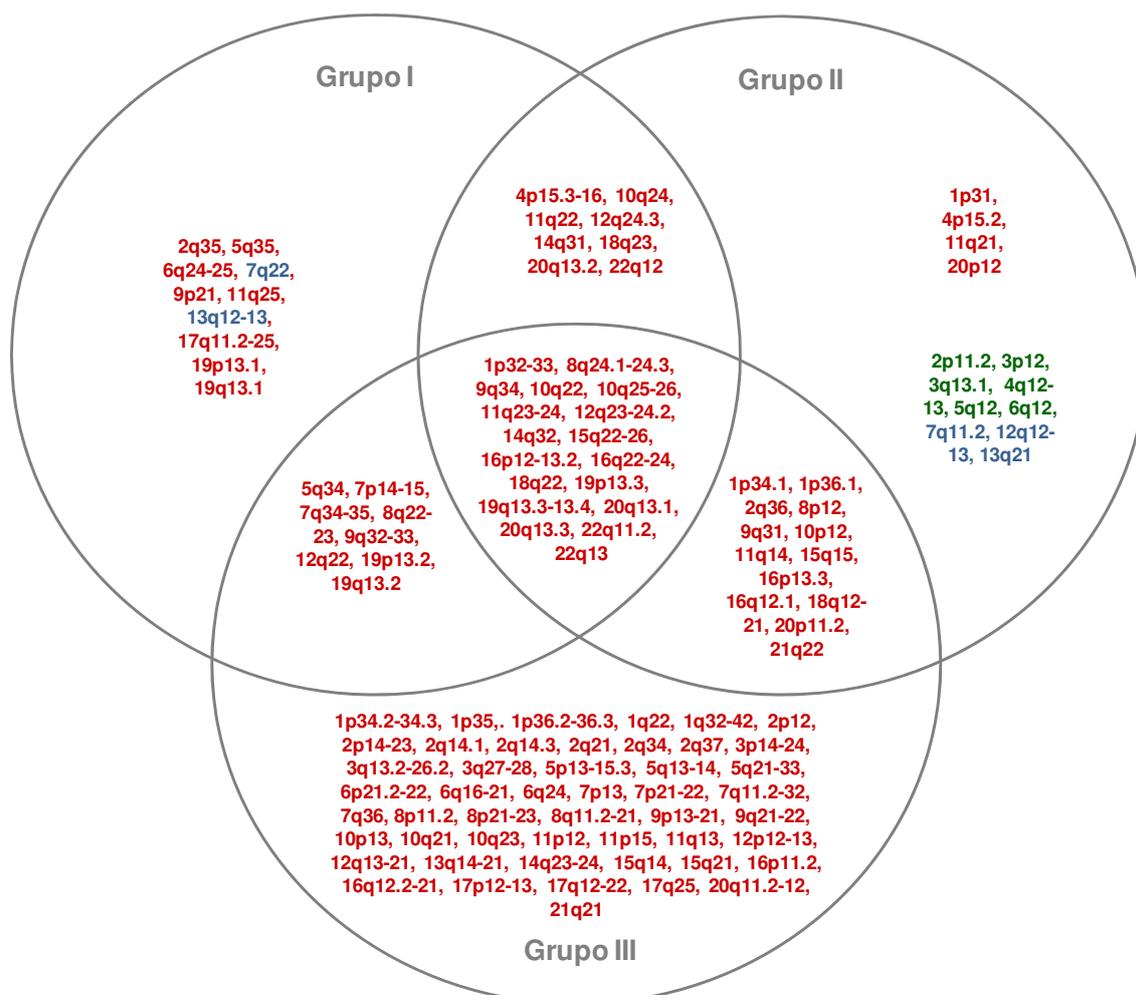
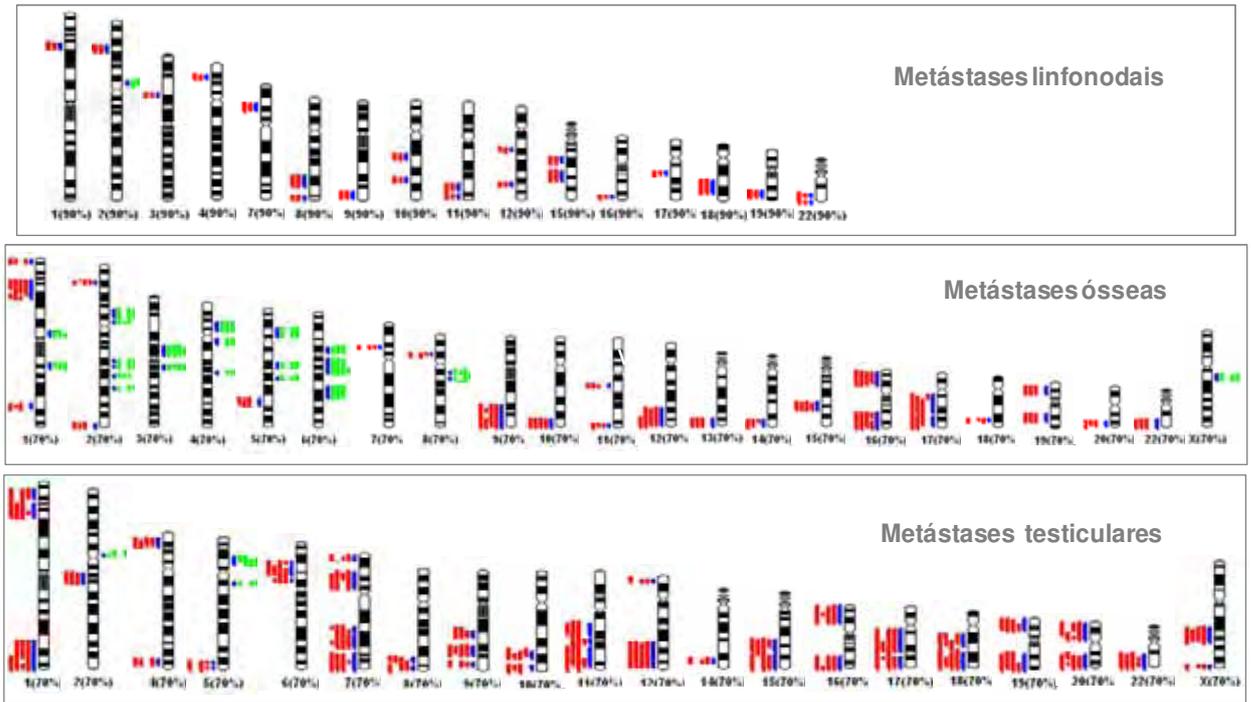


Figura 5. Alterações presentes em mais de 70% das amostras representados no diagrama de Venn segundo o grupo estudado (grupo I: tumores primários e suas metástases; grupo II: bom prognóstico e grupo III diferentes biópsias do mesmo paciente). As regiões cromossômicas envolvidas em perdas estão em vermelho e as envolvidas em ganhos, em verde. Em azul estão destacadas as alterações presentes em mais de 70% das amostras de determinado grupo e que não foram detectadas em nenhuma outra amostra dos demais grupos.

A



B

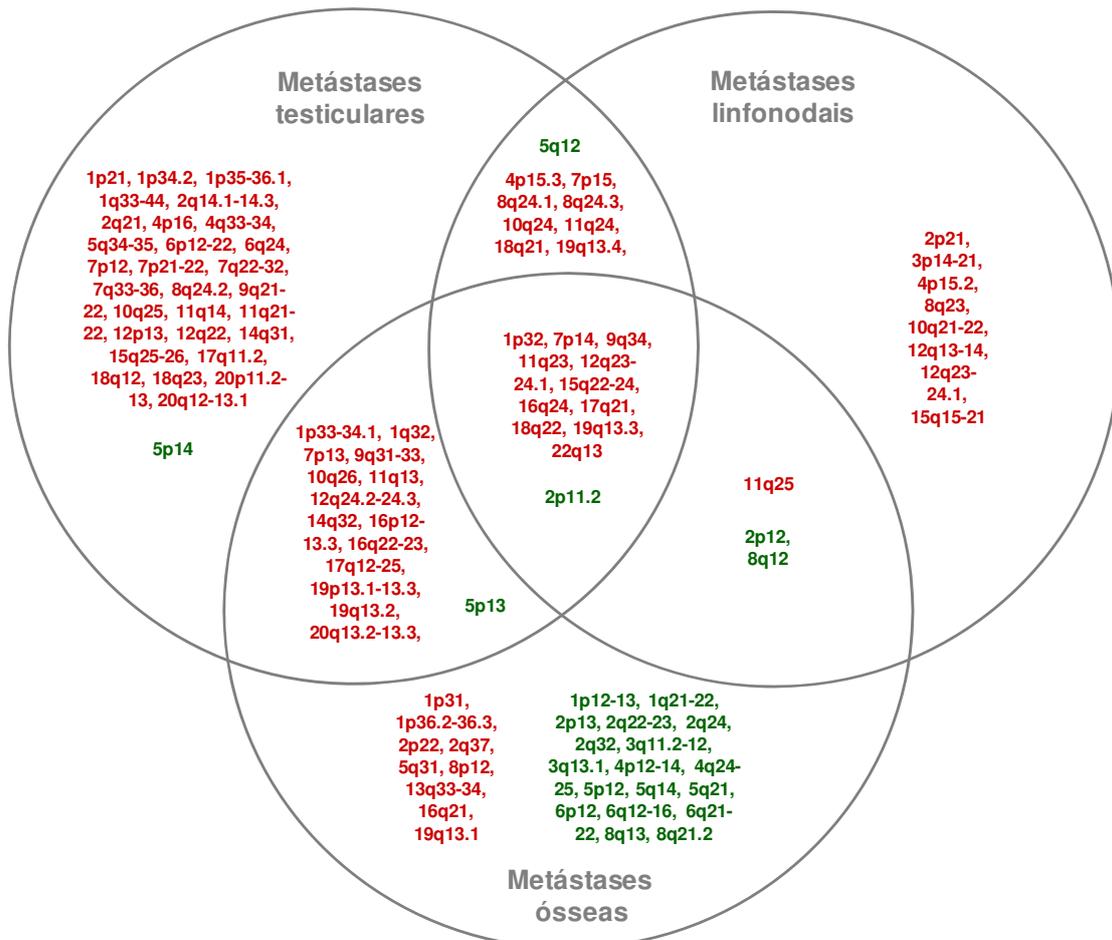


Figura 6. Alterações cromossômicas detectadas por HR-CGH para cada grupo de metástases de acordo com o órgão acometido. **A)** Ideogramas representando as alterações comuns a cada grupo (verde: ganhos; vermelho: perdas; azul: indica as regiões significativas e presentes em pelo menos 3/4 metástases ósseas ou em testículo e em 2/2 em linfonodos). **B)** Diagrama de Venn apresentando as regiões mínimas comuns a cada grupo de metástases. As regiões cromossômicas envolvidas em perdas estão em vermelho e os ganhos estão indicados em verde.

Da mesma forma, foram agrupados os tumores primários dos pacientes que apresentaram metástases em testículo e em linfonodos. Para as metástases ósseas não foi possível comparar os tumores primários desses pacientes, pois havia a disponibilidade apenas do tumor primário de um deles (amostra P1). Para os CaP dos pacientes que tiveram metástases em testículo foram detectadas apenas alterações de perdas (comuns a pelo menos três das quatro amostras), para os CaP dos pacientes que tiveram metástases em linfonodos também foram detectadas apenas alterações de perdas (comuns às duas amostras analisadas). As regiões mínimas comuns estão apresentadas na **Figura 7**.

A comparação entre os resultados de HR-CGH com os de CGH-array (obtidos de análise paralela, Tese de Doutorado de Rodrigo Mattos dos Santos, 2007, IB, UNESP, Botucatu, SP) revelou que nos tumores primários do grupo I dos pacientes que tiveram metástase em testículo as perdas comuns afetaram 10q11.2, 10q23-26, 11q22-25, 15q22-26, 16p11.2-13.2, 17q25; e entre os tumores primários que evoluíram para metástase em linfonodos foram comuns as perdas em 3p24, 10q26, 15q21, 15q22, 17q12-24, 18p11.2, 18q23.

Com o objetivo de discriminar os CaP que evoluíram para diferentes sítios de metástases, baseando-se nas alterações cromossômicas já adquiridas nos tumores primários, foram comparadas as alterações entre os CaP que evoluíram para metástases de diferentes localizações (**Figura 7**). As **perdas** em **3p24**, **3q22-24**, **4q21-22**, **5q32** e **7p13** foram detectadas exclusivamente nas amostras de carcinomas de próstata que **evoluíram para metástases em linfonodo** (2/2 amostras de CaP) e não estavam presentes nos CaP que progrediram para metástases em outra localização. As **perdas** em **1p35-36.1**, **6p12-21.1**, **12p11.2** e **16q12.1** (3/4 amostras de CaP) e **ganhos** em **4q26-28** (2/4 amostras de CaP) foram detectadas exclusivamente nos **CaP que evoluíram para metástases em testículo** e não estavam presentes nos tumores que evoluíram para metástases em outra localização.

As alterações exclusivas do grupo de CaP que evoluiu para metástases em linfonodo não foi observada nas metástases em linfonodos. Verificou-se que as perdas de **3q22-24** e **7p13** (características dos CaP com metástases em linfonodos) foram detectadas também na amostra **P7**, que apresentou comprometimento de linfonodos (cuja amostra de linfonodo não estava disponível para análise). Nenhum outro tumor primário apresentou perda dessas regiões, apenas algumas metástases apresentaram uma ou ambas as perdas: (ósseas: P1M, P5M; testículo: P11M, P13M, P14M1; em peritônio: P14M2),

Quanto às alterações encontradas nos CaP que evoluíram para metástases em testículo, perdas de **1p35-36.2** e **6p12-21.1** se mantiveram presentes nas amostras de metástases em testículo e ganho de **4q26-28**, detectada nas amostras de P13 e P14, foram também observadas nas metástases em testículo P11M, P12M e P14M1. Pelo menos uma dessas alterações foi observada nas amostras do grupo I (de pacientes que evoluíram para metástases ósseas: P1, P7, P12, P13, P1M, P5M, P8M e para metástase em linfonodo: P9M).

Comparando as perdas e ganhos característicos dos CaP que evoluíram para metástases em testículo e em linfonodos com as alterações encontradas nos CaP do grupo II (que apresentaram características de bom prognóstico), foi observado que apenas a perda de **6p12** não foi detectada nas amostras do grupo II (**Figura 8**).

A mesma comparação foi realizada com as amostras do grupo III e todas estavam presentes em pelo menos quatro das oito amostras desse grupo.

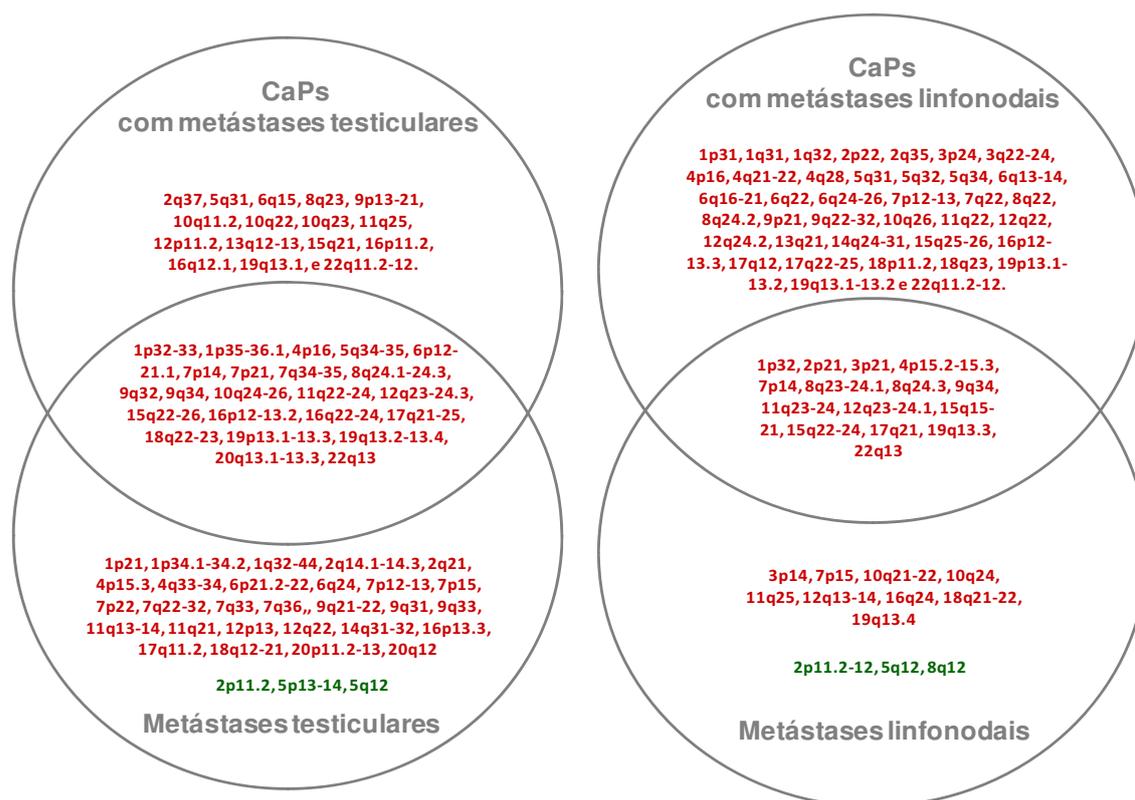


Figura 7. Diagrama de Venn apresentando as alterações comuns entre as amostras de metástases e CaP agrupadas segundo o sítio acometido. Foram consideradas as alterações presentes em pelo menos 75% das amostras de cada grupo. As regiões cromossômicas envolvidas em perdas estão em vermelho e as envolvidas em ganho, em verde.

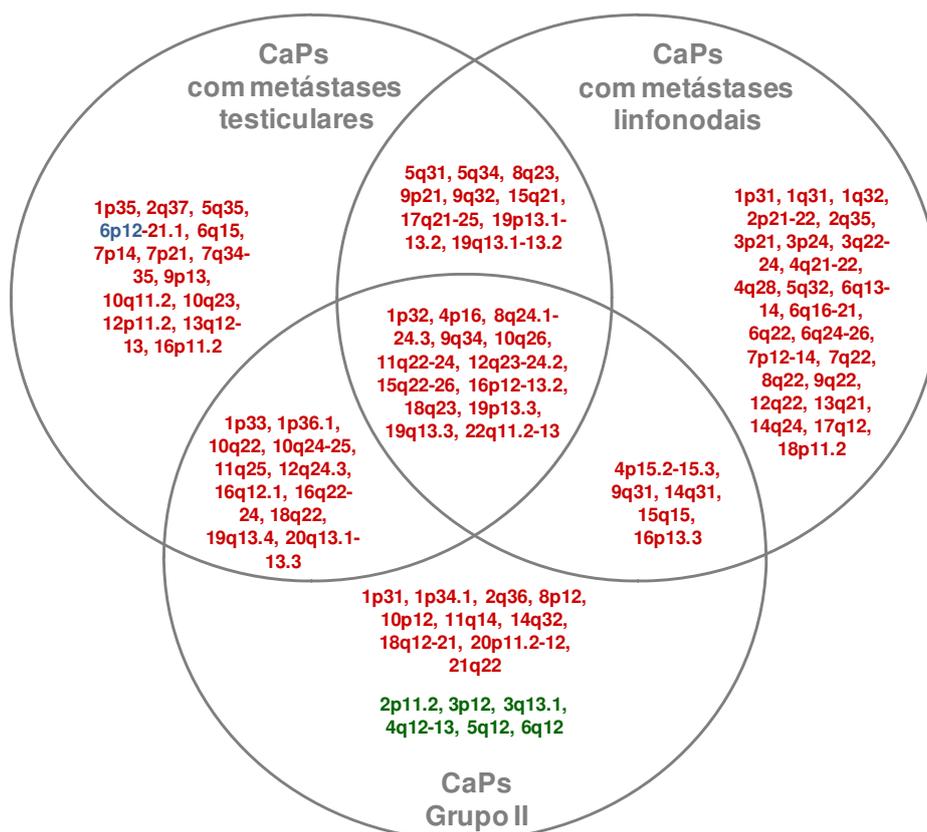


Figura 8. Diagrama de Venn apresentando as alterações comuns entre as amostras de CaP que evoluíram para metástase em testículo, as comuns entre os CaP que evoluíram para metástases em linfonodos, as comuns entre os CaP que apresentaram bom prognóstico (grupo II) e sua sobreposição. Foram consideradas as alterações presentes em pelo menos 75% das amostras de cada grupo. As regiões cromossômicas envolvidas em perdas estão em vermelho e as envolvidas em ganho, em verde. A perda de 6p12 (destacada em azul) é a única alteração exclusiva dos CaP que evoluíram para metástase em testículo e que não foi detectada em nenhum dos CaP de bom prognóstico.

Grupo II

O grupo II inclui as amostras de pacientes que em um período superior a 10 anos de seguimento clínico não apresentaram indícios de recidiva (incluindo bioquímica) ou metástases. Apenas um paciente deste grupo (P32) recebeu terapia hormonal desde 1999 (três anos após a cirurgia) (**Tabela 2**). Estas amostras apresentaram um maior número de ganhos genômicos quando comparados com os demais grupos (considerando 70% de similaridade - 4/6 amostras analisadas).

A amostra **P32**, cujo paciente recebeu tratamento hormonal, poderia apresentar diferenças no perfil de alterações com relação às demais amostras desse grupo. A comparação entre o perfil de alterações dessa amostra com as demais desse grupo mostrou a presença de algumas alterações que as demais do mesmo grupo não apresentaram como: **perda** em **3q13.1**, **5q23**, **13q14-21**, **15q12**, **15q21**, **18q11.2** e **ganho** em **2q23** e **8q22**. Comparando essas alterações com as observadas no grupo I (P e M) observou-se que: a perda de **3p13.1** foi detectada em 1/11 metástases; a perda de **5q23**, em 2/8 CaP do grupo I, em 2/11 metástases; a perda de **13q14-21**, em 5/8 CaP do grupo I, em 4/11 metástases; a perda de **15q12**, em 2/8 CaP do grupo I, em 2/11 metástases; a perda de **15q21**, em 6/8 CaP do grupo I, em 7/11 metástases; a perda de **18q11.2**, em 3/8 CaP do grupo I, em 4/11 metástases. O ganho de **2q23** foi detectado em 4/8 CaP do grupo I e em 3/11 metástases; o ganho de **8q22**, em 1/8 CaP do grupo I e em 3/11 metástases. Em resumo, este caso apresentava alterações que foram detectadas entre os CaP do grupo I.

A **Tabela 7** apresenta a comparação entre os achados de ganhos e perdas genômicas entre as amostra do grupo I e II pelas técnicas de HR-CGH e CGH-array.

As alterações detectadas por HR-CGH para os CaP que evoluíram favoravelmente (grupo II) foram comparadas às dos CaP do grupo I, que evoluíram para metástases, a fim de se avaliar quais eram as alterações comuns a ambos os grupos, quais eram exclusivas de cada grupo e quais alterações estavam presentes nos tumores primários e se mantiveram presentes nas amostras de metástases. A **Figura 9** apresenta as regiões mínimas comuns e presentes em mais de 70% das amostras de cada grupo. Podem ser observadas alterações comuns e exclusivas de cada grupo.

Tabela 7. Comparação entre as alterações de ganhos e perdas genômicas entre as amostras do grupo IP e II resultantes das análises de HR-CGH e CGH-array.

CaP	PERDAS	GANHOS
Grupo I	1p32-33, 2q35, 4p15.3-16, 5q34-35, 6q24-25, 7p14-15, 7q34-35, 8q22-24.3, 9p21, 9q32-34, 10q22, 10q24-26, 11q22-25, 12q22-24.3, 13q12-13, 14q31-32, 15q22-26, 16p12-13.2, 16q22-24, 17q11.2-25, 18q22-23, 19p13.1-13.3, 19q13.1-13.4, 20q13.1-13.3, 22q11.2-q13	-
Grupo II	1p31-34.1, 1p36.1, 2q36, 4p15.2-16, 8p12, 8q24.1-24.3, 9q31, 9q34, 10p12, 10q22, 10q24-26, 11q14-25, 12q23-24.3, 14q31-32, 15q15, 15q22-26, 16p12-13.3, 16q12.1, 16q22-24, 18q12-21, 18q21-23, 19p13.3, 19q13.3-13.4, 20p11.2-12, 20q13.1-13.3, 21q22, 22q11.2-13	2p11.2, 3p12, 3q13.1, 4q12-13, 5q12, 6q12

Alterações comuns aos CaP dos grupos I e II na análise de HR-CGH

Alterações exclusivas grupo I na análise de CGH-array

Alterações exclusivas grupo II na análise de CGH-array

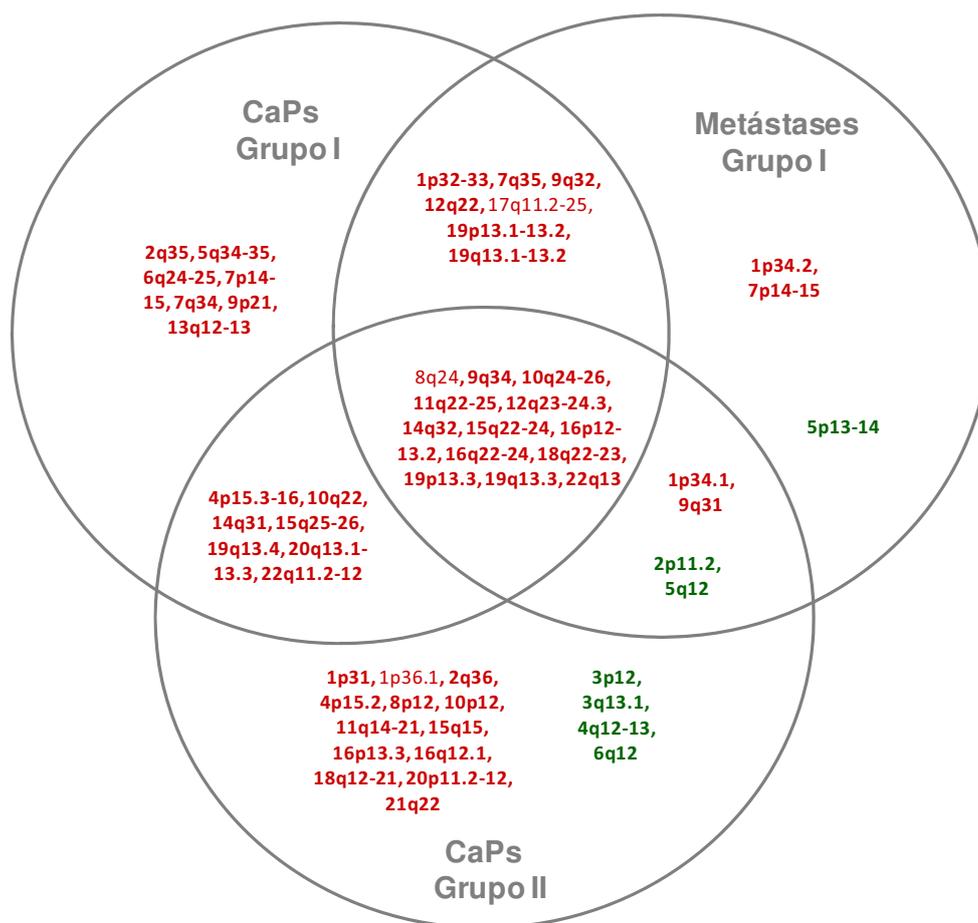


Figura 9. Representação esquemática em diagrama de Venn apresentando as alterações comuns entre as amostras de CaP que evoluíram para metástase (grupo I), as comuns entre todas as metástases, as comuns entre os CaP de bom prognóstico (grupo II) e entre os grupos. Foram consideradas as alterações presentes em pelo menos 70% das amostras de cada grupo. As regiões cromossômicas envolvidas em perdas são mostradas em vermelho e as envolvidas em ganho, em verde.

Grupo III

O grupo III incluiu 10 amostras, dois diferentes focos de tecidos de cada um dos cinco pacientes. Dessas, oito amostras de carcinoma apresentaram escore de Gleason 7(3+4) ou 6(3+3) e duas eram neoplasias intraepiteliais prostáticas de alto grau (PIN) de um mesmo paciente com CaP e escore de Gleason 8(3+5) (**Tabela 2**).

Nesse grupo, foram detectadas inúmeras alterações por HR-CGH, sendo que as perdas foram cinco vezes mais freqüentes que os ganhos. A **Figura 5 (Anexo, Tabela 1)** apresenta as regiões mínimas comuns de perdas presentes em mais de 80% das amostras. Avaliando as alterações mais freqüentes nas amostras de CaP foram detectadas perdas em **1p32, 2p21, 3p14-22, 3q21-22, 3q24-25, 5p14-15.2, 5q31, 6p21.3, 7p21, 7q22, 7q36, 8q13, 8q22-24.2, 9q22-33, 10q26, 11p15, 11q24, 12p12, 12q24.1, 15q22-26, 16q13-23 e 21q22** em 100% das amostras e ganhos em **4p13, 4q12, 14q12 e 14q21** em 50%.

As amostras de PIN (caso 166) apresentaram perfil de alterações diferente dos CaP, sendo observado maior número de ganhos quando comparados aos CaP. As regiões mínimas de ganhos encontrados exclusivamente nas duas amostras de PIN foram: **3p12, 5q11.2, 5q21, 8q11.2, 8q13-q21.1, 12p11.2-p13, 15q26 e 21q11.2**. Não foram observadas perdas genômicas exclusivas entre os PIN (**Tabela 8**).

Ao comparar as duas amostras de CaP de um mesmo paciente foi observada uma similaridade de aproximadamente 50% entre as regiões de perdas genômicas, essa concordância não foi tão expressiva entre os ganhos, variando de 0% a 6,8%. Para as amostras de PIN houve uma similaridade de ~30% para perdas e de ~40% para ganhos (**Tabela 8**).

Comparações entre os CaP dos Grupos I, II e III

Ao verificar as alterações genômicas que diferenciavam os CaPs do grupo I daqueles do grupo II e considerando as alterações que deveriam estar presentes em pelo menos 70% das amostras de um grupo e ausentes no outro, foi observado que:

1. **a perda de 7q22 e de 13q12-13** eram alterações exclusivas das amostras do **grupo I**,
2. **ganhos de 7q11.2, 12q12-13 e 13q21** eram alterações exclusivas das amostras do **grupo II (Tabela 9; Figura 5)**.

Na comparação destes achados com aqueles do grupo III, observou-se que o caso 15F2 mostrou similaridade com os resultados das amostras do grupo II, pelo menos com relação a estas alterações que diferenciaram os dois grupos.

Tabela 8. Regiões mínimas de perdas e ganhos comuns às duas amostras de cada paciente do grupo III detectadas por HR-CGH.

Amostras	% concordância	Perdas comuns	Ganhos comuns
15F2/15F3	47% das perdas	1p31-p36.3, 1q32-q42, 2p21-p23, 2q37, 3p14-p21, 3p21-p24, 3p26, 3q21-q24, 3q26.1-q26.3, 3q28, 4p15.3-p16, 5p14-p15.2, 5q31-q33, 6p21.3-p22, 7p21, 7p22, 7q11.2, 7q22, 7q32-q36, 8p11.2-p23, 8q11.2-q13, 8q22-q24.3, 9p21, 9q22-q34, 10q25-q26, 11p15, 11q13-q14, 11q23-q24, 12p12-p13, 12q24.1-q24.3, 14q24, 14q32, 15q14-q15, 15q22-q26, 16p11.2-p13.3, 16q12.2-q24, 17p11.2-p13, 17q12-q25, 18p11.2, 19p13.2-p13.3, 19q13.2, 19q13.4, 20p11.2, 20q11.2-q13.1, 20q13.3, 21q22, 22q11.2-q13	2q31
	1,5% dos ganhos		
48F2/48P3	58,9% das perdas	1p31-p36.3, 1q22-q44, 2p12, 2p14-p23, 2q14.1-q22, 2q34-q37, 3p14-p24, 3q13.3-q26.2, 3q27, 4p16, 4q34, 5p13-p15.3, 5q13-q14, 5q31-q32, 6p12, 6p21.2-p22, 6q16-q22, 6q24-q25, 7p13-p22, 7q21-q32, 7q34-q36, 8p12-p22, 8q13-q24.2, 9p12-p23, 9q21-q34, 10p12-p14, 10q21-q26, 11p11.2-p15, 11q13-q25, 12p12, 12q12-q24.2, 14q22-q24, 15q14-q26, 16p13.1, 16q12.1-q23, 17q22, 18p11.2, 18q11.2-q22, 19p13.1, 19p13.3, 20p11.2-p12, 20q11.2-q13.1, 21q21-21q22	-
	0% dos ganhos		
70F1/70F2	59,3% das perdas	1p12-p13, 1p32-p36.3, 1q21-q22, 1q32, 2p11.2-p12, 2p21, 2p24, 2q11.2-q14.1, 3p12-p22, 3q13.2-q22, 3q24-q25, 3q28-q29, 5p12-p15.3, 5q11.2-q31, 5q33-q34, 6p21.2-p21.3, 6q12, 6q16, 7p11.2-p22, 7q11.2-q22, 7q36, 8p23, 8q11.2-q24.3, 9p13, 9q21-q34, 10p11.2-p15, 10q21-q23, 10q26, 11p11.2-p12, 11p15, 11q12-q14, 11q23-q24, 12p11.2-p13, 12q12-q24.1, 13q12-q21, 13q32-q33, 14q22-q32, 15q11.2-q14, 15q21-q26, 16p11.2-p12, 16p13.3, 16q12.1-q24, 17p11.2-p12, 17q12-q21, 17q25, 18p11.3, 18q11.2-q12, 18q22-q23, 19p13.1-p13.3, 19q13.1-q13.2, 19q13.4, 20p11.2, 20q11.2-q13.3, 21q21-q22, 22q11.2, 22q13	4q21
	2,4% dos ganhos		
177P1/177P2	47% das perdas	1p32, 2p14, 2p21, 2p23, 2q14.3-q21, 2q31-q32, 2q34, 2q36-q37, 3p14-p24, 3q13.1-q25, 3q27, 4q23, 5p13-p15.3, 5q13-q14, 5q21-q23, 5q31-q34, 6p21.3-p22, 6q16-q21, 6q23-q25, 7p15-p21, 7q21-q36, 8p11.2-p23, 8q11.2-q24.2, 9q21-q34, 10q21-q26, 11p15, 11q24-q25, 12p12-p13, 12q13-q24.1, 13q14-q21, 15q15-q26, 16p11.2-p13.2, 16q13-q24, 17p13, 17q21-q22, 17q24, 21q22	4q12, 6p25, 13q12
	6,8% dos ganhos		

166F1/166F2 (PIN)	27,1% das perdas	5p14-p15.1, 5q31, 5q34, 8p12, 9q31-q33, 10q24, 10q26, 11p14-p15, 11q13, 12q23-q24.3, 15q24-q25, 16p12-16p13.2, 16q22-q23, 17p11.2-p12, 17q22-q23, 18q21, 19p13.2-p13.3, 19q13.1-q13.2, 20p12, 20q11.2-q13.1, 22q12-q13	1p12-p31, 1q21, 1q31, 2q24, 2q31, 3p12 , 3q13.1-q13.2, 4p12-p14, 4q24-q25, 4q31.1, 4q33-q34, 5q11.2 , 5q21 , 6q12, 8q11.2 , 8q13 , 8q21.1 , 10p11.2, 10q21, 12p11.2-p13 , 12q12, 13q12-q31, 14q11.2-q21, 15q26 , 21q11.2-q21
	37% dos ganhos		

Negrito: alterações exclusivamente comuns às duas amostras de PIN (Neoplasia Intraepitelial de Próstata).

Tabela 9. Regiões mínimas que diferenciam os grupos de CaP I e II e o que foram detectadas nos casos do grupo III. Em negrito estão destacadas as regiões mínimas presentes em mais de 60% das amostras de um grupo e ausentes no outro.

CaP	Perdas	Ganhos
Grupo I	7q11.2 (3/8), 7q22 (5/8), 12q12-13 (3/8), 13q12-13 (6/8) e 13q21 (4/8)	-
Grupo II	-	7q11.2 (3/5), 7q22 (1/5), 12q12-13 (3/5), 13q21 (3/5) e 13q12-13 (1/5).
Grupo III	7q22 (8/8), 12q12-13 (7/8 – exceto 15F2), 13q12-13 (4/8 – 15F3, 48F2, 70F1 e 70F2) e 13q21 (5/8 – 15F3, 70F1, 70F2, 177F1 e 177F2)	7q11.2 (1/8 – 177F2), 12q12-13 (1/8 – 15F2), 13q12-13 (3/8 – 15F2, 177F1 e 177F2) e 13q21 (1/8 – 15F2)

Alterações exclusivas grupo I, também presentes na análise de CGH-array

Alterações exclusivas grupo II, também presentes na análise de CGH-array

Validação dos resultados de HR-CGH e CGH-array pela metodologia de qRT-PCR

Baseado nos achados da HR-CGH e na comparação com os dados de CGH-array (não apresentados) entre os diferentes grupos de amostras foram selecionados os genes *ARID1A*, *MTSS1*, *NME1*, *S100A4* e *TOP2A* mapeados nestas regiões para validação por RT-PCR quantitativa em tempo real (**Figura 10**). A escolha dos genes candidatos à validação se deu por análise *in silico*, permitindo a detecção de todos os genes mapeados na região ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/)) e suas respectivas funções. Para a região 1p36.1 foram incluídos 57 genes, dentre eles foi escolhido um candidato, o gene *ARID1A*. A busca foi semelhante para os demais genes selecionados, acrescida de revisão em literatura.

A **Tabela 10** apresenta as regiões genômicas alteradas e o gene selecionado para validação por qRT-PCR. Os genes *ARID1A*, *MTSS1* e *NME1* possuem função de supressão tumoral e os genes *S100A4* e *TOP2A* estão relacionados à função oncogênica. Embora tenha sido observada perda em 17q por HR-CGH, por CGH-array foi possível detectar ganho de seqüências do gene *TOP2A* (*BAC RP11-139D23*), que foi então selecionado para validação. Os dados de expressão gênica foram comparados com os parâmetros clínicos e histopatológicos.

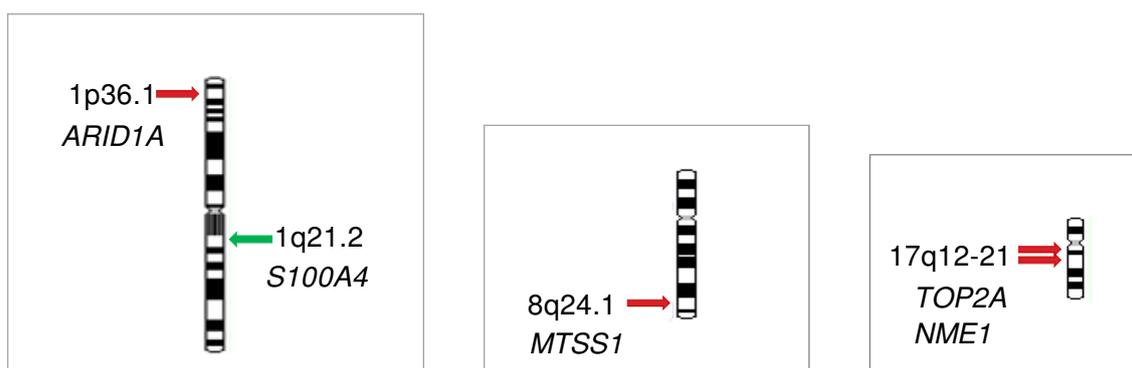


Figura 10. Ideogramas mostrando a localização cromossômica dos genes selecionados para validação por qRT-PCR. As setas vermelhas indicam as regiões envolvidas em perdas e a verde em ganhos, detectadas pela HR-CGH.

Tabela 10. Genes selecionados mapeados nas regiões genômicas alteradas detectadas por HR-CGH.

Gene (Região cromossômica)	HR-CGH		CGH-array	
	Perda	Ganho	Perda	Ganho
	<u>Grupo I</u>			
	5/8 CaPs (P1, P7, P11, P12 e P13)			
ARID1A	9/11 Metástases (P1M, P2M, P8M, P9M, P11M, P12M e P14M2)		<u>Grupo I</u>	
(1p36.1)		-	1/6 CaPs	-
	3/5 CaPs (P30, P32 e 78P1)		2/6 Metástases	
	<u>Grupo III</u>			
	6/8 CaPs (15F2 e F3, 48F2 e P3, 70F1 e F2)			
	<u>Grupo I</u>			
MTSS1	6/8 CaPs (P3, P7, P9, P11, P12 e P13)		<u>Grupo I</u>	
(8q24.1)	7/11 Metástases (P1M, P3M, P11M, P12M, P13M, P14M1 e P14M2)	-	4/6 CaPs	-
			3/6 Metástases	
	<u>Grupo II</u>			

	4/5 CaPs (P29, P30, P32 e 78P1)	
	<u>Grupo III</u>	
	8/8 CaPs (15F2 e F3, 48F2 e P3, 70F1 e F2, 177F1 e F2)	
	<u>Grupo I</u>	<u>TOP2A</u>
TOP2A	7/8 CaPs (P1, P3, P7, P9, P11, P12 e P13)	<u>Grupo I</u>
(17q12-q21)	11/11 Metástases (P1M, P2M, P3M, P5M, P8M, P9M, P11M, P12M, P13M, P14M1 e P14M2)	<u>NME1</u> 1/6 CaPs; 1/6 Metástases
NME1	<u>Grupo II</u> 1/5 CaPs (P29)	<u>Grupo II</u> 1/4 CaPs (P29)
(17q21.3)	3/5 CaPs (P30, P31 e P32)	<u>Grupo III</u>
	7/8 CaPs (15F2 e F3, 48F2, 70F1 e F2, 177F1 e F2)	1/4 CaPs
	<u>Grupo I</u>	<u>Grupo I</u>
S100A4	4/8 CaPs (P7, P9, P11e P14)	3/8 CaPs (P1, P3, e P13)
(1q21.2)	1/11 Metástases (P9M)	6/11 Metástases (P1M, P2M, P3M, P5M, P8M e P11M)
	<u>Grupo III</u>	<u>Grupo II</u> 2/4 CaPs
	4/8 CaPs (15F3, 70F1 e F2, 177F1)	

1/5 CaPs (P29)

Grupo III

2/8 CaPs (48F2 e 177F2)

(-) alteração não detectada

Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR

Após a construção das curvas-padrão foi calculada a eficiência de amplificação dos genes alvo *ARID1A*, *S100A4*, *MTSS1*, *NME1* e *TOP2A* e dos genes endógenos *GAPDH* e *HPRT* pela fórmula: $E=10^{(-1/\text{slope})}$. Os dados obtidos estão descritos na **Tabela 11**. As curvas-padrão, de amplificação e dissociação para esses genes estão apresentadas nas **Figuras 11, 12 e 13**, respectivamente.

Os valores numéricos referentes à análise pela qRT-PCR dos genes *ARID1A*, *S100A4*, *MTSS1*, *NME1* e *TOP2A* e dos endógenos nas amostras de próstata dos grupos CaP, HNP e tecido adjacente ao tumor (Adj) estão apresentados na **Tabela 12**. Os genes *ARID1A*, *MTSS1*, *NME1* e *S100A4* foram considerados diferencialmente expressos nas amostras CaP e HPN quando os valores de QR eram ≥ 2 , genes regulados positivamente (expressão aumentada) e $\leq 0,5$, genes regulados negativamente (expressão diminuída) em relação aos tecidos prostáticos normais. Para a análise de expressão do gene *TOP2A* foram considerados os limites diferentes dos convencionados para os demais genes, pois este gene apresentou grande dispersão de valores mesmo entre as amostras de próstata normal. Portanto, após o cálculo da média, desvio padrão e intervalo de confiança dos valores de QR das amostras controle, os valores normais de referência ficaram estabelecidos entre 0,26 e 3,36 e foi considerada expressão aumentada quando $QR \geq 3,66$ e diminuída quando $QR \leq 0,23$.

Tabela 11. Determinação da eficiência da qRT-PCR para os pares de iniciadores dos genes alvo e endógenos.

Gene	Coefficiente de linearidade	“Slope”	Eficiência
<i>ARID1A</i>	0,99	-2,97	2,17
<i>S100A4</i>	0,99	-3,32	2,00
<i>MTSS1</i>	0,99	-2,99	2,16
<i>NME1</i>	0,99	-3,42	1,96
<i>TOP2A</i>	0,99	-3,51	1,93

<i>GAPDH</i>	0,99	-3,29	2,01
<i>HPRT</i>	0,99	-3,76	1,90

Curvas padrão

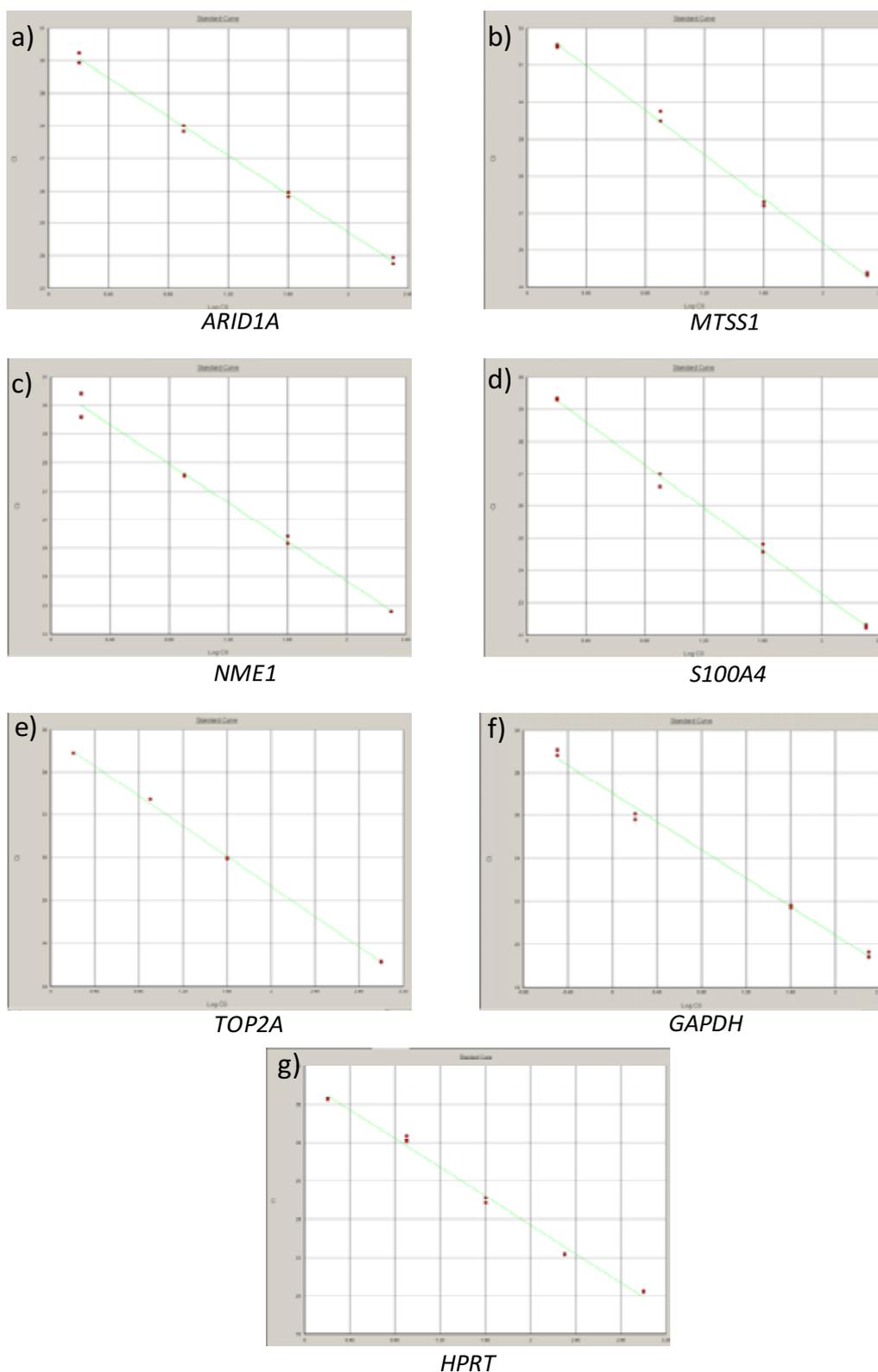


Figura 11. Curvas-padrão dos genes alvo *ARID1A* (a), *MTSS1* (b), *NME1* (c), *S100A4* (d), *TOP2A* (e) e endógenos *GAPDH* (f) e *HPRT* (g).

Curvas de amplificação

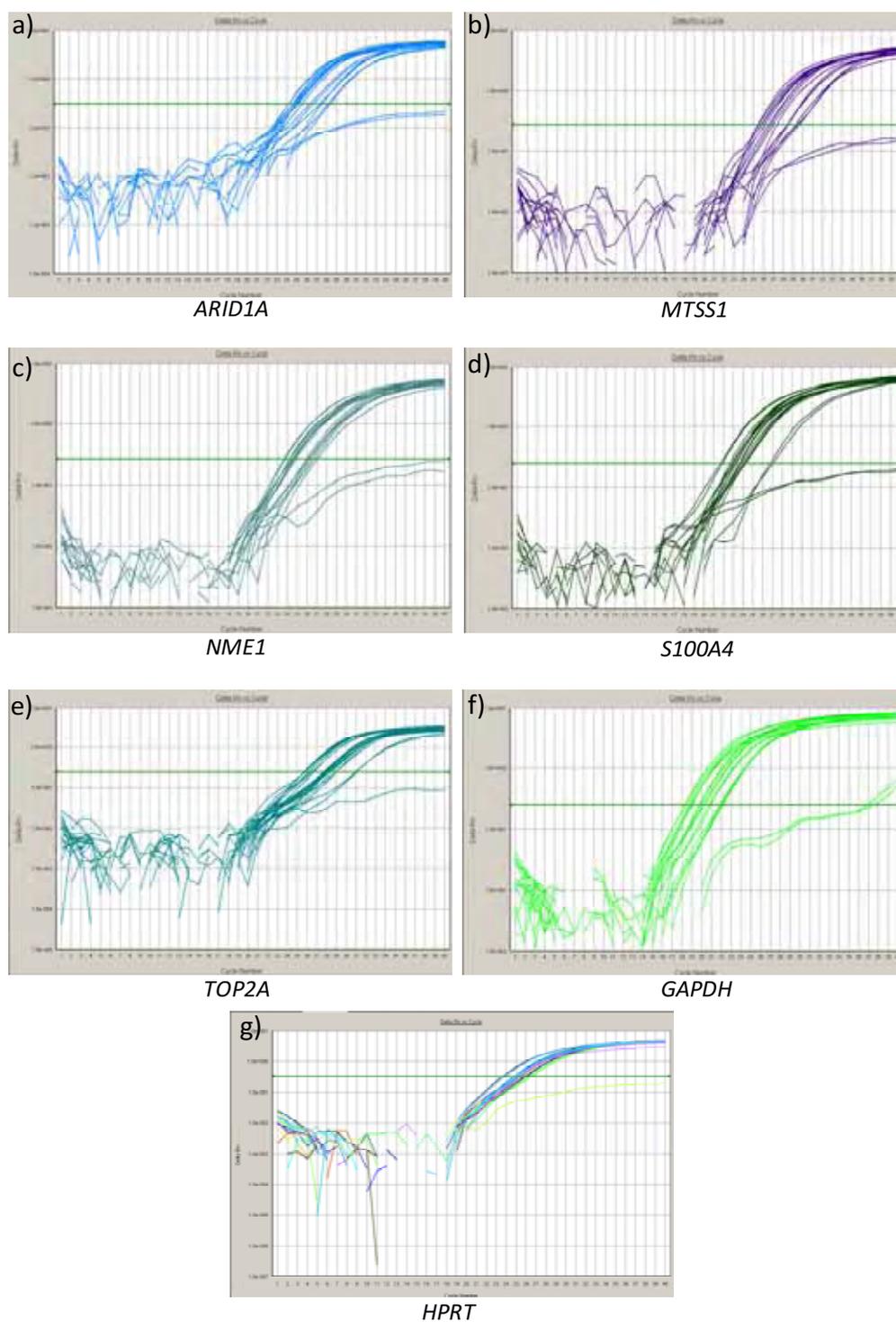


Figura 12. Curvas de amplificação para os genes alvo *ARID1A* (a), *MTSS1* (b), *NME1* (c), *S100A4* (d), *TOP2A* (e) e endógenos *GAPDH* (f) e *HPRT* (g). Estão apresentadas as curvas de amplificação para as amostras 199, 200, 201, 202, 208F1, 208F3, SVO 1 e SVO 3.

Curvas de dissociação

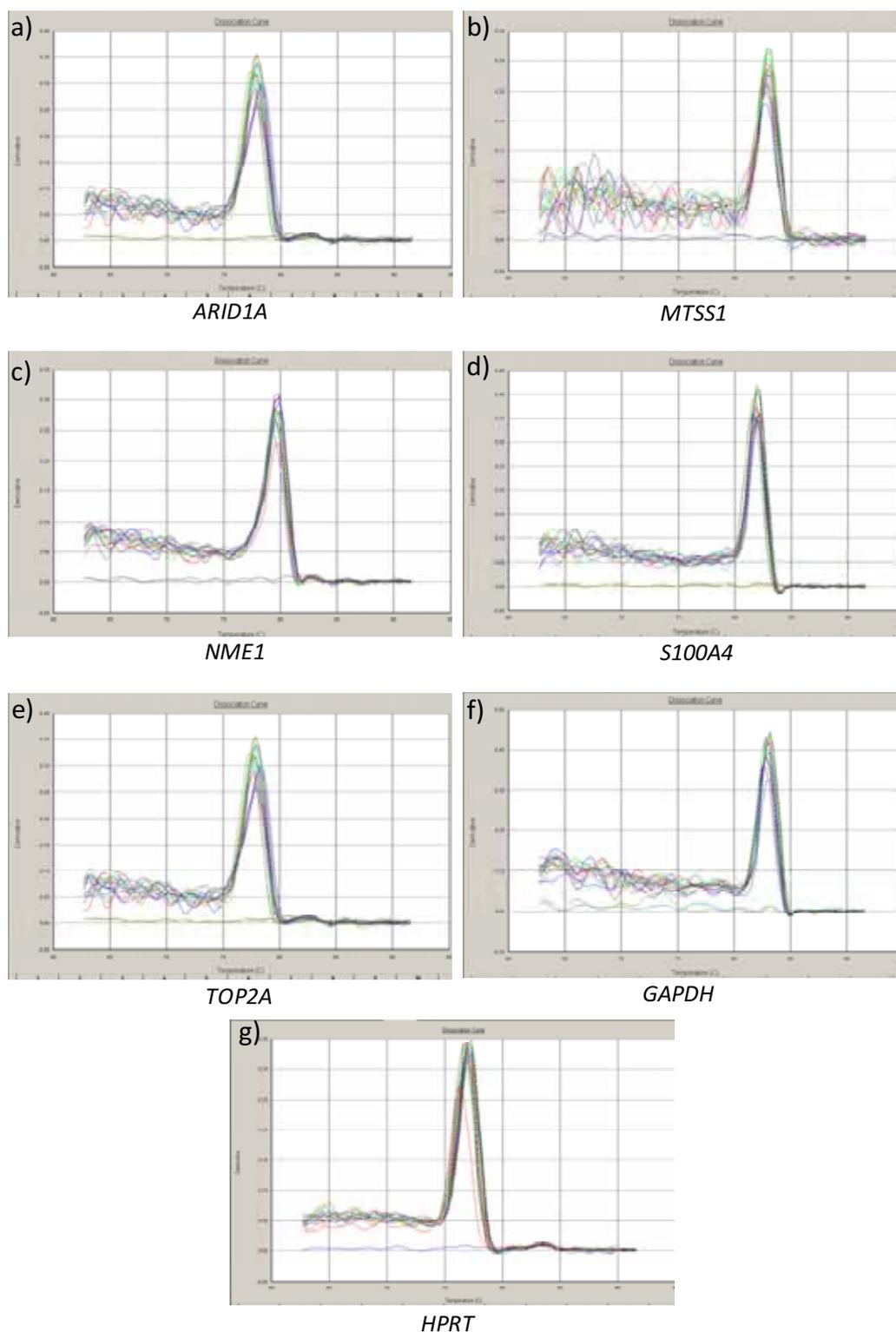


Figura 13. Curvas de dissociação para os genes alvo *ARID1A* (a), *MTSS1* (b), *NME1* (c), *S100A4* (d), *TOP2A* (e) e endógenos *GAPDH* (f) e *HPRT* (g). Estão apresentadas as curvas de dissociação para as amostras 199, 200, 201, 202, 208F1, 208F3, SVO 1

e SVO 3. A presença de um pico único para cada amostra indica a amplificação somente do produto de interesse de cada gene.

Tabela 12. Valores numéricos para cálculo da quantificação relativa referentes a avaliação da expressão por qRT-PCR dos genes alvo *ARID1A*, *MTSS1*, *NME1*, *S100A4*, *TOP2A* e dos endógenos *GAPDH* e *HPRT* em amostras de carcinoma de próstata (CaP), de hiperplasias nodulares da próstata (HNP) e nas margens do tecido adjacente ao tumor (Adj.) comparadas com amostras de tecido prostático normal (proveniente de necropsias - SVO).

Nº	Caso	ARID1A		MTSS1		NME1		S100A4		TOP2A		ARID1A		MTSS1		NME1		S100A4		TOP2A		GAPDH a		GAPDH i		HPRT	
		QR	QR	QR	QR	QR	QR	QR	QR	QR	QR	QR	MCt	MCt	MCt	MCt	MCt	MCt	MCt	MCt	MCt	MCt	MCt	MCt	MCt	MCt	MCt
Carcinoma Prostático (CaP)																											
1	1T	1,39	0,88	0,92	0,69	6,04	29,03	29,36	26,34	27,70	31,64	21,83	NR	NR	28,50												
2	2T	18,98	18,46	0,07	0,01	2,79	28,17	27,89	32,95	36,79	29,90	24,74	NR	NR	25,96												
3	3T	58,53	14,38	0,02	0,01	13,09	28,22	29,93	36,38	38,78	28,37	26,42	NR	NR	26,66												
4	4T	4,49	2,81	0,90	1,58	6,45	28,22	28,58	27,26	27,40	31,23	22,72	NR	NR	28,19												
5	7T	3,76	2,02	0,99	0,41	24,25	29,84	30,41	28,47	30,71	30,54	24,08	NR	NR	29,72												
6	8T	2,62	1,46	0,28	0,30	10,52	31,22	31,74	31,17	32,00	31,23	24,94	NR	NR	29,20												
7	9T	1,47	3,17	0,82	0,71	excluída	32,65	31,22	30,20	31,37	32,63	25,53	NR	NR	30,29												
8	10T	3,26	7,07	1,08	0,51	13,41	26,17	24,73	24,47	26,53	27,73	20,20	NR	NR	26,05												
9	11T	55,76	42,70	3,67	0,04	8,20	29,32	29,39	29,96	37,58	30,91	27,45	NR	NR	28,53												
10	12T	3,40	2,92	1,92	0,00	4,81	27,57	27,47	25,11	-	31,33	21,66	NR	NR	27,86												
11	13T	2,72	1,82	0,28	1,31	26,08	29,13	29,38	29,13	27,85	29,67	22,90	NR	NR	28,65												
12	14T	2,16	1,10	0,49	1,53	9,82	30,03	30,69	28,90	28,20	31,46	23,47	NR	NR	29,02												

13	15T	2,40	1,24	0,78	3,38	20,25	26,90	27,53	25,23	24,07	28,11	20,49	NR	26,72
14	16T	2,32	1,15	0,71	2,36	19,03	26,79	27,49	25,21	24,44	28,21	20,34	NR	26,73
15	17T	5,56	2,43	0,99	0,83	8,31	26,55	27,42	25,75	26,97	27,97	21,35	NR	25,61
16	18T	excluída	excluída	excluída	excluída	8,17	28,46	31,15	37,38	-	30,06	28,17	NR	27,67
17	19T	7,39	1,72	0,96	2,77	12,82	27,22	29,00	26,88	26,30	29,26	22,43	NR	27,21
18	20T	7,65	4,26	2,51	0,34	13,93	28,92	29,45	27,24	31,09	29,03	24,19	NR	27,41
19	21T	7,52	3,62	5,37	1,90	5,46	26,54	27,28	23,74	26,20	28,21	21,78	NR	25,24
20	22T	2,02	1,41	1,16	1,12	13,22	25,72	25,91	23,23	24,24	25,81	19,06	NR	24,12
21	23T	1,11	0,18	0,77	2,25	27,67	31,02	33,31	28,27	27,67	30,62	23,50	NR	29,99
22	24T	4,32	2,24	0,84	3,04	28,05	26,72	27,35	25,79	24,90	28,77	21,16	NR	27,85
23	25T	2,04	0,57	1,04	1,17	14,03	27,08	28,59	24,76	25,55	29,66	20,43	NR	27,74
24	26T	3,29	0,78	0,46	0,73	28,15	27,25	29,00	26,82	27,10	28,75	21,30	NR	27,84
25	27T	4,93	1,64	5,50	1,29	20,04	27,26	28,52	23,81	26,87	29,27	21,89	NR	27,86
26	28T	31,80	36,16	8,49	8,98	12,21	27,85	27,34	26,47	27,34	27,16	25,17	NR	25,35
27	29T	3,46	1,57	1,50	0,74	6,36	25,18	26,00	23,10	25,07	26,26	19,30	NR	23,51
28	30T	3,45	0,97	1,14	1,84	6,34	29,39	30,90	27,70	27,97	32,47	23,51	NR	29,41
29	31T	3,01	1,24	0,84	0,46	7,73	28,10	29,07	26,67	28,47	28,20	22,02	NR	25,73
30	32T	47,38	33,27	11,35	15,75	6,19	26,87	27,06	25,65	26,13	26,55	24,77	NR	23,76
31	33T	5,12	3,16	1,06	1,04	6,41	28,21	28,59	27,19	28,18	31,03	22,90	NR	27,98
32	34T	0,17	0,30	0,19	0,00	excluída	34,15	32,96	30,68	-	41,26	23,90	NR	40,32

33	35T	3,72	1,32	2,04	0,92	22,24	27,54	28,72	25,13	27,24	28,50	21,77	NR	27,24
34	36T	4,70	4,81	1,91	0,45	4,84	27,03	26,67	25,04	28,07	28,11	21,59	NR	24,96
35	37T	6,87	3,22	3,22	2,06	5,43	25,40	26,18	23,21	24,81	29,27	20,51	NR	25,98
36	38T	0,28	0,59	0,21	1,33	49,01	28,60	27,22	25,75	24,03	24,98	19,10	NR	24,86
37	39T	2,83	1,22	1,51	1,35	4,26	28,43	29,32	26,05	27,17	31,21	22,26	NR	27,57
38	40T	4,84	4,71	2,31	0,74	1,42	25,26	24,98	23,04	25,64	28,30	19,86	NR	23,39
39	41T	3,84	2,44	2,15	3,12	13,50	27,73	28,06	25,28	25,70	28,25	22,00	NR	26,27
40	42T	3,62	1,63	1,99	3,08	14,83	26,39	27,22	23,97	24,30	27,06	20,58	NR	25,22
41	43T	1,28	1,30	0,97	0,96	7,11	26,96	26,62	24,09	25,05	28,35	19,65	NR	25,45
42	44T	2,32	0,70	1,13	3,55	4,63	26,84	28,25	24,59	23,90	27,57	20,38	NR	24,05
43	45T	2,72	1,07	0,62	3,76	12,95	29,29	30,32	28,13	26,50	28,83	23,07	NR	26,70
44	46T	1,39	0,78	2,62	0,43	1,64	27,95	28,47	23,75	27,31	30,51	20,75	NR	25,47
45	47T	2,01	0,64	1,15	1,89	4,71	26,32	27,64	23,83	24,08	27,64	19,65	NR	24,11
46	49T	4,84	4,63	4,81	0,37	7,70	23,02	22,77	19,75	24,39	25,18	17,63	NR	22,70
47	50T	2,27	1,00	1,37	2,20	12,17	27,11	27,97	24,56	24,83	26,53	20,62	NR	24,29
48	51T	0,54	0,14	0,14	0,44	3,20	26,84	28,49	25,48	24,81	27,67	18,28	NR	23,63
49	88	1,03	0,83	0,83	0,34	9,00	25,42	26,95	24,86	24,66	25,65	19,48	18,59	NR
50	162	3,62	2,48	2,73	1,79	6,45	26,19	27,95	25,73	24,83	27,56	22,06	20,02	NR
51	168	1,78	1,39	1,52	0,87	1,34	24,65	26,23	24,01	23,30	27,54	19,50	17,74	NR
52	170	3,67	1,70	2,81	0,83	1,12	24,23	26,56	23,75	23,99	28,21	20,12	18,14	NR

53	174	1,07	0,92	1,43	0,42	2,15	25,14	26,56	23,84	24,10	26,64	19,24	17,51	NR
54	176	0,08	0,09	11,04	0,20	16,56	32,82	33,93	26,68	29,10	31,00	23,18	24,82	NR
55	181	6,31	9,58	1,77	1,52	3,08	27,09	27,70	28,05	26,77	32,08	23,76	22,56	NR
56	182	16,25	26,45	9,58	6,37	70,52	26,89	27,40	26,78	25,86	27,85	24,93	22,84	NR
57	184	2,55	2,20	0,72	0,73	12,25	28,28	29,71	29,23	27,70	29,09	23,65	21,56	NR
58	186	7,40	6,59	4,94	3,59	48,17	25,50	26,88	25,21	24,17	28,67	22,40	24,03	NR
59	187	0,75	0,51	1,07	0,82	0,70	29,57	31,33	30,05	28,92	33,92	23,16	22,25	NR
60	188	2,07	1,01	1,24	0,31	5,21	24,77	27,02	24,64	25,14	27,39	19,84	19,54	NR
61	189	2,41	1,72	2,23	1,03	4,91	24,74	26,43	24,97	23,59	27,59	20,02	19,66	NR
62	190	1,52	0,85	2,76	0,52	18,25	27,39	29,44	24,68	26,55	27,08	22,00	21,04	NR
63	195	2,36	5,72	2,28	1,02	10,27	27,35	26,57	25,81	25,47	28,61	22,60	21,74	NR
64	198	1,17	2,75	1,78	0,64	8,57	26,13	26,11	24,40	24,36	26,64	20,37	19,51	NR
65	199	3,07	6,75	1,59	0,88	8,40	24,16	24,24	24,24	23,58	27,03	19,79	19,87	NR
66	200	0,74	3,43	0,81	0,41	9,55	24,71	23,71	23,71	23,19	25,20	18,29	18,23	NR
67	201	6,79	6,39	5,26	3,33	58,49	25,30	26,60	24,80	23,95	26,44	22,08	22,08	NR
68	202	1,42	0,73	1,11	0,40	10,67	27,41	29,57	26,90	26,86	28,46	21,93	21,64	NR
69	203	2,33	1,52	2,42	1,76	6,73	24,55	26,38	24,12	22,58	26,81	19,78	19,33	NR
70	205	1,71	1,30	0,55	0,66	1,50	23,81	24,59	24,51	23,33	28,15	18,78	18,51	NR
71	207	2,60	0,78	1,36	1,31	4,55	24,39	27,34	24,45	22,99	27,29	19,78	19,24	NR
72	209	3,45	2,31	1,33	1,40	2,61	24,43	26,23	24,94	23,35	28,43	20,23	19,59	NR

73	213	0,95	0,34	0,53	0,45	6,17	25,11	26,96	25,02	24,33	26,16	19,23	18,55	NR
74	217	0,64	0,33	0,47	0,81	2,47	24,69	26,02	24,20	22,50	26,52	18,24	17,59	NR
75	218	1,48	1,26	0,72	0,65	7,24	27,51	28,12	27,62	26,84	28,98	22,27	21,61	NR
Mediana CaP		2,72	1,60	1,16	0,90	8,20	27,08	27,64	25,23	25,78	28,30	21,77	19,66	26,71
Hiperplasia Nodular da Próstata (HNP)														
1	160	1,85	31,45	0,43	2,15	16,80	30,86	27,98	32,08	28,26	32,61	25,76	25,53	NR
2	208	0,86	1,01	0,71	1,59	3,25	25,03	26,01	24,42	21,76	26,72	18,82	18,19	NR
3	211	1,65	1,94	0,94	2,47	11,31	27,42	27,57	27,30	24,99	27,82	22,34	21,09	NR
4	213	0,63	0,34	0,53	0,56	1,44	25,02	26,28	24,34	23,33	27,77	18,55	18,07	NR
5	214	25,03	1,05	1,20	3,12	15,45	20,62	25,58	24,08	21,78	25,64	19,47	19,36	NR
6	218	2,06	2,38	0,84	1,08	36,63	28,34	28,51	28,71	27,42	28,03	23,58	23,00	NR
Mediana HNP		1,75	1,50	0,77	1,87	13,38	26,22	26,92	25,86	24,16	27,80	20,90	20,23	NR
Margem Cirurgica ou Tecido Adjacente ao Tumor, histologicamente com ausência de neoplasia (Adj.)														
1	70	1,67	0,86	1,13	0,37	7,34	27,08	29,25	26,78	26,89	29,49	21,84	22,13	NR
2	88	2,63	2,16	1,28	0,51	2,58	26,48	27,98	26,65	26,47	28,98	21,89	19,20	NR
3	172	0,44	1,41	8,34	0,72	1,87	31,26	30,78	25,19	29,54	33,63	24,08	23,38	NR
4	173	1,91	1,30	0,95	5,51	5,76	26,05	27,82	26,18	22,14	28,12	21,00	20,41	NR
5	179	1,35	1,11	0,62	2,31	8,28	26,92	28,42	27,16	23,76	28,24	21,36	21,06	NR
6	193	7,45	28,74	4,77	2,51	39,26	25,83	26,56	25,60	25,02	28,29	22,74	23,36	NR
7	196	1,90	1,41	0,30	3,57	4,86	25,42	27,06	27,21	22,13	27,93	20,36	19,98	NR

8	204	7,58	16,68	4,71	12,62	28,34	26,52	26,30	26,04	23,11	28,53	23,46	23,13	NR
9	205	2,34	2,53	1,59	0,73	4,84	25,68	25,95	25,31	25,52	28,14	21,11	20,19	NR
10	206	3,87	5,17	1,40	3,61	7,01	24,28	25,07	24,87	22,00	27,13	20,24	19,71	NR
11	208	0,83	0,50	0,59	1,76	3,53	26,47	28,42	26,07	23,00	27,99	20,21	19,58	NR
12	210	2,05	1,88	1,49	0,65	3,53	25,16	25,67	24,69	24,97	27,99	20,40	19,54	NR
13	211	0,72	1,12	0,31	0,52	5,60	27,15	26,91	27,46	25,78	28,66	20,89	20,92	NR
14	212	4,22	3,66	1,56	3,39	3,43	23,17	23,76	23,67	21,64	26,02	19,45	19,04	NR
15	213	0,00	10,07	0,00	1,29	120,68	-	32,30	-	33,04	34,80	29,45	30,56	NR
16	214	4,60	2,62	0,00	1,12	46,53	30,22	31,41	-	30,41	32,23	26,62	26,62	NR
17	215	2,18	1,23	1,10	5,17	15,08	24,90	26,11	24,96	21,80	25,73	20,22	19,41	NR
18	216	1,51	1,25	1,24	1,60	10,74	27,43	28,09	26,78	25,49	27,78	22,22	20,97	NR
19	217	2,33	1,18	0,74	0,74	1,44	24,06	25,42	24,78	23,87	28,18	19,48	18,48	NR
Mediana Adj.		2,05	1,41	1,13	1,60	5,76	26,26	27,06	26,04	24,97	28,18	21,11	20,41	NR

QR – quantificação relativa dos genes alvo. Estão destacados, em **negrito**, os valores diferencialmente expressos em cada amostra ($QR \geq 2$: genes regulados positivamente e $QR \leq 0,5$: genes regulados negativamente, para o gene *TOP2A* foi considerado $QR \geq 3,66$: para expressão aumentada e $QR \leq 0,23$: para expressão diminuída). PTR- amostras de próstata provenientes de prostatectomia radical. MCt – média das duplicatas dos Ct de cada amostra. *GAPDH a* – qRT-PCR realizada para o endógeno *GAPDH* com o sistema Power SYBR Green (*Applied Biosystems*). *GAPDH i* – qRT-PCR realizada para o endógeno *GAPDH* com o sistema Platinum SYBR Green (*Invitrogen*), NR – não realizado, (-) expressão gênica não detectada, mesmo após repetições do experimento.

Análise da qualidade do RNA extraído das amostras em blocos de parafina

Embora a quantificação do RNA das amostras a fresco e em blocos de parafina fosse similar, as amostras em parafina mostraram sinais de degradação. Apesar destas condições foram realizados os experimentos de qRT-PCR para os mesmos genes avaliados nas amostras a fresco (*ARID1A*, *MTSS1*, *NME1*, *S100A4* e *TOP2A* e o endógeno *GAPDH*). Os genes *NME1*, *S100A4* e *TOP2A* não amplificaram num subgrupo de amostras testadas. Por este motivo, foi dada continuidade ao experimento apenas para os genes *ARID1A* e *MTSS1*, os quais amplificaram em todos os casos, exceto quatro (casos 74, 83, 85 e 91). Além destes casos, as amostras 22 e 65 foram excluídas da análise por apresentarem Ct médio (MCt) acima de 30 ciclos para o gene endógeno *GAPDH*. Esse nível de amplificação do gene *GAPDH*, que normalmente apresenta bom nível de expressão, indicou que os resultados das qRT-PCR para os genes alvo (geralmente com menor expressão que o endógeno), nestes dois casos poderiam não ser confiáveis.

Análise da expressão do gene *ARID1A*

Amostras a fresco

A expressão do gene *ARID1A* foi detectada em 74/75 amostras de CaP (amostra 18T foi excluída por ter sido detectada expressão tardia para o gene endógeno *GAPDH* utilizado no experimento, MCt>28 mesmo após repetições do experimento, portanto não pode ser considerada a expressão dessa amostra para os genes *ARID1A*, *MTSS1*, *NME1* e *S100A4*), nas seis amostras de HNP e em 18/19 amostras de tecido prostático não-neoplásico adjacente ao tumor (exceto a amostra 213, em que não foi detectada a expressão deste gene, QR=0,00).

A análise da mediana dos QRs (**Tabela 12**) dos CaP revelou um aumento de expressão do gene *ARID1A* (QR= 2,72) em relação às amostras de próstata normais, embora se tenha observado uma grande variação dos níveis de expressão (QR=0,08 a QR=58,53) entre os adenocarcinomas. As amostras de HNP não mostraram diferenças quando comparadas à próstata normal (mediana de QR=1,75). Nas amostras de tecido adjacente ao tumor houve também grande dispersão dos valores de expressão de *ARID1A* (QR=0,44 a QR=7,58; mediana de QR=2,12). A **Tabela 13** apresenta a porcentagem de casos com expressão diminuída, normal ou aumentada

dos genes avaliados e a **Figura 14** mostra a representação gráfica dos níveis de expressão nos diferentes grupos de amostras (CaP, HNP e tecido adjacente) para os genes avaliados.

Tabela 13. Padrão de expressão dos genes *ARID1A*, *MTSS1*, *NME1*, *S100A4* e *TOP2A* nas amostras avaliadas.

Expressão Gênica	CaP	HNP	Tec. Adj.
<i>ARID1A</i>			
Diminuição expressão (QR \leq 0,5)	3 (4%)	0	2 (11%)
Expressão normal (QR $>$ 0,5 e $<$ 2,0)	18 (24%)	4 (67%)	7 (37%)
Aumento expressão (QR \geq 2,0)	53 (72%)	2 (33%)	10 (53%)
Total	74	6	19
<i>MTSS1</i>			
Diminuição expressão (QR \leq 0,5)	6 (8%)	1 (17%)	1 (5%)
Expressão normal (QR $>$ 0,5 e $<$ 2,0)	37 (50%)	3 (50%)	10 (53%)
Aumento expressão (QR \geq 2,0)	31 (42%)	2 (33%)	8 (42%)
Total	74	6	19
<i>NME1</i>			
Diminuição expressão (QR \leq 0,5)	10 (14%)	1 (17%)	4 (21%)
Expressão normal (QR $>$ 0,5 e $<$ 2,0)	42 (56%)	5 (83%)	12 (63%)
Aumento expressão (QR \geq 2,0)	22 (30%)	0	3 (16%)
Total	74	6	19
<i>S100A4</i>			
Diminuição expressão (QR \leq 0,5)	20 (27%)	0	1 (5%)
Expressão normal (QR $>$ 0,5 e $<$ 2,0)	38 (51%)	3 (50%)	10 (53%)
Aumento expressão (QR \geq 2,0)	16 (22%)	3 (50%)	8 (42%)

Total	74	6	19
TOP2A			
Diminuição expressão (QR \leq 0,23)	0	0	0
Expressão normal (QR $>$ 0,23 e $<$ 3,66)	12 (16%)	2 (33%)	6 (32%)
Aumento expressão total (QR \geq 3,66)	61 (84%)	4 (67%)	13 (68%)
QR $>$ 3,66 e \leq 5	7 (10%)	0	2 (11%)
QR $>$ 5 e \leq 10	24 (33%)	0	5 (26%)
QR $>$ 10 e \leq 20	18 (25%)	3 (50%)	2 (11%)
QR $>$ 20 e $<$ 40	8 (11%)	1 (17%)	2 (11%)
QR \geq 40	4 (5%)	0	2 (11%)
Total	73	6	19

Quantificação relativa (QR)

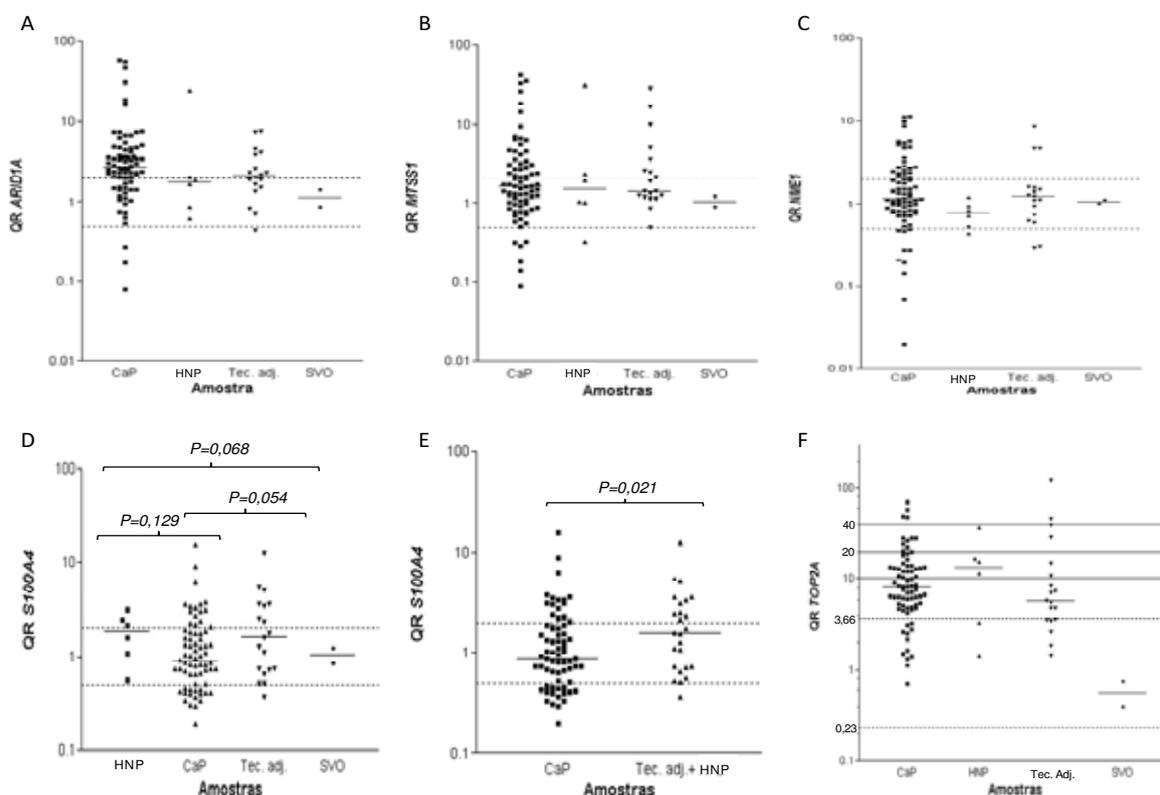


Figura 14. Quantificação relativa (QR) dos genes avaliados nos CaP (n=74), HNP (n=6) e tecido adjacente ao tumor (n=19) em relação à expressão em amostras de próstata normais (SVO, n=2). Para os genes *ARID1A* (A), *MTSS1* (B), *NME1* (C) e *TOP2A* (E) não foram observadas diferenças significativas dos níveis de expressão gênica entre os diferentes grupos de amostras. Para o gene *S100A4* (D e E) observa-se uma tendência de diminuição da expressão gênica nos CaP em relação às amostras de HNP e tecido adjacente ao tumor ($P=0,054$, teste de Mann-Whitney). Existe diferença estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de *S100A4* nas amostras de CaP comparada às amostras agrupadas de HNP e tecido adjacente (E) ($P=0,021$, teste de Mann-Whitney). As barras pontilhadas indicam os limites de diminuição e aumento de expressão para cada gene analisado. Em cada grupo de amostras, as barras indicam as medianas de QR.

Por HR-CGH foram observadas perdas em 1p36.1 presentes em 75% (6/8) das amostras do grupo III, em 63% (5/8) dos tumores primários do grupo I e em 60% (3/5) dos tumores do grupo II. No entanto, por CGH-array, perdas genômicas de BACs

contendo o gene *ARID1A* foram detectadas apenas em 1/6 (16,7%) amostras de tumor primário do grupo I e em 2/6 metástases (uma metástase em testículo e uma em linfonodo). Por outro lado, não foram observadas alterações nos tumores primários dos pacientes do grupo II.

As análises em outro conjunto de amostras para validação dos achados de HR-CGH e CGH-array para expressão do gene *ARID1A* mostraram diminuição da expressão em apenas 3/74 (4%) amostras de CaP (34T, 38T e 176). O caso 34T, que apresentou diminuição de expressão do gene (QR=0,17), não apresentou recidiva bioquímica (PSA pós=0,05ng/mL) durante o seguimento clínico (36 meses). Este caso apresentava baixo risco de recorrência (escore de Gleason baixo e pT2a). Os outros dois casos com diminuição de *ARID1A* apresentaram características de mau prognóstico, tais como: escore de Gleason e risco de recorrência altos, recidiva bioquímica (PSA pós > 0,2ng/mL) e presença de metástase no caso 38T. Além disso, a frequência de diminuição de expressão do gene foi maior no subgrupo de pacientes (24 casos) que apresentaram recidiva bioquímica, detectada pelos valores de PSA pós-prostatectomia ($\geq 0,2$ ng/mL). Dentre os pacientes com recidiva bioquímica, 8% (2/24) mostraram diminuição de expressão do gene *ARID1A* (QR=0,08 e QR=0,28). Sete das 24 amostras (29%) mostraram expressão normal.

Pelo fato da análise de CGH-array ter permitido a identificação de perda do gene *ARID1A* no subgrupo de pacientes com tumores primários que evoluíram para metástase e nas amostras metastáticas e estar ausente nos casos de pacientes que apresentaram prognóstico favorável, foi avaliado se os níveis de *ARID1A* estavam associados com pior prognóstico da doença. Para tanto, foi realizada análise de associação entre os níveis de *ARID1A* (baixo, normal e alto) e a presença ou ausência de recidiva bioquímica. Numa primeira análise foram excluídos os pacientes com PSA pós-cirúrgico $< 0,2$ ng/mL e com menos de 12 meses de seguimento clínico. Os resultados não mostraram associação significativa entre os níveis de *ARID1A* e recidiva bioquímica (n=65, $P=0,0798$, teste de Fischer) (dados não apresentados). Numa segunda análise foram excluídos os pacientes com PSA pós-cirúrgico $< 0,2$ ng/mL (sem recidiva bioquímica) e com menos de 24 meses de seguimento clínico. Esta análise mostrou uma associação estatisticamente significativa entre a expressão normal ou diminuída de *ARID1A* (QR $< 2,0$) e recidiva bioquímica (n=54, $P=0,0223$, Odds Ratio - OR=5,40 Intervalo de confiança - IC_{95%}=1,26-23,05, teste de Fischer). A expressão normal ou diminuída de *ARID1A* foi detectada em 38% dos

casos com recidiva (9/24) e em 10% (3/30) dos pacientes sem recidiva bioquímica até o último seguimento clínico (PSA<0,2ng/mL).

Na comparação entre as amostras obtidas de um mesmo paciente (casos 88, 205, 208, 211, 213, 214 e 218) foram observadas diferenças quanto ao nível de expressão em cada tipo de amostra, conforme pode ser observado na **Tabela 14**. Não foi observado aumento de expressão do gene *ARID1A* nos tumores quando comparados com as amostras de tecido adjacente ou HNP do mesmo paciente. Em 4/5 amostras pareadas de CaP e tecido adjacente ou CaP e HNP (casos 88, 205, 213, 217 e 218) o tecido adjacente ao tumor ou o HNP mostraram expressão aumentada de *ARID1A*, enquanto que todos os tumores apresentaram valores normais de expressão. A única exceção ocorreu no caso 213, em que não foi detectada a expressão de *ARID1A* no tecido adjacente ao tumor (embora o gene endógeno tenha apresentado amplificação); enquanto que o CaP e a HNP mostraram níveis normais de expressão. Este paciente apresentava um tumor com características mais agressivas, escore 8 de Gleason, pT3a, sendo que o fragmento de tumor analisado pela qRT-PCR apresentava um valor de Gleason menor (6, com áreas 5; **Tabela 14**).

Os níveis de expressão do gene *ARID1A* nos tumores foram avaliados segundo cada um dos parâmetros clínico-histopatológicos isolados (escore de Gleason, pTNM, PSA pré e pós-cirúrgico, risco de recorrência, invasão angiolinfática, extensão extra prostática, comprometimento de margem cirúrgica) (**Tabela 14**).

Foi observada associação significativa entre os níveis de expressão de *ARID1A* nos subgrupos de pacientes com e sem recidiva bioquímica, detectada segundo os valores de PSA pós-cirúrgico. Tumores com menores níveis de expressão do gene foram mais freqüentemente associados com recidiva bioquímica (PSA≥0,2ng/mL) pós-prostatectomia. Esta associação foi observada em três análises diferentes. Na primeira, todos os pacientes foram incluídos (n=71, P=0,0355). Na segunda análise foram excluídos os pacientes com PSA<0,2ng/mL e menos de 12 meses de seguimento clínico (n=65, P=0,0241). Na terceira análise foram excluídos os pacientes com PSA<0,2ng/mL e menos de 24 meses de seguimento (**Figura 15**, n=54, P=0,0074).

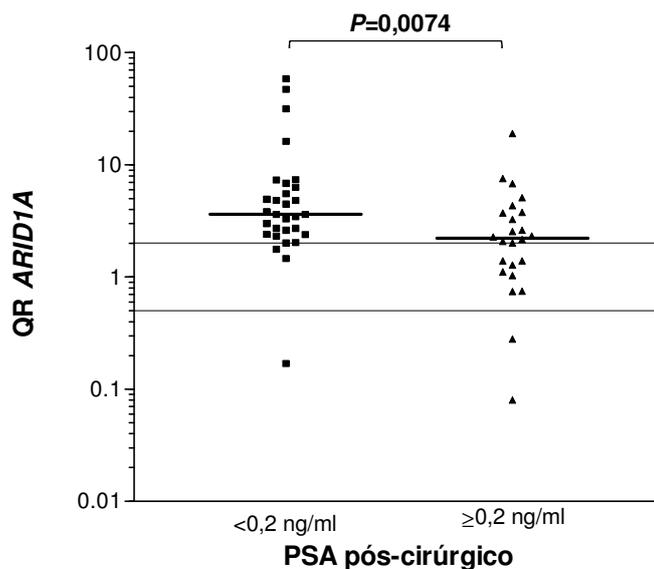


Figura 15. Análise da expressão de *ARID1A* nas amostras de CaP com e sem recidiva bioquímica de acordo com os valores do PSA pós-cirúrgico (n=53). Nesta análise foram excluídos os pacientes com PSA<0,2ng/mL e menos de 24 meses de seguimento. Observam-se diferenças significativas entre os níveis de expressão gênica dos grupos que apresentaram PSA pós <0,2ng/mL e ≥0,2ng/mL (P=0,0074, teste de Mann-Whitney).

Adicionalmente, foi avaliado se os níveis de expressão do gene estavam associados com o tempo de sobrevida livre de doença (SLD). As curvas de sobrevidas foram construídas de acordo com os padrões de expressão de *ARID1A* (expressão diminuída, normal e aumentada) nos grupos de pacientes com e sem recidiva bioquímica. Novamente, foram realizadas três análises diferentes. Na primeira análise foram considerados todos os pacientes (n=71) e se observou uma tendência a associação entre os níveis de expressão de *ARID1A* e o tempo de sobrevida livre de doença (P= 0,0299, Teste de Logrank, **Figura 16A**). Como se pode notar, os comportamentos das curvas de sobrevida dos pacientes com expressão diminuída do *ARID1A* (QR≤0,5) ou normal (0,5<QR<2,0) são muito semelhantes, por este motivo nas análises posteriores estes pacientes foram reagrupados (QR<2,0). Nas outras duas análises foram excluídos os pacientes com PSA<0,2ng/mL e com seguimento clínico menor que 12 meses e 24 meses, respectivamente. Os resultados mostraram que os níveis aumentados de expressão de *ARID1A* estão associados com evolução clínica favorável dos pacientes, com aumento do tempo de sobrevida livre de doença. Os pacientes com níveis normais ou baixos de *ARID1A* mostraram um risco 2,336 maior de recidiva bioquímica (n=65; P= 0,0365, Hazard Ratio - HR=2,336,

IC_{95%}=1,070-7,920) na análise excluindo o grupo de pacientes sem recidiva bioquímica e seguimento clínico menor que 12 meses (**Figura 16B**). Na análise onde foram excluídos os pacientes sem recidiva bioquímica avaliada por menos de 24 meses (**Figura 16C**), níveis normais ou baixos de *ARID1A* foram associados com maior risco de recidiva bioquímica (n=54; P=0,0131; HR=2,706; IC_{95%}= 1,320-10,70). As medianas de sobrevida foram de 17 meses para os pacientes, cujos tumores apresentavam expressão do transcrito normal ou diminuída e de 72 meses para os pacientes com expressão aumentada.

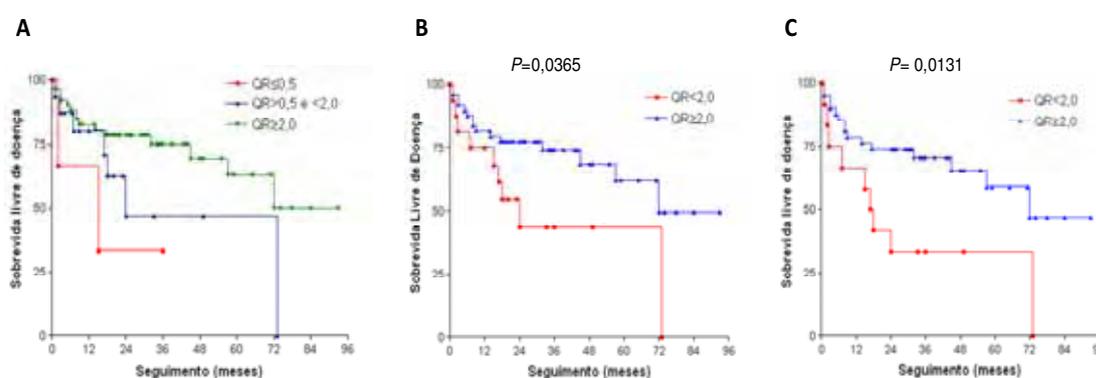


Figura 16. Curvas de sobrevida livre de doença (SLD) de acordo com os níveis de expressão do gene *ARID1A* nas amostras de CaP. **(A)** SLD dos pacientes (n=71) nos grupos de tumores com expressão de *ARID1A* diminuída (QR≤0,5), normal (0,5<QR<2,0) e aumentada (QR≥2,0). Observa-se uma tendência a associação entre os níveis diminuídos ou normais de *ARID1A* com menor tempo de SLD (P=0,0299; Teste de Logrank). **(B)** e **(C)** SLD dos pacientes com tumores expressando níveis diminuídos ou normais (QR<2,0) e aumentados (QR≥2,0) de *ARID1A*, excluindo os pacientes sem recidiva bioquímica com seguimento clínico inferior a 12 meses (B) e inferior a 24 meses (C). Observa-se associação estatisticamente significativa entre níveis diminuídos ou normais de *ARID1A* e menor tempo de SLD tanto em B quanto em C (Teste de Logrank).

Os níveis de transcritos de *ARID1A* foram avaliados nos tumores de acordo com os escores de risco, segundo as características clínico-histopatológicas (escore de Gleason, invasão angiolinfática, extensão extra-prostática, comprometimento de margem cirúrgica e PSA pós-cirúrgico) (**Tabela 14**). Não foram observadas diferenças

significativas entre os níveis de *ARID1A* nas amostras de CaP nos diferentes agrupamentos ($P=0,49$; Anova, teste de Kruskal-Wallis).

Amostras fixadas e em blocos de parafina

A análise da expressão do gene *ARID1A* (**Tabela 15**) nas amostras de CaP obtidos de blocos de parafina apresentou nível de expressão aumentado para 13/14 (93%) amostras (mediana = 7,11). No entanto, só foi utilizada uma amostra de próstata normal em parafina (SVO3) para os cálculos de quantificação relativa do gene *ARID1A* nas amostras de tumor, uma vez que não foi obtido um padrão de amplificação de qualidade na outra amostra controle. Como não foi possível detectar a variação biologicamente normal da expressão do gene em diferentes tecidos prostáticos normais, é possível que os valores de expressão relativa deste gene nos tumores não reflitam os valores reais. Desta forma, optou-se por não incluir essas amostras nas análises agrupadas.

Tabela 14. Expressão relativa dos genes *ARID1A*, *MTSS1*, *NME1*, *S100A4* e *TOP2A* e parâmetros clínico-histopatológicos de amostras de carcinoma primário de próstata, hiperplasia nodular de próstata e tecido adjacente ao tumor de pacientes com CaP.

Caso	Tecido	QR <i>ARID1A</i>	QR <i>MTSS1</i>	QR <i>NME1</i>	QR <i>S100A4</i>	QR <i>TOP2A</i>	Idade	PSA pré (ng/mL)	PSA pós (ng/mL)	Escore Gleason do Fragmento	Escore Gleason da PTR	pTNM	Risco de recorrência	Invasão angiolinfá tica	Extensão extra- prostática	Margem Cirúrgica	Seguimen to (meses)	Tempo livre da doença (meses)	PSADT	Escore	
88*	CaP	1,03	0,83	0,83	0,34	9,00	65	5,82	0,37	7(4+3)	7(4+3)	pT3a	alto	+	+	-	46	2,6		3	
	Adj.	2,63	2,16	1,28	0,51	2,58															
205	CaP	1,71	1,30	0,55	0,66	1,50	67	5,96	0,03	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-	9	9		0	
	Adj.	2,34	2,53	1,59	0,73	4,84															
208	HNP	0,86	1,01	0,71	1,59	3,25	72	8,56	3,85	5(2+3)	5(2+3)	pT2c	moderado	-	-	-	12	12	9,31	1	
	Adj.	0,83	0,50	0,59	1,76	3,53															
211	HNP	1,65	1,94	0,94	2,47	11,31	67	7,80	0,00	6(3+3)	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	8	8		0	
	Adj.	0,72	1,12	0,31	0,52	5,60															
213	CaP	0,95	0,34	0,53	0,45	6,17	65	7,00	0,00	6(3+3)+ área 5	8(3+5)	pT3a	alto	-	+	-	4	4		1	
	HNP	0,63	0,34	0,53	0,56	1,44															
	Adj.	0,00	10,07	0,00	1,29	120,68															
214	HNP	25,03	1,05	1,20	3,12	15,45	68	8,00	0,00	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	+	4	4		2	
	Adj.	4,60	2,62	0,00	1,12	46,53															

18T	CaP	excluíd a	excluíd a	exclu ída	excluída	8,17	72	6,80	0,05	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	+	+	+	42	42	3
19T	CaP	7,39	1,72	0,96	2,77	12,82	60	5,20	0,05	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	+	-	-	39	39	1
20T	CaP	7,65	4,26	2,51	0,34	13,93	79	8,63	s.i.	7(4+3)	7(4+3)	pT2b	moderado	-	-	-	22	22	1
21T	CaP	7,52	3,62	5,37	1,90	5,46	62	20,28	0,32	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	+	+	+	32	32	3
22T	CaP	2,02	1,41	1,16	1,12	13,22	73	21,87	0,12	7(3+4)	7(3+4)	pT3b	alto	+	+	+	36	36	2
23T	CaP	1,11	0,18	0,77	2,25	27,67	63	7,60	0,20	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	+	+	-	30	7	0,66
24T	CaP	4,32	2,24	0,84	3,04	28,05	50	18,16	1,06	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	-	+	-	25	1	2,21
25T	CaP	2,04	0,57	1,04	1,17	14,03	57	4,60	0,03	7(3+4)	7(3+4)	pt2a	baixo	-	-	-	48	48	0
26T	CaP	3,29	0,78	0,46	0,73	28,15	58	2,40	0,00	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	+	-	-	65	65	1
27T	CaP	4,93	1,64	5,50	1,29	20,04	69	20,30	0,00	7(3+4)	7(3+4)	pT4a	alto	-	-	-	35	35	0
28T	CaP	31,80	36,16	8,49	8,98	12,21	62	5,74	0,05	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	-	+	+	49	49	2
29T	CaP	3,46	1,57	1,50	0,74	6,36	65	16,50	0,05	7(4+3)	7(4+3)	pT3a	alto	-	+	-	44	44	2
30T	CaP	3,45	0,97	1,14	1,84	6,34	70	10,30	0,01	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	+	+	-	18	18	1
31T	CaP	3,01	1,24	0,84	0,46	7,73	61	5,70	0,05	7(3+4)	7(3+4)	pt2a	baixo	-	-	-	30	30	0
32T	CaP	47,38	33,27	11,35	15,75	6,19	63	3,93	0,01	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	-	+	+	34	34	2
33T	CaP	5,12	3,16	1,06	1,04	6,41	67	23,30	0,42	7(3+4)	7(3+4)	pT3b	alto	+	+	+	31	9	9,24
34T	CaP	0,17	0,30	0,19	0,00	excluída	74	6,30	0,05	7(3+4)	7(3+4)	pt2a	baixo	-	-	-	36	36	0
35T	CaP	3,72	1,32	2,04	0,92	22,24	60	32,05	0,31	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	+	+	+	5	5	4
36T	CaP	4,70	4,81	1,91	0,45	4,84	68	6,21	0,02	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	-	-	-	21	21	0
37T	CaP	6,87	3,22	3,22	2,06	5,43	60	10,00	0,03	6(3+3)	6(3+3)	pT2b	moderado	-	+	-	93	93	1

174	CaP	1,07	0,92	1,43	0,42	2,15	60	8,09	0,00	6(3+3)	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	23	23	0	
176	CaP	0,08	0,09	11,04	0,20	16,56	62	37,21	0,20	7(4+3)	7(4+3)	pT3a	alto	+	+	+	18,2	15	6,62	5
181	CaP	6,31	9,58	1,77	1,52	3,08	71	9,50	0,02	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-	25	25	0	0
182	CaP	16,25	26,45	9,58	6,37	70,52	65	5,38	0,00	8(3+5)	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	25,9	25,9	0	0
184	CaP	2,55	2,20	0,72	0,73	12,25	64	7,39	0,30	8(5+3)	8(5+3)	pT3a	alto	-	+	+	24	3	8,72	4
186	CaP	7,40	6,59	4,94	3,59	48,17	53	11,36	0,00	8(3+5)	8(3+5)	pT3a	alto	-	+	+	25,3	25,3	3	3
187	CaP	0,75	0,51	1,07	0,82	0,70	63	5,48	1,08	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	+	22	1	2	2
188	CaP	2,07	1,01	1,24	0,31	5,21	65	7,22	0,83	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	+	20,7	1	6,14	2
189	CaP	2,41	1,72	2,23	1,03	4,91	70	6,87	0,00	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	+	24,1	24,1	2	2
190	CaP	1,52	0,85	2,76	0,52	18,25	71	3,10	0,00	6(3+3)	6(3+3)	pT2c	moderado	+	-	-	20	20	1	1
195	CaP	2,36	5,72	2,28	1,02	10,27	59	21,40	0,04	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	alto	-	-	+	20	20	1	1
198	CaP	1,17	2,75	1,78	0,64	8,57	49	4,10	0,00	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-	18,1	18,1	0	0
199	CaP	3,07	6,75	1,59	0,88	8,40	65	7,30	0,00	6(3+3)	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	9,6	9,6	0	0
200	CaP	0,74	3,43	0,81	0,41	9,55	60	11,67	0,30	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	+	16,8	16,8	2	2
201	CaP	6,79	6,39	5,26	3,33	58,49	64	37,95	0,70	8(4+4)	7(4+3)	pT3b	alto	+	+	+	17,4	17,4	5	5
202	CaP	1,42	0,73	1,11	0,40	10,67	71	13,75	0,00	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	+	6,7	6,7	1	1
203	CaP	2,33	1,52	2,42	1,76	6,73	69	>4,0	0,00	8(3+5)	8(3+5)	pT3a	alto	+	+	-	17,5	17,5	3	3
207	CaP	2,60	0,78	1,36	1,31	4,55	56	8,50	0,20	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-	10	8	1	1
209	CaP	3,45	2,31	1,33	1,40	2,61	52	4,50	0,00	6(3+3)	6(3+3)	pT3a	alto	-	+	+	13,8	13,8	2	2
70	Adj.	1,67	0,86	1,13	0,37	7,34	71	9,94	0,03	7(4+3)	7(4+3)	pT2c	moderado	-	-	-	19,7	19,7	1	1

(dóbito por

172	Adj.	0,44	1,41	8,34	0,72	1,87	67	28,64	1,04	8(3+5)	pT3c	alto	-	+	+	32,3	7,1	4
173	Adj.	1,91	1,30	0,95	5,51	5,76	71	17,68	0,93	7(3+4)	pT3b	alto	+	+	+	30	30	3
179	Adj.	1,35	1,11	0,62	2,31	8,28	64	5,63	0,00	7(3+4)+ áreas 5	pT3a	alto	-	+	+	28	28	2
193	Adj.	7,45	28,74	4,77	2,51	39,26	69	19,36	0,01	7(3+4)+ áreas 5	pT2c	moderado	-	-	+	22,6	11	1,53
196	Adj.	1,90	1,41	0,30	3,57	4,86	64	7,00	s.i.	9(4+5)	pT3b	alto	-	+	-	s.i.	s.i.	2
204	Adj.	7,58	16,68	4,71	12,62	28,34	63	6,97	0,00	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	3,1	3,1	0
206	Adj.	3,87	5,17	1,40	3,61	7,01	61	7,77	0,00	7(3+4)	pT2a	moderado	+	-	-	13,4	13,4	2
210	Adj.	2,05	1,88	1,49	0,65	3,53	68	11,08	0,00	6(3+3)	pT2b	moderado	-	-	-	12,6	12,6	0
212	Adj.	4,22	3,66	1,56	3,39	3,43	52	s.i.	0,29	6(3+3)	pT2a	baixo	-	-	-	1,2	1,2	1
215	Adj.	2,18	1,23	1,10	5,17	15,08	52	3,97	0,00	6(3+3)	pT2a	baixo	-	-	-	12,8	12,8	0
216	Adj.	1,51	1,25	1,24	1,60	10,74	75	9,44	0,00	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	1,8	1,8	0

Todos os pacientes desse estudo apresentaram N0 e M0 ao diagnóstico; apenas o caso 38T teve metástase clinicamente comprovada. QR: quantificação relativa dos genes alvo nas amostras de carcinoma de próstata (CaP), hiperplasia nodular da próstata (HNP) e em tecido não neoplásico adjacente ao tumor (Tec. adj.) em relação às amostras de próstata normais; (+) presença; (-) ausência; (s.i.) sem informação; (*) casos que receberam terapia hormonal. Os casos 88, 205, 208, 211, 213, 214, 217 e 218 possuem mais de um fragmento analisado. Os escores de Gleason nos fragmentos de HNP e tecido adjacente correspondem ao escore dado ao tumor no laudo anátomo-patológico. PSADT – PSA doubling time. Escore = escore prognóstico baseado nos dados clínico-histopatológicos.

Tabela 15. Expressão relativa dos genes *ARID1A* e *MTSS1*, e parâmetros clínico-histopatológicos de amostras de carcinoma primário de próstata de arquivos em blocos de parafina.

Caso	QR <i>ARID1A</i>	QR <i>MTSS1</i>	Idade	PSA pré (ng/mL)	Escore Gleason	pTNM	Risco de recorrência	Invasão angiolímfática	Extensão extra- prostática	Margem Cirúrgica	PSA pos (ng/mL)	Seguimento (meses)	Escore
1F1	14,07	2,43	68	10,5	7(3+4)	T2a	moderado	-	+	+	1,12	74	3
22F2	44,63	15,35	63	5,13	6(3+3)	T2c	moderado	+	-	-	0,00	75	1
27F1	9,71	1,42	67	39,32	9(4+5)	T3c	alto	+	+	-	0,47	78	4
40F1	3,46	0,80	69	4,59	5(2+3)	T2b	moderado	-	-	-	0,00	59	0
46F1	11,35	3,29	66	9,94	7(4+3)	T3c	alto	+	+	-	0,02	16	3
48F2	23,18	6,54	56	2,48	6(3+3)	T2	baixo/moderado *	-	-	-	0,00	70	0
65F1	52,71	16,11	65	3,38	7(3+4)	T2c	moderado	-	-	-	0,00	69	0
74F2	Nd	Nd	52	12,39	9(4+5)	T2c	alto	+	+	-	0,00	67	3
78F1	6,17	1,60	69	8,1	7(3+4)	T3a	alto	+	+	-	0,00	57	2
80F1	8,06	2,88	56	25,7	7(3+4)	T3c	alto	-	+	+	0,42	65	3
83F1	Nd	23,59	66	7,33	7(3+4)	T2c	moderado	-	+	+	0,05	43	2
85F1	Nd	Nd	72	8,76	6(3+3)	T2c	moderado	-	-	-	0,00	63	0
88F1	5,46	2,23	65	6,8	7(4+3)	T3a	alto	+	+	-	0,40	46	4
91F1	Nd	Nd	63	9,16	6(3+3)	T2a	baixo	-	-	-	0,00	59	0
168F1	2,83	0,41	70	4,45	8(5+3)	T3a	alto	+	+	-	0,00	28	3
169F1	2,24	0,29	53	1,53	7(3+4)	T2c	moderado	-	-	-	0,00	30	0

185 F1	0,80	0,10	59	3,5	7(3+4)	T3a	alto	+	+	+	0,00	21	3
P29	3,67	0,43	68	10,5	5(2+3)	T2c	moderado	-	-	-	0,05	120	0
Mediana	7,11	2,23											

Todos os pacientes desse estudo apresentaram N0 e M0 ao diagnóstico; QR: quantificação relativa dos genes alvo nas amostras de carcinoma de próstata (CaP), em relação às amostras de próstata normais; (+) presença; (-) ausência; (Nd) expressão não detectada, inclusive para o gene endógeno *GAPDH* ; (*) o risco de recorrência para o caso 48F2 não foi definido com exatidão pois o prontuário apresentava apenas a informação pT2.

Análise da expressão do gene *MTSS1*

Amostras a fresco

A expressão do gene *MTSS1* foi detectada em todas, exceto uma amostra de CaP. Embora os níveis de expressão de *MTSS1* nas amostras de CaP apresentassem grande variação (QR=0,09 a QR=42,70), a mediana das QR das amostras não mostrou diferença importante em relação à expressão das amostras de próstata normais (mediana QR=1,60). As amostras de HNP não mostraram diferença no nível de expressão do *MTSS1* quando comparados à próstata normal (mediana de QR=1,50). No grupo de amostras de tecido prostático adjacente ao tumor foi verificada uma grande dispersão dos valores de expressão do *MTSS1* (QR=0,5 a QR=28,74), sendo a mediana de QR =1,41 (**Tabela 12 e Figura 14**). Semelhante ao observado na análise de *ARID1A*, as amostras de CaP apresentaram um perfil de expressão do *MTSS1* similar às amostras de tecido adjacente ao tumor. Os dados de expressão do gene *MTSS1* estão apresentados na **Tabela 13**.

Por HR-CGH foram observadas perdas envolvendo a região cromossômica 8q24.1 em 75% (6/8) das amostras de CaP e 64% (7/11) das metástases do grupo I, em 80% (4/5) dos CaP do grupo II e em todas as amostras de CaP do grupo III (n=8). Com relação aos resultados da CGH-*array* (dados não apresentados), a perda do BAC contendo este gene foi detectada em 4/6 amostras de tumores primários e em 3/6 metástases pertencentes ao grupo I. Por outro lado, no grupo de pacientes com evolução clínica favorável (grupo II) não foi observada alteração neste gene.

As análises foram realizadas de forma semelhante à descrita para o gene *ARID1A*. Apenas 8% (6/74) dos tumores prostáticos apresentaram expressão diminuída de *MTSS1*. Dentre os pacientes com recidiva bioquímica (PSA pós-cirúrgico $\geq 0,2$ ng/mL), 8% (2/24) mostraram diminuição de expressão do gene *MTSS1* (QR=0,18 e QR=0,09) e 54% (13/24 amostras) mostraram expressão normal. Dentre os casos com tumores com diminuição de expressão do gene e sem recidiva bioquímica, dois (casos 213 e 217) apresentam seguimento clínico de 4 e 12 meses, respectivamente, e um está sendo acompanhado há 36 meses (caso 34T). Este último é o mesmo caso com diminuição de expressão do gene *ARID1A*, comentado anteriormente. Além disso, o caso 51T não foi incluído nessas análises, apesar de apresentar expressão diminuída de *MTSS1*, por não haver informação do PSA pós-cirúrgico disponível.

A comparação entre o padrão de expressão do gene *MTSS1* (expressão normal ou diminuída) nos grupos com e sem recidiva bioquímica não foi estatisticamente diferente. Expressão diminuída ou normal de *MTSS1* foi detectada em 63% dos casos com recidiva (15/24) e em 53% (16/30) dos pacientes sem recidiva bioquímica. Nesta análise foram excluídos os pacientes com PSA pós-cirúrgico $<0,2$ ng/mL e com menos que 24 meses de seguimento clínico.

O padrão de expressão do *MTSS1* foi comparado com cada um dos parâmetros clínicos-histopatológicos isolados e também com os escores de risco. Dentre todos os fatores analisados, o único que mostrou resultados estatisticamente significativos foi o PSA pós-cirúrgico. Observou-se uma tendência a associação ($P=0,0564$) entre menores níveis de transcritos de *MTSS1* e *PSA pós-cirúrgico elevado* ($\geq 0,2$ ng/mL) para o grupo total de pacientes ($n=71$). Quando foram excluídos os pacientes sem recidiva bioquímica (PSA $<0,2$ ng/mL) e os pacientes com seguimento clínico inferior a 12 meses, o poder estatístico foi maior ($P=0,0450$). A expressão gênica diminuída foi prevalente em pacientes com recidiva bioquímica (seguimento clínico superior a 24 meses) ($P=0,0376$, **Figura 17**).

A comparação entre as diferentes amostras de um mesmo paciente revelou diferenças quanto ao nível de expressão (**Tabela 14**). Todos os carcinomas de próstata revelaram expressão diminuída do transcrito quando comparados com as amostras de tecido adjacente.

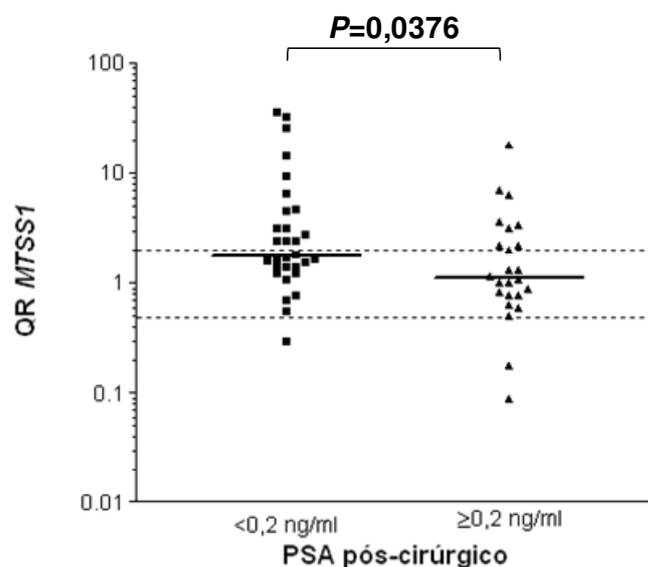


Figura 17. Análise da expressão de *MTSS1* nas amostras de CaP com e sem recidiva bioquímica de acordo com os valores do PSA pós-cirúrgico, excluindo-se as amostras com valores de PSA <0,2ng/mL e com seguimento clínico inferior a 24 meses (n=53). Foram observadas diferenças significativas entre os níveis de expressão gênica entre os dois grupos ($P=0,0376$, teste de Mann-Whitney).

Não foi observada associação entre os níveis de expressão do gene *MTSS1* e o tempo de sobrevida livre da doença ($P=0,5240$, teste Logrank, **Figura 18**). As curvas de sobrevida dos grupos com expressão normal ou aumentada de *MTSS1* foram semelhantes entre si e diferentes da curva do grupo com expressão diminuída do gene. As demais análises não mostraram associação estatística entre os níveis de *MTSS1* e tempo de SLD nos pacientes com CaP, mesmo quando excluídos os pacientes sem recidiva e com seguimento clínico em curto prazo.

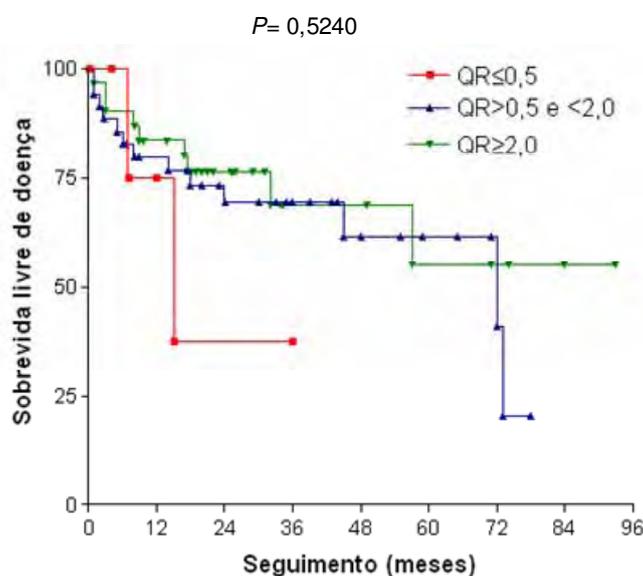


Figura 18: Curvas de sobrevida livre de doença (SLD) de acordo com os níveis de expressão do gene *MTSS1* nas amostras de CaP (n=71). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos comparados ($P=0,5240$, teste de Logrank).

Amostras fixadas e em blocos de parafina

A análise da expressão do gene *MTSS1* realizada nas amostras em blocos de parafina, utilizou como calibrador as duas amostras de SVO (3 e 4, em parafina). Foi observado um aumento de expressão em 8/15 (53%) amostras e diminuição para 4/15 (26%) (**Tabela 16**). Em amostras a fresco foi detectado um aumento de expressão em 42% e diminuição em 8% (**Tabelas 12 e 13**). A mediana da expressão do gene *MTSS1* nas amostras válidas de CaP parafinadas foi de 1,51 muito próxima a mediana da expressão deste gene nas amostras de CaP a fresco (1,60) (**Figura19**).

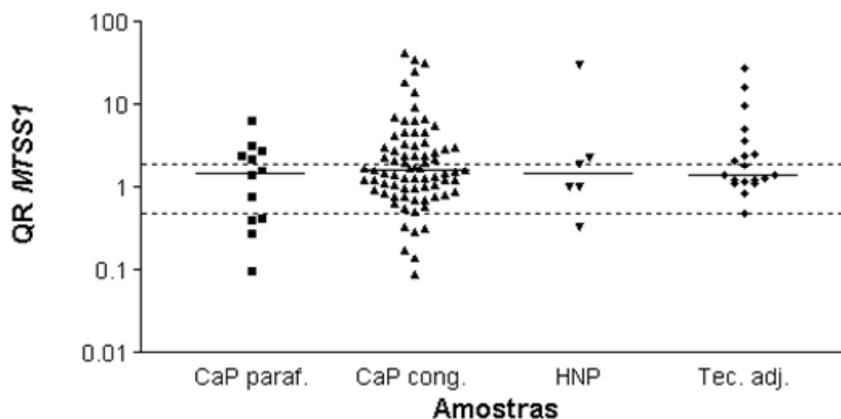


Figura 19. Quantificação relativa (QR) do gene *MTSS1* em amostras CaP obtidas a partir de tecido fixado e em blocos em parafina, CaP a fresco, HNP e tecido adjacente ao tumor em relação à expressão em amostras de próstata normais. As barras pontilhadas indicam os limites de QR=0,5 e QR=2,0. As barras em cada grupo de amostras indicam as medianas de QR.

Com base nas semelhanças entre os níveis de expressão gênica nas amostras de CaP a fresco e em parafina, foram realizadas as mesmas análises com relação aos parâmetros clínico-histopatológicos isolados e agrupados (escores) considerando todas as amostras (material fresco e parafinado) no grupo CaP. Não foram observadas diferenças significativas nestas comparações, nem mesmo se manteve a associação significativa entre recidiva bioquímica (PSA pós-cirúrgico $\geq 0,2$ ng/mL) e níveis mais baixos do transcrito.

Análise da expressão do gene *NME1*

A expressão do gene *NME1* foi detectada em 74/75 amostras de CaP, em seis amostras de HNP e em 17/19 amostras de tecido prostático adjacente ao tumor. As amostras de tecido adjacente 213 e 214, não apresentaram expressão do gene, embora tenha sido observada amplificação tardia do gene endógeno *GAPDH* (**Tabela 12**).

As amostras de HNP mostraram diminuição no nível de expressão do gene *NME1* em relação às amostras de tecido adjacente ao tumor e aos CaP (mediana de QR=0,77), porém sem significância estatística. Houve grande variação nos níveis de transcritos de *NME1* nas amostras de CaP (QR=0,02 a QR=11,35), entretanto a mediana dos QRs das amostras CaP (QR_{med}= 1,16) não apresentou diferença significativa em relação às amostras de próstata normais. Foi verificada dispersão nos valores de expressão do gene *NME1* no grupo de tecido adjacente ao tumor (QR=0,00 a QR=8,34), sendo que mediana de QR foi de 1,13. Semelhante ao observado para os genes *ARID1A* e *MTSS1*, o perfil de expressão do *NME1* no tecido prostático adjacente ao tumor foi similar ao detectado nas amostras dos carcinomas (**Tabela 12 e Figura 14**).

Perdas envolvendo 17q foram detectadas por HR-CGH em 88% (7/8) das amostras de CaP e nas 11 metástases do grupo I, em 60% (3/5) dos CaP do grupo II e em 88% (7/8) dos CaP do grupo III. Os resultados de CGH-array mostraram perda em 3/4 amostras de carcinoma de próstata (75%) de diferentes localizações de dois pacientes (grupo III analisado na plataforma oligonucleotídeos de 19K). Este gene não estava representado na plataforma de BAC HB68 (6K) onde foram analisadas as amostras dos grupos de pacientes I e II. A análise por qRT-PCR do gene *NME1* mapeado nesta região cromossômica revelou diminuição da expressão de *NME1* em 14% dos CaP e aumento em 30% (**Tabela 13**).

Os carcinomas de próstata mostraram expressão diminuída de *NME1* quando comparados ao tecido adjacente do mesmo paciente, com exceção do tecido adjacente do caso 213 onde não foi detectada a sua expressão. Por outro lado, a maioria das amostras de HNP não mostrou expressão alterada do gene, com exceção do caso 160 (QR=0,43, **Tabela 14**).

A análise da expressão do *NME1* comparada com cada um dos parâmetros clínico-histopatológicos isolados ou agrupados em escores não revelou diferenças significativas (**Tabela 14**). Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas entre os níveis normais e diminuídos de expressão gênica e recidiva bioquímica, tampouco com nas análises de sobrevida livre de doença.

Análise da expressão do gene *S100A4*

A expressão do gene *S100A4* foi detectada em 74/75 CaP e em todas as demais amostras analisadas. Os níveis de expressão e as medianas para cada grupo de amostras estão apresentados na **Tabela 12**. A porcentagem de casos com aumento, diminuição e níveis normais de expressão de *S100A4* nos diferentes tecidos pode ser visualizada na **Tabela 13**. No caso dos carcinomas de próstata, 27% (20/74) apresentaram diminuição de expressão e 22% (16/74) aumento. Por outro lado, nas amostras de tecido adjacente, apenas 5% (1/19) mostrou diminuição de expressão e 42% (8/19) aumento. Os níveis do transcrito detectados nos CaPs mostraram-se marginalmente significantes em relação ao tecido adjacente ($P=0,054$). Quando os tecidos adjacentes e hiperplasias foram agrupados, foi observado que os CaP apresentaram diminuição significativa de expressão do gene *S100A4* ($P= 0,021$) (**Figura 14**).

As amostras de um mesmo paciente apresentaram diferenças quanto ao nível de expressão (**Tabela 14**). As amostras de HNP apresentaram expressão aumentada em comparação com o tecido adjacente do mesmo paciente; por outro lado, a expressão nos carcinomas de próstata, em relação às amostras de tecido adjacente e HNP, não se mostrou diferente.

Ganhos envolvendo a 1q21.2 foram detectados por HR-CGH em 38% (3/8) dos CaP e em 55% (6/11) das metástases do grupo I, em 20% (1/5) dos CaP do grupo II e em 25% (2/8) dos CaP do grupo III. A análise da expressão do gene *S100A4* mapeado nesta região mostrou que 22% dos CaP apresentaram aumento da expressão.

Por outro lado, perda em 1q21.2 (HR-CGH) foram observadas em 50% (4/8) dos CaP e em 9% (1/11) das metástases do grupo I e em 50% (4/8) dos CaP do grupo III. A análise da expressão de *S100A4* por qRT-PCR mostrou que 27% dos CaP apresentaram diminuição de expressão. Os resultados de CGH-array mostraram perda do BAC que continha a família dos genes *S100* em 2/4 (50%) amostras de tumores primários do grupo II, ou seja, que evoluíram sem recorrência ou metástase; e perda de 1/4 amostras (25%) de tumor primário no grupo de pacientes que desenvolveram metástase (grupo I).

Na comparação com os parâmetros clínico-histopatológicos, foi encontrada uma associação significativa entre os níveis aumentados de expressão de *S100A4* em tumores que apresentaram *extensão extra-prostática* (**Figura 20A**) ($P=0,020$; $OR=5,66$, $IC_{95\%}=1,171-27,37$, teste de Fisher). Aumento de expressão de *S100A4* foi

observado em 30% (13/44) dos pacientes com extensão extra-prostática comparado a 7% (2/29) dos pacientes sem extensão extra-prostática.

Quanto aos parâmetros agrupados em escores, foi observado que os tumores com a presença de pelo menos um fator de pior prognóstico (escore de 1 a 5) apresentaram maior expressão de *S100A4* em relação às amostras de CaP com ausência de qualquer fator de risco (escore zero, indicativo de bom prognóstico) (Figura 20B).

Não foram observadas diferenças significativas quando os níveis de *S100A4* foram comparados nos grupos com e sem recidiva bioquímica. A análise de sobrevida livre de doença também não mostrou associação com a expressão de *S100A4*.

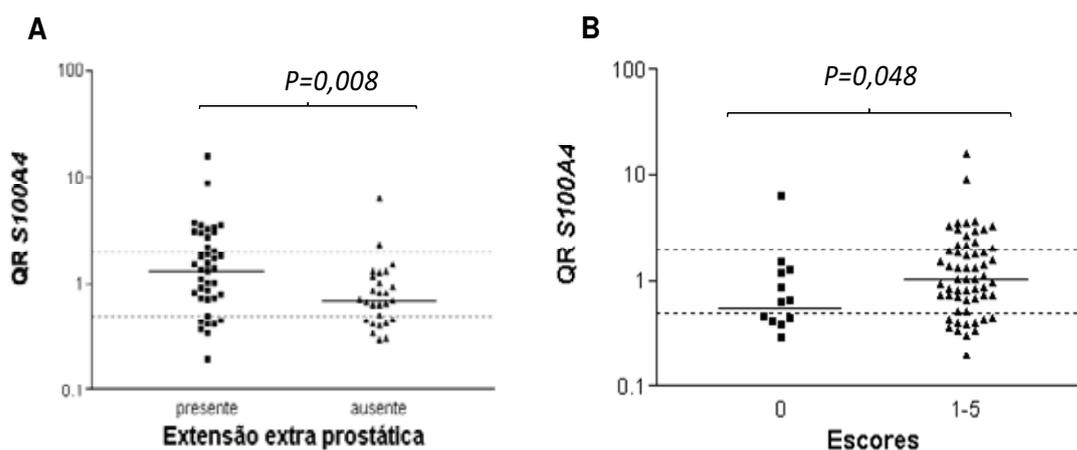


Figura 20. Análise da expressão de *S100A4* nas amostras de CaP em relação às características clínico-histopatológicas. **A)** CaPs com extensão extra-prostática apresentaram maiores níveis de *S100A4* em relação a ausência desta característica ($P=0,008$, teste de Mann-Whitney). **B)** Características clínico-histopatológicas agrupadas em escores, revelando que a presença de pelo menos um fator de pior prognóstico está relacionado a níveis mais altos de expressão do gene ($P=0,048$, teste de Mann-Whitney). As barras pontilhadas indicam os limites de QR=0,5 e QR=2,0. As barras em cada grupo de amostras indicam as medianas de QR.

Análise da expressão do gene *TOP2A*

Para a análise de expressão do gene *TOP2A* foram considerados limites diferentes dos adotados para os demais genes (ganho: QR \geq 2,0 e perda: QR \leq 0,5), pois houve uma grande dispersão nos valores de expressão desse gene para as amostras controle (SVO). Por este motivo foi calculada a média e desvio-padrão dos controles. Os valores de referência para este gene foram estabelecidas em QR \geq 3,66 para expressão aumentada e QR \leq 0,23 para expressão diminuída (**Tabela 12**).

A expressão do gene *TOP2A* foi detectada em 73/75 amostras e em todas as demais amostras analisadas. As amostras CaP, HNP e tecido adjacente mostraram aumento no nível de expressão do gene *TOP2A* em relação às amostras normais (**Figura 14**). Houve grande variação da expressão dos transcritos de *TOP2A* nas amostras de CaP (QR=0,70 a QR=70,52), entretanto, a mediana dos QRs apresentou aumento em relação às amostras de próstata normais (mediana QR=8,20). Foi verificada uma grande dispersão nos valores de expressão do gene *TOP2A* no grupo de tecido adjacente ao tumor (QR=1,44 a QR=120,68) (mediana de QR=5,76). Semelhante ao observado para os genes *ARID1A*, *MTSS1* e *NME1*, o perfil de expressão no tecido prostático adjacente ao tumor foi similar ao detectado nas amostras dos carcinomas. As amostras de HNP também apresentaram expressão aumentada do transcrito *TOP2A* (mediana dos QR=13,38).

A porcentagem de casos com aumento e com níveis normais de expressão estão relacionados na **Tabela 13**. Não foi observada diminuição da expressão de *TOP2A* em nenhuma amostra.

A avaliação por CGH-array para o gene *TOP2A* apontou ganhos em uma amostra de um total de 4 avaliadas, sendo duas amostras de cada paciente (grupo III, analisado na plataforma de 19k7.1 *single-spotted microarrays*), em 1/4 amostras de carcinoma prostático do grupo II (boa evolução, caso P29) e em 1/6 amostras de CaP e em 1/6 metástases dos pacientes do grupo I avaliados na plataforma BACs HB68 (6k). Por HR-CGH não foram detectados ganhos significativos na região cromossômica 17q12-21, entretanto, a amostra P29 também apresentou ganho de 17q12-21, confirmando o resultado de CGH-array. Pela análise de expressão 84% dos CaPs apresentaram expressão aumentada de *TOP2A*, sendo que 41% apresentou alto nível de expressão (QR>10).

Na comparação entre as diferentes amostras de um mesmo paciente foram observadas diferenças quanto ao nível de expressão, conforme pode ser observado na **Tabela 14**. Em geral os CaPs apresentaram expressão mais alta que tecido adjacente ao tumor e HNP do mesmo paciente. A comparação entre HNP e tecido adjacente mostrou que estes tiveram níveis mais altos que aqueles.

Com relação aos parâmetros clínico-histopatológicos isolados ou agrupados em escores considerados nesse estudo, foi encontrada associação positiva entre os níveis de expressão de *TOP2A* e escores de Gleason (**Figura 21**). Os tumores com escores de Gleason mais altos também apresentaram os níveis mais altos de expressão de *TOP2A* (**Tabela 17**). A **Figura 21C** mostra uma representação gráfica dos níveis de *TOP2A* e sua distribuição de acordo com escore de Gleason baixo ou alto. Observa-se que todos os tumores com níveis mais baixos de *TOP2A* (categorias 0 e 1, ou QR<5) apresentavam escore de Gleason baixo. Por outro lado, todos os tumores com os maiores níveis de *TOP2A* (categoria 5, ou seja, QR≥40) apresentam escores de Gleason alto.

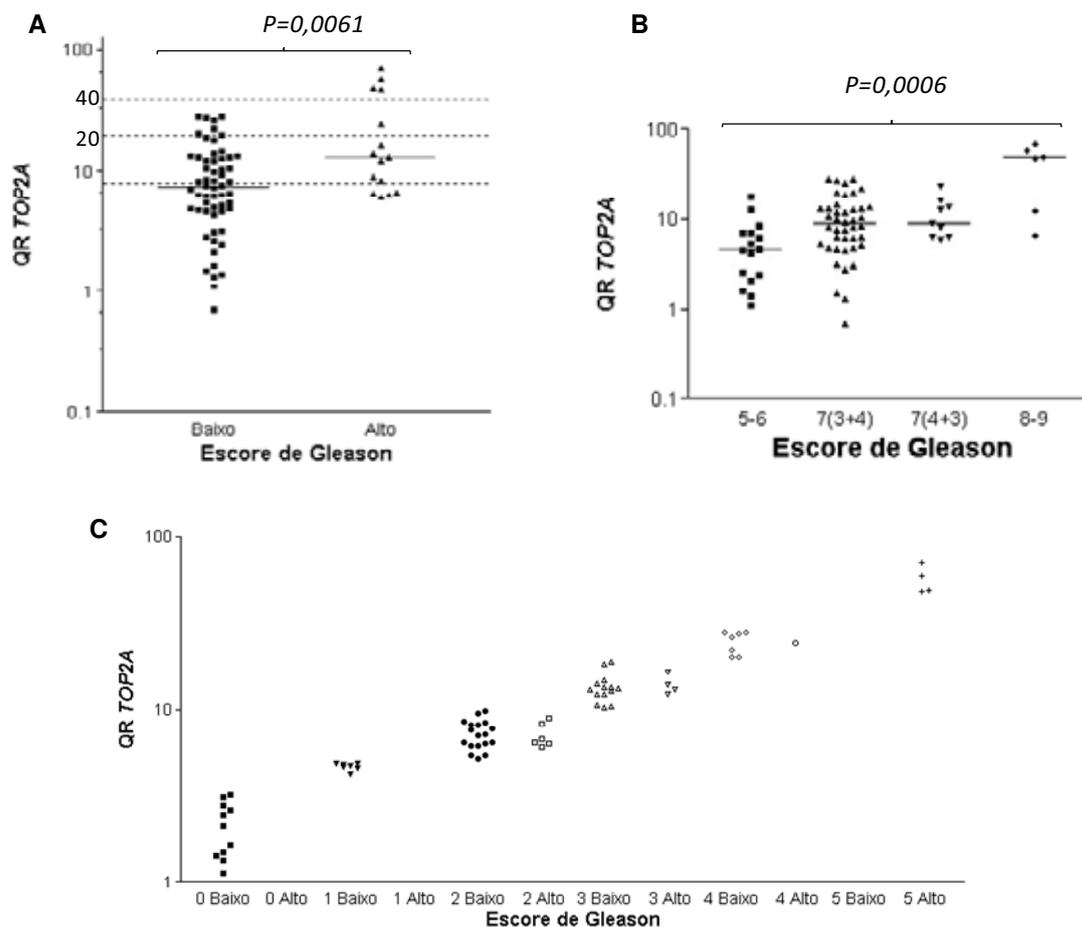


Figura 21. Análise da expressão de *TOP2A* com relação ao escore de Gleason nas amostras CaP. **A)** Foram agrupados os CaPs com escores de Gleason baixo (menores que 7=3+4) e alto (maiores que 7=4+3) revelando diferença significativa ($P=0,0061$, teste Mann-Whitney). **B)** A análise da expressão considerando escores de Gleason 5 e 6, 7 (3+4 e 4+3, separadamente) e 8 e 9 mostra que os níveis mais altos de expressão gênica foram detectados nos CaP com escores de Gleason mais altos ($P=0,006$, ANOVA, teste de Kruskal-Wallis). **C)** Os níveis de expressão do *TOP2A* foram categorizados de 0 a 5 e em cada categoria foram considerados escores baixo (menores que 7=3+4) e alto (maiores que 7=4+3):

- 0 = QR < 3,66
- 1 = QR ≥ 3,66 < 5
- 2 = QR ≥ 5 < 10
- 3 = QR ≥ 10 < 20

4 = QR \geq 20<40

5 = QR \geq 40

Esta representação gráfica revela que todos os tumores com níveis mais baixos de *TOP2A* (categorias 0 e 1) apresentavam escore de Gleason baixo enquanto que todos os tumores com os maiores níveis de *TOP2A* (categoria 5) apresentam escores de Gleason alto. As barras em cada grupo de amostras indicam as medianas de QR.

Tabela 17. Categorização do nível de expressão de *TOP2A* em níveis de 0 a 5 para os 73 CaP.

Caso	QR TOP2A	Idade	PSA pré (ng/mL)	PSA pós (ng/mL)	Gleason Fragmento	Escore Gleason Fragmento	Escore Gleason PTR	pTNM	Risco de recorrência angiolinfática	Invasão	Extensão extra- prostática	Margem Cirúrgica	Tempo livre da doença (meses)	Seguimento (meses)	Escore
Nível 0 (TOP2A QR<3,66)															
187	0,7	63	5,48	1,08	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	+	1	21	2
170	1,12	70	4,98	0,10	baixo	6(3+3) área 5	8(5+3)	pT2c	alto	-	-	-	12	12	1
168	1,34	70	4,45	0,00	baixo	7(3+4) ^e área 5	8(5+3)	pT3a	alto	+	+	-	28	28	3
40T	1,42	53	1,80	0,02	baixo	6(3+3)	6(3+3)	pT2b	moderado	+	+	-	74	74	2
205	1,5	67	5,96	0,03	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-	9	9	0
46T	1,64	60	17,10	0,30	baixo	6(3+3)	6(3+3)	pT2b	moderado	-	-	-	10	85	1
174	2,15	60	8,09	0,00	baixo	6(3+3)	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	23	23	0
217	2,47	62	6,95	0,00	baixo	6(3+3)	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	-	s.i.	s.i.	1
209	2,61	52	4,50	0,00	baixo	6(3+3)	6(3+3)	pT3a	alto	-	+	+	7	7	2
2T	2,79	56	21,90	0,46	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3b	alto	+	+	+	32	53	4
181	3,08	71	9,50	0,02	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-	25	25	0

51T	3,2	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3b	alto	+	+	+	s.i.	32 – óbito por aneurisma cerebral	3
Nível 1 (TOP2A QR≥3,66 <5)																
39T	4,26	47	1,80	s.i.	s.i.	baixo	6(3+3)	6(3+3)	pT2b	baixo	+	-	-	s.i.	64	1
207	4,55	56	8,50	0,20	0,20	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-	10	12	1
44T	4,63	66	11,70	0,00	0,00	baixo	5(3+2)	5(3+2)	pT3a	alto	+	-	-	78	78	1
47T	4,71	57	8,20	0,50	0,50	baixo	5(2+3)	5(2+3)	pT2b	moderado	+	-	-	19	87	2
12T	4,81	60	4,22	0,05	0,05	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	+	+	+	19	19	2
36T	4,84	68	6,21	0,02	0,02	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	-	-	-	21	21	0
189	4,91	70	6,87	0,00	0,00	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	+	+	+	19	19	2
Nível 2 (TOP2A QR≥5<10)																
188	5,21	65	7,22	0,83	0,83	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2c	moderado	-	+	+	1	16	2
37T	5,43	60	10,00	0,03	0,03	baixo	6(3+3)	6(3+3)	pT2b	moderado	+	-	-	93	93	1
21T	5,46	62	20,28	0,32	0,32	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	+	+	+	32	32	3
1T	6,04	65	13,94	0,23	0,23	alto	7(4+3)	7(4+3)	pT2b	moderado	-	-	-	23	78	2
213	6,17	65	7,00	0,00	0,00	baixo	6(3+3)+ areas 5	8(3+5)	pT3a	alto	+	-	-	4	4	1
32T	6,19	63	3,93	0,01	0,01	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	+	+	+	34	34	2
30T	6,34	70	10,30	0,01	0,01	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	+	-	-	18	18	1
29T	6,36	65	16,50	0,05	0,05	alto	7(4+3)	7(4+3)	pT3a	alto	+	-	-	44	44	2

33T	6,41	67	23,30	0,42	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt3b	alto	+	+	+	9	31	4
4T	6,45	72	7,32	0,00	alto	7(4+3)	7(4+3)	pt3a	alto	+	+	-	31	31	3
162	6,45	58	>4,0	0,06	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt3a	alto	-	+	-	34	34	1
203	6,73	69	>4,0	0,00	alto	8(3+5)	8(3+5)	pt3a	alto	+	+	-	4	4	3
43T	7,11	59	3,40	0,22	baixo	6(3+3)	6(3+3)	pt2b	moderado	-	-	-	73	76	1
218	7,24	74	4,84	s.i.	baixo	6(3+3)	7(3+4)	pt2c	moderado	-	-	+	s.i.	s.i.	1
49T	7,7	67	14,80	0,01	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt3a	alto	-	+	+	84	84	2
31T	7,73	61	5,70	0,05	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt2a	baixo	-	-	-	30	30	0
18T	8,17	72	6,80	0,05	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt3a	alto	+	+	+	42	42	3
11T	8,2	54	7,30	0,05	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt2a	baixo	-	-	-	8	8	0
17T	8,31	55	22,10	0,00	alto	7(4+3)	7(4+3)	pt3a	alto	+	+	-	29	29	3
199	8,4	65	7,30	0,00	baixo	6(3+3)	6(3+3)	pt2c	moderado	-	-	-	10	10	0
198	8,57	49	4,10	0,00	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt2c	moderado	-	-	-	11	11	0
88	9	65	5,82	0,37	alto	7(4+3)	7(4+3)	pt3a	alto	+	+	-	3	46	3
200	9,55	60	11,67	0,30	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt3a	alto	-	+	+	4	4	2
14T	9,82	71	7,10	0,20	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt3a	alto	-	+	+	45	45	2
Nivel 3 (TOP2A QR≥10<20)															
195	10,27	59	21,40	0,04	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt2c	alto	-	-	+	20	20	1
8T	10,52	48	7,60	0,05	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt2b	moderado	-	-	-	55	55	0
202	10,67	71	13,75	0,00	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pt2c	moderado	-	-	+	7	7	1

50T	12,17	62	s.i.	0,75	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT4b	alto	s.i.	s.i.	72	83	1
28T	12,21	62	5,74	0,05	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	-	+	49	49	2
184	12,25	64	7,39	0,30	alto	8(5+3)	8(5+3)	pT3a	alto	-	+	4	22	4
19T	12,82	60	5,20	0,05	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	39	39	1
45T	12,95	67	8,70	0,02	baixo	5(3+2)	5(3+2)	pT2b	moderado	-	+	59	59	1
3T	13,09	64	9,20	0,03	alto	7(4+3)	7(4+3)	pT3a	alto	-	+	29	29	3
22T	13,22	73	21,87	0,12	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3b	alto	-	+	36	36	2
10T	13,41	61	17,80	0,94	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	-	+	3	53	3
41T	13,5	61	6,23	0,02	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	71	71	2
20T	13,93	79	8,63	s.i.	alto	7(4+3)	7(4+3)	pT2b	moderado	-	-	22	22	1
25T	14,03	57	4,60	0,03	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2a	baixo	-	-	48	48	0
42T	14,83	61	6,23	0,02	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	71	71	2
176	16,56	62	37,21	0,20	alto	7(4+3)	7(4+3)	pT3a	alto	+	+	15	18	5
190	18,25	71	3,10	0,00	baixo	6(3+3)	6(3+3)	pT2c	moderado	+	-	20	20	1
16T	19,03	66	33,61	0,30	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	-	-	4	29	1
Nível 4 (TOP2A QR≥20<40)														
27T	20,04	69	20,00,3	0,00	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT4a	alto	-	-	35	35	0
15T	20,25	56	9,60	0,05	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT4a	alto	-	+	43	43	2
35T	22,24	60	32,05	0,31	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	+	+	5	5	4
7T	24,25	55	14,00	0,92	alto	7(4+3)	7(4+3)	pT3a	alto	-	+	57	57	4

13T	26,08	64	7,50	0,05	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	-	43	43	1
23T	27,67	63	7,60	0,20	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	-	4	30	2
24T	28,05	50	18,16	1,06	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	-	+	-	6	25	2
26T	28,15	58	2,40	0,00	baixo	7(3+4)	7(3+4)	pT2b	moderado	+	-	-	65	65	1
Nível 5 (TOP2A QR≥40)															
186	48,17	53	11,36	0,00	alto	8(3+5)	8(3+5)	pT3a	alto	-	+	+	18	18	3
23 -															
38T	49,01	43	9,90	0,70	alto	9(5+4)	9(5+4)	pTXN1M1c	alto	-	-	-	2	2	2
201	58,49	64	37,95	0,70	alto	8(4+4)	7(4+3)	pT3b	alto	+	+	+	3	10	5
182	70,52	65	5,38	0,00	alto	8(3+5)	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	19	19	0

Todos os pacientes desse estudo apresentaram N0 e M0 ao diagnóstico; apenas o caso 38T teve metástase clinicamente comprovada. QR: quantificação relativa do gene alvo nas amostras de carcinoma de próstata (CaP) em relação às amostras de próstata normais; (+) presença; (-) ausência; (s.i.) sem informação. Escore = escore prognóstico baseado nos dados clínico-histopatológicos.

DISCUSSÃO

HR-CGH

No presente estudo foram observadas perdas e ganhos em todas as 22 amostras de CaP estudadas, sendo observado um maior número de alterações envolvidas em perdas do que em ganhos genômicos. Estes achados são concordantes com os descritos por Ribeiro *et al.* (2006). Os autores avaliaram 51 amostras de CaP primários por HR-CGH e utilizaram como referência uma biblioteca de 10 casos normais (110 metáfases) para delimitar o intervalo de confiança. Foram observadas perdas em 43% dos casos (22/51) e ganhos em apenas 10% (5/51) dos casos.

Resultados utilizando CGH cromossômico em carcinomas de próstata revelam perdas genômicas freqüentes em 8p, 13q, 16 e 18q (Cher *et al.*, 1994, 1996; Joos *et al.*, 1995; Visakorpi *et al.*, 1995; Nupponen *et al.*, 1998a; 1998b; Virgin *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2000; Alers *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2001; Rökman *et al.*, 2001; Zitzelsberger *et al.*, 2001; Beheshti *et al.*, 2002; Kasahara *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2002; Wolter *et al.*, 2002a; 2002b; Chu *et al.*, 2003; Kraus *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2004; Kasahara *et al.*, 2005). Perdas nos cromossomos 19, 20, 21q e 22q também são relatadas, mas em menor freqüência (Cher *et al.*, 1994, Visakorpi *et al.*, 1995; Joos *et al.*, 1995; Nupponen *et al.*, 1998a; 1998b; Alers *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2001; Wolter *et al.*, 2002a; Kraus *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos na presente investigação revelaram perdas freqüentes dos cromossomos 1p, 2, 3q, 4p, 5q, 7, 8, 9q, 10q, 11q, 12q, 14q, 15q, 16q, 17q, 18q, 19, 20q e 22q em 18 dos 22 casos avaliados (80%). Visakorpi *et al.* (1995) relataram uma freqüência de perda cinco vezes mais freqüente do que os ganhos. As alterações descritas pelos autores (8p, 13q, 6q, 18q, e 9p em freqüências variáveis de 16 a 32%) também foram observadas no presente estudo, porém em freqüências aproximadas a 50% dos casos. A diferença entre as duas análises é que o presente estudo usou HR-CGH que apresenta uma resolução muito maior na detecção de perdas e ganhos genômicos. Shoumans *et al.* (2004) demonstraram que a HR-CGH pode ser usada para detectar deleções inferiores a 1,8Mb, entretanto, em

alguns casos rearranjos >5Mb não são detectados. Duplicações heterozigotas são mais difíceis de serem detectadas do que deleções, pelo fato da razão verde:vermelho para as duplicações ser de 3:2 enquanto que para deleções ser de 1:2. A resolução da HR-CGH é variável e pode depender da região cromossômica envolvida. Variações nas condições da hibridação, bem como a condensação cromossômica e a presença de seqüências repetitivas, podem interferir na qualidade da CGH, não permitindo a detecção de determinadas alterações genômicas.

A deleção em 8p é a alteração genética mais comumente relatada no câncer de próstata e tem sido descrita como uma alteração inicial da tumorigênese prostática, por ser um achado freqüente em PIN (Emmert-Buck *et al.*, 1995, Huang *et al.*, 1996; Hughes *et al.*, 2006). Em nosso estudo, foi detectada perda da região mínima **8p12** em 70% dos CaP do grupo II e **8p11.2-23** em 70% dos CaP do grupo III. A análise de CGH-array confirmou a perda de 8p12 como sendo uma alteração presente nos CaP do grupo II e ausente nos CaP do grupo I. He *et al.* (1997) mapearam em 8p21 o gene *NKX3.1*, o qual apresenta uma ação específica na próstata em humanos, é regulado por andrógenos e essencial para o desenvolvimento normal da próstata. A *NKX3.1* é uma proteína de ligação ao DNA, cuja função é reprimir a expressão do gene *PSA* (Chen *et al.* 2002). Bowen *et al.* (2000), analisaram a expressão dessa proteína por imunohistoquímica em *tissue microarrays* e relataram a sua ausência completa em 5% das hiperplasias prostáticas benignas, 20% das lesões intra epiteliais prostáticas, em 6% dos CaP de baixo grau, em 34% dos CaP independentes de andrógenos e em 78% das metástases de CaP. Os autores concluíram que a ausência de expressão da *NKX3.1* está fortemente associada com doença refratária a hormônios e estágios avançados do CaP. Revisando esses achados, Hughes *et al.* (2006) concluíram que a ausência da proteína *NKX3.1* pode estar associada com o aumento das concentrações de PSA durante a progressão do CaP. A plataforma de CGH-arrays usada em um estudo prévio do nosso grupo não continha o gene *NKX3.1*, e portanto, não foi possível a comparação entre os dois estudos.

A região **8p22** contém genes supressores tumorais (GSTs) conhecidos, como *MSR1* e *N33*. O gene *MSR1* codifica a proteína *macrophage scavenger receptor*, responsável pela captura celular de macromoléculas, incluindo parede celular bacteriana e, portanto, está relacionado com resposta celular a processos inflamatórios. Em um estudo, Bova *et al.* (1993) relataram a perda de um dos alelos desse gene em 20 de 29 tumores de próstata e uma amostra de metástase de CaP apresentou deleção homozigota deste gene.

A segunda perda mais freqüentemente relatada no câncer de próstata envolve 13q. Zitzelsbeger *et al.* (2001) relatam a maior freqüência de perda em 13q22 em 21 tumores primários analisados. Esse achado também foi descrito por Kasahara *et al.* (2005) ao analisarem 20 tumores de próstata em estágio pT2N0. Em nosso estudo foi detectada perda da região mínima **13q14-21** em mais de 50% das amostras do grupo I (5/8 CaP e 4/11 metástases), em mais de 70% das amostras do grupo III (6/8 CaP) e em uma única amostra do grupo II (P32). A perda de **13q12-13** foi detectada nos CaP dos pacientes que evoluíram para metástases em testículo e considerada como uma das alterações presentes em mais de 70% das amostras do grupo I e ausentes nas amostras do grupo II. Perda de **13q33-34** foi detectada nas metástases ósseas. A região **13q21** estava envolvida em perda nos tumores primários do pacientes que tiveram metástases em linfonodos e estava envolvida em ganho nas amostras do grupo II e nas amostras de PIN (166F1 e F2). A perda de **13q14** foi também descrita por Wolter *et al.* (2002a) em 48 tumores de próstata analisados. Nessa região cromossômica está mapeado o gene *RB1*, um gene supressor tumoral candidato para o desenvolvimento do câncer de próstata, como relatado por Yin *et al.* (1999) e Afonso *et al.* (1999). Ribeiro *et al.* (2006) relataram a perda de 13q como o evento inicial da tumorigênese prostática ao invés de perda de 8p, e propuseram em seu modelo de progressão que a deleção em 13q é preferencialmente seguida por perdas de 6q e 18q. A comparação com os dados de CGH-array revelou perdas significativas do gene *RB1* no grupo IM, especificamente nas metástases em testículo e em linfonodos. Nos grupos IP e II esta alteração não foi detectada. Na análise de HR-CGH, estes dados foram parcialmente concordantes aos de CGH-array: deleção em 13q14 foi detectada no grupo IM e em alguns casos dos tumores

do grupo IP; >70% das amostras do grupo III mostraram perdas nessa região. A investigação do gene *RB1* seria extremamente interessante para avaliar seu papel em carcinomas de próstata.

Nesse estudo foi observada a **perda** do braço longo do cromossomo 8, sendo a região mínima de sobreposição em **8q24.1-24.3** presente em mais de 70% de todos os CaP (grupos I, II e III) e **8q24.2** em pelo menos 70% das amostras de metástases. A perda de **8q22.3** foi uma das alterações presentes nos CaP do grupo I e ausentes nos CaP do grupo II, confirmada pela CGH-array, a qual também confirmou a perda de **8q24.1-24.2** (BAC *RP11-79E8*) nas amostras de CaP e metástases do grupo I. Neste BAC estão mapeados os genes *MLZE* (*Melanoma-derived leucine zipper, extra-nuclear factor*) e *FAM49B* (*Family with sequence similarity 49, member B*) cujas funções ainda não estão bem estabelecidas. Não temos conhecimento de relatos referindo a perda do braço longo desse cromossomo no câncer de próstata nos estudos de CGH cromossômico. Entretanto, na região **8q24.1** está mapeado o gene *MIM* (*Supressor de Metástases 1*), também conhecido como *MTSS1* (*KIAA0429*) cuja função parece estar relacionada com a regulação do mecanismo de formação dos filamentos de actina a partir de seus monômeros (Mattila *et al.*, 2003). Lee *et al.* (2002) estudando linhagens de células humanas de câncer de bexiga identificaram o gene *MTSS1*, o qual não era expresso em células metastáticas, mas era transcrito no baço, próstata, testículo, útero, cólon, e sangue periférico. Loberg *et al.* (2005) analisaram a expressão diferencial de variantes de *splicing* do gene *MIM* (MIM-P, MIM(12del) e MIM-B) em três linhagens celulares de câncer de próstata (PC-3, Du145 e LNCaP) e em tecidos de próstata normal (n=3), de *HNP* (n=6), de CaP localizado (n=6) e de metástases de CaP (n=7). Os autores encontraram expressão reduzida de todas as variantes de *splicing* do gene *MIM* ($p > 0,05$) nas três linhagens celulares quando comparadas à próstata normal (próstata normal > PC-3 > Du145 > LNCaP) e também nas amostras de *HNP*, CaP e metástases ao serem comparadas com o tecido prostático normal. Esses resultados evidenciam que esse gene pode contribuir para o crescimento, desenvolvimento e processo metastático do câncer de próstata. Considerando os resultados de perdas em **8q24.1** como resultado inédito de nossa pesquisa,

o gene *MIM/MTSS1* foi selecionado para validação por qRT-PCR. Analisou-se a relação entre os níveis de expressão gênica do *MTSS1* e os dados clínico-histopatológicos e os resultados mostraram uma associação estatisticamente significativa entre os níveis mais baixos de *MTSS1* e PSA pós-cirúrgico elevado ($\geq 0,2$ ng/mL) nos casos com seguimento clínico superior a 24 meses ($P=0,0376$). Os resultados deste estudo indicaram que perda do gene *MIM/MTSS1* e subsequente perda do seu nível de expressão está relacionada com características prognósticas desfavoráveis em pacientes com carcinoma de próstata sugerindo que esse gene é um potencial marcador prognóstico na doença.

Ganhos em 8q se deram nas regiões mínimas: **8q12-13** e **8q21** nas amostras de metástases ósseas, sendo **8q13** uma das alterações exclusivas desse grupo de metástases. Ganho de **8q13-q21.1** foi ainda detectado nas amostras de PIN (166F1 e 166F2) e de **8q22**, detectado na amostra P32 (CaP do grupo II), em 1/8 CaP do grupo IP e 3/11 metástases (grupo IM). Ganhos em 8q são freqüentemente relatados em literatura e associados a estadios avançados e um prognóstico desfavorável em CaP (Cher *et al.*, 1996; Nupponen *et al.*, 1998a; Virgin *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2000; Hukku *et al.*, 2000; Alers *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2001; Zitzelsberger *et al.*, 2001; Beheshti *et al.*, 2002; Kasahara *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2002; Wolter *et al.*, 2002a; 2002b; Kraus *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2004; Kasahara *et al.*, 2005).

Nupponen *et al.* (1998a) relataram deleções em 16q em aproximadamente 50% dos 37 carcinomas recorrentes de próstata estudados. Em **16q22.1** está mapeado o gene *CDH1*, um supressor tumoral que codifica a E-caderina e cuja diminuição de expressão tem sido encontrada em carcinomas de próstata pobremente diferenciados e clinicamente agressivos (Umbas *et al.*, 1992; 1994; Richmond *et al.*, 1997). Outro gene candidato mapeado em **16q22** é o gene *ATB1*. Sun *et al.* (2005) detectaram deleções de 21 a 24 nucleotídeos na região codificadora do gene *ATB1* (éxon 10) em 9 (14%) de 66 amostras. A deleção era somática em alguns casos, mas também foi observada na linhagem germinativa de pacientes com CaP. A expressão do

gene *ATB1* está associada com a redução da proliferação celular, regulação positiva do supressor tumoral CDKN1A (p21) e regulação negativa da oncoproteína AFP.

Em vários estudos, tem sido descrita perda em 16q24, sugerindo que pode haver outros genes supressores tumorais mapeados em 16q e envolvidos com o desenvolvimento tumoral. Em nossa casuística foi detectada a perda de regiões mínimas comuns em **16p12-13.2** e **16q22-24** em mais de 70% dos CaP e das metástases analisadas. A metodologia de CGH-array confirmou a perda de **16q23.3-24.3** (BAC *RP11-280N16*, gene *CDH13*) nas metástases; **16p11.2** (BAC *RP11-89O24*, gene *XPO6*), **16p12.3** e **16p13.2** nas metástases em testículo e em seus tumores primários; e a perda de **16p13.3** como sendo alteração presente nos CaP do grupo II e ausentes nos CaP do grupo I. O gene *CDH13* (*Cadherin 13*, *H-cadherin*) é um supressor tumoral, membro da superfamília Caderina, cuja função está relacionada a adesão celular. A hipermetilação ou deleção deste gene foi detectada em diversos tipos de cânceres como mama, ovário, pulmão e próstata (Riener *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008; Tsou *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). O gene *XPO6* (*RAN binding protein 20*) apresenta função relacionada a transporte celular. Para o nosso conhecimento não há dados publicados em câncer de próstata relatando o envolvimento deste gene. Embora a perda do braço curto do cromossomo 16 não seja tão freqüente quanto à do braço longo, a deleção de 16p foi relatada por Nupponen *et al.* (1998b) em duas das quatro linhagens celulares de câncer de próstata estudadas. Alers *et al.* (2001) relataram a perda de 16p12-p13.1 em 1 de 52 carcinomas de próstata.

Em outra análise realizada em nosso laboratório, foi avaliado o padrão de metilação da região promotora do gene *CDH1*, com iniciadores específicos para a condição metilada e não-metilada, após a modificação do DNA com bissulfito de sódio, para as amostras 48F2 e 70F2. Após vários ensaios, não foi detectada a amplificação da região para a amostra 70F2 tanto para a condição metilada como para a condição não-metilada, o que sugere deleção desse gene, concordando com os resultados de HR-CGH. Para a amostra 48F2 foi detectada a presença de hipermetilação do gene *CDH1* e por HR-CGH foi evidenciada a perda de **16q22**. Considerando que essas amostras não foram

microdissecadas a laser para o experimento de avaliação do padrão de metilação, é possível haver contaminação por DNA de células normais adjacentes ao tumor na amostra 48F2, o que explicaria o resultado de hipermetilação.

Quanto à perda de 18q, Kasahara *et al.* (2005) descreveram essa alteração como sendo a mais frequentemente detectada em 20 tumores de próstata pT2N0 e 10 pT3N0. Estudos prévios mostraram uma alta prevalência de perdas de 18q em metástases e uma associação significativa entre perdas alélicas em 18q e estadios clínicos (Visakorpi *et al.*, 1995). Em nosso estudo foi detectada perda em **18q22** em mais de 70% dos 22 CaP e das 11 metástases. A metodologia de CGH-array confirmou a perda de **18q12-21** nas metástases em testículo e de **18q21.31** como uma das alterações presentes nos CaP do grupo II e ausentes nos do grupo I.

Perdas do cromossomo 19 foram detectadas em **19p13.3** e **19q13.3** em mais de 70% dos CaP dos grupos I (P e M), II e III. Os dados de CGH-array confirmaram a perda de **19q13.1** nos CaP e metástases do grupo I e de **19q13.2-13.31** nas metástases em testículo. BAC RP11-91H20 (contendo seqüências genômicas mapeadas em 19q13.1) inclui o gene *SIPA1L3* (*Signal-induced proliferation-associated 1 like 3*), cuja função é de regulação da transdução de sinal. Nupponen *et al.* (1998a) relataram a perda do cromossomo 19 em 45% de 37 tumores recorrentes hormônio-refratários. Em outro relato desse mesmo grupo (Nupponen *et al.*, 1998b) também foi detectada a perda de 19cen-q13 em uma das quatro linhagens celulares estabelecidas a partir de metástases de adenocarcinomas prostáticos. O cromossomo 19 apresenta alguns genes supressores tumorais, como *LKB1* e *BAX* (19q13.3-q13.4). O gene *BAX* codifica uma proteína pró-apoptótica, cuja função está relacionada à regulação da ativação da mitocôndria para a apoptose em uma via celular que envolve *BCL2* e *TP53*.

Alterações de perdas nos cromossomos 20, 21 e 22 têm sido encontradas em estudos de CGH a partir de linhagens celulares estabelecidas de metástases de carcinoma prostático (Nupponen *et al.*, 1998b; Chu *et al.*, 2001; Kraus *et al.*, 2003). Entretanto, apenas a perda de 21q tem sido relacionada à progressão tumoral. Chu *et al.* (2001) em uma das três linhagens

celulares estudadas por CGH, relataram que a perda de 21q, juntamente com a de 16q23-qter, podem ser responsáveis pelo aumento da capacidade metastática. Além disso, a perda de heterozigose do *locus* 21q22 foi relatada num estudo por ser importante na progressão de tumores primários para metastáticos (Saric *et al.*, 1999). Hyyntinen *et al.* (1997) também relataram esta anormalidade num modelo *in vivo* de progressão de câncer de próstata usando linhagens celulares. No presente estudo, perdas concomitantes dos cromossomos **16q** e **21q** foram encontradas na maioria dos CaP do grupo I (5/8: P1, P3, P7, P11 e P13) e essas alterações se mantiveram nas metástases P1M (óssea), P11M (linfonodo) e P13M (testículo). Entretanto, a maioria dos CaP dos grupos II e III também apresentava essas duas alterações. A presença simultânea destas alterações nas amostras do grupo II sugere que essas anormalidades não são relevantes para a progressão tumoral,

A perda de **20q13.1** e **20q13.3** foi observada em mais de 70% das amostras de CaP. A perda de 20q também foi relatada também por Cher *et al.* (1994) e Wolter *et al.* (2002b) em tumores primários de próstata.

A perda de **20p12.3** foi confirmada pela CGH-array como uma das alterações exclusivas dos CaP do grupo II em relação aos CaP do grupo I. Nessa região cromossômica estão mapeados genes como *TARDBPL/TDP-43* (*TAR DNA binding protein-like*), cuja função está possivelmente associada a regulação de *splicing* (Buratti *et al.*, 2005); *TRMT6* (*tRNA methyltransferase 6 homolog – proteína de ligação com atividade de fator de iniciação da tradução*) e *PROKR2* (*prokineticin receptor 2*). Pasquali *et al.* (2006) demonstraram que a procinetina 1 e 2 e seus receptores expressam-se na próstata humana e que seus níveis aumentam com o processo tumoral.

A deleção do cromossomo 22 foi relatada previamente em 1/52 tumores primários (Alers *et al.*, 2001), em 4/9 amostras de CaP avançados (Kasahara *et al.*, 2002) e em 17/37 carcinomas de próstata recorrentes (Nupponen *et al.*, 1998a). No presente estudo foi detectada a perda de **22q13** em mais de 70% das amostras estudadas. Em 22q está mapeado o gene *CHEK2* que é um regulador do *TP53*; esta proteína participa da via de sinalização relacionada a danos no DNA. Mutações nesse gene foram identificadas em casos

esporádicos e familiares de CaP e estão associadas com o aumento de risco ao desenvolvimento da doença (Dong *et al.*, 2003; Cybulski *et al.*, 2004).

Deleções no cromossomo 10 foram encontradas em **10p15** em 18% dos casos; **10q22** e **10q25-26** em mais de 70% dos 22 CaP; **10q24** e **10q26** em mais de 70% das 11 metástases. Os resultados obtidos da análise de CGH-array confirmaram as perdas de **10q23-25** (BAC *RP11-165P9*, gene *SORCS3 - Sortilin-related VPS10 domain containing receptor 3*) e **10q26** (BAC *RP11-262E19*, genes *TACC2 - Transforming, acidic coiled-coil containing protein 2 - e, C10orf87*) nas metástases em testículo e em seus tumores primários. Hermans *et al.* (2004), avaliando alterações no cromossomo 10 em 11 amostras de xenoenxertos de CaP e 4 linhagens celulares de CaP encontraram um padrão característico de alterações que incluiu a perda distal de 10p e de 10q. Estudos prévios de CGH convencional em CaP mostraram perdas nestas regiões no cromossomo 10 (Cher *et al.*, 1996; Nupponen *et al.*, 1998a; Alers *et al.*, 2000). Hughes *et al.*, (2006) relataram a perda de 10q, como a segunda perda mais freqüente em seis de oito casos de CaP, detectada por CGH cromossômico. Em 10p15 está mapeado o gene *KLF6 (Kruppel-like factor 6)*, que codifica um fator de transcrição *zinc finger*, com função relacionada a proliferação celular e diferenciação. Esse gene foi relatado como um supressor tumoral envolvido em CaP (Narla *et al.*, 2001). A análise de CGH-array confirmou a perda de 10p15 (BAC *RP11-23O12*, gene *KLF6*) nas metástases em testículo e seus tumores primários. O cromossomo 10q contém genes supressores tumorais que podem ser possíveis candidatos envolvidos na tumorigênese prostática. A inativação do gene *PTEN (Phosphatase and tensin homolog, mapeado em 10q23)* é a alteração genética mais freqüente em CaP. Vlietstra *et al.* (1998) relataram a deleção bialélica desse gene ou mutação em 60% de xenoenxertos de CaP e linhagens celulares. Verhagen *et al.* (2006) utilizando diferentes metodologias (dentre elas CGH-array e FISH) para avaliar 40 amostras de tumores primários de próstata, encontraram deleções homozigotas do *PTEN* em 25% dos casos. Os autores discutem que a alta freqüência de perda de 10q23 quando comparada à inativação completa do *PTEN* leva a especulação de que possa haver um segundo gene supressor tumoral mapeado em 10q23 ou que a condição monoalélica do gene contribui

para a tumorigênese. A plataforma utilizada para CGH-array em nosso estudo não possui BACs contendo o gene *PTEN*. Os genes *SORCS3*, *TACC2* e *C10orf87* localizados nos BACs envolvidos em perda em 10q não têm função muito bem estabelecida e até o momento não há relatos que relacionem a perda desses genes com o câncer de próstata. Outros genes candidatos mapeados em 10q24-25 são o *PDCD4* e *MXI1*, já relatados em CaP. O gene *PDCD4* (regulador da morte celular programada 4 ou inibidor da transformação neoplásica), mapeado em 10q24, foi relacionado ao desenvolvimento e progressão do CaP (Soejima *et al.*, 1999; Pang *et al.*, 2006). Alterações no gene *MXI1* (10q25) foram relatadas em CaP, embora em baixa frequência (Eagle *et al.*, 1995). Esses dois genes não estavam presentes na plataforma de CGH-array usada no estudo prévio de nossa equipe.

Deleções no **cromossomo 17** foram detectadas em mais de 70% das amostras dos grupos I e III nas seguintes regiões mínimas: **17p12-13** (CaP grupo III); **17q11.2-25** (CaP grupos I), **17q12-22** (CaP grupo III e metástases); **17q24** (metástases) e **17q25** (CaP grupo III). As amostras do grupo II não apresentaram perdas comuns para o cromossomo 17, a CGH-array confirmou esses resultados: perda de 17q11.1-11.2 e 17q25 foram detectadas como alterações exclusivas do grupo I quando comparadas com o grupo II. Além disso, essa metodologia confirmou a perda de 17q21.2 nas amostras de metástases, de 17q21.1-q21.31 nas amostras de metástases em linfonodo e de 17q24-25 nas amostras de metástases em testículo e seus tumores primários. No cromossomo 17 estão descritos vários genes com papel celular crítico em uma variedade de tumores. A perda do cromossomo 17 tem sido relatada por vários autores, tanto por análise cromossômica por bandamento G como por CGH. A deleção de 17p foi também detectada por Cher *et al.* (1996) em 50% de 20 amostras de metástases prostáticas (18 linfáticas pélvicas e duas ósseas) de pacientes que não receberam nenhum tratamento para o CaP e em 65% de 11 amostras (quatro de tumores primários, 6 de tumores pélvicos recorrentes e uma de metástase do epitélio escrotal) de pacientes que receberam terapia de privação de andrógenos por um longo período. Os autores sugerem que a perda da função do gene supressor tumoral *TP53* (17p13), mutado em 20 a 25% dos CaP metastáticos, esteja associada com a

progressão da doença e esta parece ser uma alteração comum a estágios tardios do CaP. Um outro gene mapeado no cromossomo 17p, considerado o primeiro gene identificado como possível candidato ao CaP hereditário, é o *ELAC2/HPC* (17p11) (Tavtigian *et al.*, 2001). Entretanto, nas amostras estudadas com alteração em 17p não há história de CaP na família. Esse gene codifica uma endoribonuclease que processa tRNA3'. Tem sido estimado que os genótipos de risco para esse gene podem causar 2% do CaPs na população em geral (Camp e Tavtigian *et al.*, 2002). Em 17q21.3-q22 estão mapeados *NM23-H1* (*NME1*) e *H2*, genes cuja diminuição da expressão tem sido associada a um potencial metastático aumentado. Konish *et al.*, (1993) demonstraram que a expressão reduzida de *NM23-H1*, mas não *NM23-H2*, pode estar associada com risco aumentado de metástase. Baseado nos resultados da presente investigação foi utilizada análise expressão quantitativa em tempo real para o gene *NME1*. A análise de associação entre os níveis do transcrito do *NME1* e os parâmetros clínico-histopatológicos isolados ou agrupados em escores não revelou nenhum resultado significativo. Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas entre os níveis normais e diminuídos de expressão gênica e recidiva bioquímica, tampouco com o tempo de sobrevida livre de doença. Desta forma, os resultados de expressão do gene *NME1* por qRT-PCR não validaram os achados de HR-CGH. No entanto, este resultado não descarta o envolvimento da região 17q21.3 como importante na carcinogênese da próstata, outros genes mapeados nesta região podem estar envolvidos e poderiam ser investigados como potenciais genes candidatos no CaP.

Para o cromossomo 2 foram encontradas perdas de várias regiões mínimas. É interessante ressaltar a perda da região mínima **2q14.1-14.2** detectada como uma das alterações exclusivas das metástases em testículo. Strohmeyer *et al.* (2004) relataram a perda do cromossomo 2 em 10/57 tumores primários de próstata de arquivo (fixados e em blocos de parafina) previamente microdissecados e analisados pela CGH. van Dekken *et al.* (2004) relataram perda de 2q em 20% de 10 adenocarcinomas prostáticos avaliados por CGH array.

Foram também detectadas perdas do cromossomo 6 nas amostras dos grupos I e III. A região mínima **6p12-21.1** estava envolvida em perda nas amostras de metástases em testículo e em seus tumores primários. Perda de **6q24** foi considerada uma das alterações exclusivas dos CaP do grupo I quando comparados com os CaP do grupo II, confirmada pela CGH-array. Nesta região encontra-se mapeado o BAC RP11-195B12, que contém o gene *PDE7B* (*Phosphodiesterase B*), cuja função é de regulação de transdução de sinal. Perdas de **6p21.2-22**, **6q16-21** e **6q24** foram detectadas em mais de 70% das amostras do grupo III. O ganho de **6q21-22** foi detectado como uma das alterações exclusivas nas metástases ósseas. A literatura em CGH para CaP revela dois outros estudos com perdas para o cromossomo 6. Chu *et al.* (2003) encontraram perda de 6p em 18% de 45 amostras de CaP e de 6q em 22% e Pang *et al.* (2006) também identificaram perda de 6q23-qter em linhagem celular de CaP. Em 6q24 estão mapeados os genes *DPI* (*Desmoplakin I*) e *DPII* (*Desmoplakin II*) cuja função está relacionada à adesão celular.

Em 6p12.1 está mapeado o gene *BMP5* (*Bone Morphogenetic Protein 5*) que faz parte da superfamília BMP, que inclui fatores responsáveis pela indução do crescimento da matriz óssea. Além dos osteoblastos, células do câncer de próstata podem expressar anormalmente BMPs, o que contribui para a formação de metástases ósseas. De Pinieux *et al.* (2001) avaliaram por imunohistoquímica a expressão de BMP6 em 43 amostras de CaP localizado. Vinte e seis dos pacientes apresentaram recorrência e/ou metástases. Os resultados revelaram correlação positiva da expressão de BMP6 com metástases ósseas. Masuda *et al.* (2003) avaliaram a expressão por qRT-PCR de *BMP6* e *BMP7* em tecido ósseo normal (n=6) e em amostras de metástases ósseas (n=9) de seis pacientes com câncer de próstata. A expressão de *BMP7* foi significativamente mais alta nas metástases que no tecido normal, detectada em 5 de 7 (71%) metástases ósseas e não detectada no tecido ósseo normal ($P<0,005$). Não foram observadas diferenças significativas no nível de expressão de *BMP6* entre as metástases e o tecido normal ($P=0,81$). Quanto ao *BMP5*, um estudo realizado por Doak *et al.* (2007) avaliou o número de cópias deste e de outros genes (*BMP2*, *BMP7* e *UC28*) por FISH em amostras de arquivos em blocos de parafina contendo áreas de epitélio normal

adjacente, PIN (neoplasia intraepitelial prostática) e CaP. Nenhuma perda foi detectada, entretanto 50% das amostras de CaP avaliadas apresentaram ganho do número de cópias de *BMP5*. Os resultados do presente estudo revelaram que a região 6p12 estava envolvida em ganho em 3/4 amostras de metástases ósseas (exceto P1M), o que estaria de acordo com a hipótese de que ganhos ou ampliações do gene *BMP5* mapeado nessa localização poderia estar associados às metástases ósseas. Além disso, as metástases em testículo não apresentaram alterações em 6p12, o que poderia indicar que essa região seria específica de metástases ósseas. Entretanto, duas metástases em linfonodos mostraram ganhos em 6p12. Um desses pacientes teve doença metastática disseminada e o outro está em tratamento hormonal e não foi relatado, até o momento, a presença de metástases ósseas. Os tumores primários dos pacientes que evoluíram para metástases ósseas não foram analisados por não haver disponibilidade dessas amostras para o estudo. Esses resultados sugerem que ganhos de 6p12 pode estar relacionada especificamente à metástases ósseas.

A perda de **9q34** foi detectada em mais de 70% dos CaP dos grupos I, II e III e da região **9q32-34**, nas metástases e CaP do grupo I. A análise de CGH-array confirmou a perda de **9q33** nas metástases em testículo, de **9q34.3**, nas amostras do grupo III e de **9q31.1** e **9q31.3**, nas amostras de CaP do grupo II estando estas ausentes nos CaP do grupo I. Em 9q32-q33 está mapeado o gene *TLR4*, codificador de um receptor com papel central na via de sinalização da resposta imune inata à infecção por bactéria Gram positiva. Baseados na evidência de que a inflamação tem papel etiológico em vários cânceres humanos, inclusive no CaP e considerando que a suscetibilidade genética é um dos maiores fatores de risco para essa doença, Zheng *et al.* (2004) levantaram a hipótese de que variantes alélicas em genes que regulam a inflamação poderiam modificar a suscetibilidade ao CaP. Para testar essa hipótese avaliaram sistematicamente seqüências variantes para o gene *TLR4* de 1961 casos de CaP e 1697 controles para a população da Suécia, e estimaram o risco para o desenvolvimento do CaP em 4,9% para as variantes analisadas.

No presente estudo foi observada a perda em **11q23-24** em mais de 70% dos 22 CaP e de **11q23** em mais de 70% das metástases. A análise de CGH-array confirmou a perda de **11q22.3** nas metástases em testículo e em seus tumores primários. Esta região cromossômica está representada na plataforma de array pelo BAC RP11-262J9. Este BAC contém os genes *ALG9* (*Asparagine-linked glycosylation 9*, com função de atividade de transferase, constituinte da membrana); *C11orf1* (*Chromosome 11 open reading frame 1*, função desconhecida); *CRYAB* (*Crystallin, alpha B*, com função anti-apoptótica); *HSPB2* (*Heat shock 27kDa protein 2*, com função de metabolismo de proteínas); e *DIXDC1* (*DIX domain containing 1*, com função de transdução de sinal). A perda de 11q foi também relatada por Alers *et al.* (2001) em 3/52 amostras de CaP.

Perda em **12q23-24.3** foi observada em mais de 70% dos 22 CaP e de **12q24.1-24.3** em mais de 70% das metástases. Os resultados obtidos por CGH-array confirmaram as perdas de **12q12** e **12q13.13** como sendo alterações presentes nos CaP do grupo II e ausentes nos CaP do grupo I. Esta região está representada pelo BAC RP11-968A15, que contém os genes *CBX5* (*Chromobox homolog 5* que possui função de regulação da transdução de sinal), *ZNF38A5* (*Zinc finger protein 385A*, com função de regulação da transcrição) e *GPR84* (*G protein-coupled receptor 84*, com função de transdução de sinal). A deleção de 12q foi também encontrada por Nupponen *et al.* (1998a) em 2/6 tumores primários de próstata avaliados por CGH. Até o presente, nenhum gene com possível função de supressão tumoral foi relacionado com a perda em 12q em CaP.

Deleção em **15q22-24** e **15q22-26** foi detectada em mais de 70% das metástases e nos 22 CaP, respectivamente. A metodologia de CGH-array confirmou as perdas de **15q22.2** e **15q24.3-25.2** como alterações comuns às metástases em testículo e seus tumores primários e de **15q21-22** como alteração comum às metástases em linfonodos e seus tumores primários. A deleção de 15q25-q26 foi relatada previamente em 7/45 (Chu *et al.*, 2003) e 10/57 (Strohmeyer *et al.*, 2004) tumores primários de próstata, em 2/6 tumores recorrentes (Nupponen *et al.*, 1998a) e em 9/20 metástases de CaP (metástases ósseas e em linfonodos pélvicos) (Cher *et al.*, 1996). Até o

presente, nenhum gene conhecido foi identificado como candidato para CaP nessa localização cromossômica.

As perdas em 1p32-1p36 foram relatadas apenas por Nupponen *et al.* (1998b) e van Dekken *et al.* (2004) em linhagens celulares de CaP avaliadas por CGH e CGH array, respectivamente, e por Nupponen *et al.* (1998a) em tumores de próstata recorrentes. Em nosso estudo foram encontradas perdas de **1p32-33** nas metástases, **1p32-34.2** em mais de 70% das 22 amostras de CaP, de **1p32-36.3** em mais de 70% dos CaP do grupo III. A metodologia de CGH-array confirmou a perda de **1p36** nos CaP do grupo III e de **1p36.11** e **1p36.12** como alterações presentes nos CaP do grupo II e ausentes no grupo I. O gene *EPHB2*, mapeado em 1p35-p36.1, codifica um receptor tirosina quinase e tem sido identificado como um supressor tumoral no CaP. Huusko *et al.* (2004) mostraram que a linhagem celular de CaP DU145 é portadora de uma mutação truncada em um dos alelos *EPHB2* e o outro alelo está deletado; a expressão da proteína EphB2 tipo-selvagem em células DU145 suprime seu crescimento. Os autores detectaram várias mutações neste gene na análise de 33 amostras de tumores primários e 62 de metástases de CaP, as quais promoveram a inativação do *EPHB2* em 8% do total de casos analisados. A mais relevante delas foi uma mutação tipo *frameshift* encontrada em três amostras metastáticas do mesmo paciente. Essa mutação não estava presente em uma amostra de fígado normal desse paciente, evidenciando que a mutação não era constitutiva. Baseados nos achados desse estudo, os autores consideraram que *EPHB2* pode ser um supressor tumoral envolvido com a progressão do CaP, e que a perda dessa proteína, por inativação mutacional pode afetar muitos aspectos fenotípicos do CaP, como crescimento aberrante, invasão e metástase.

Os resultados da análise de HR-CGH e de CGH-array obtidos no presente estudo foram também comparados aos dados de Lapointe *et al.* (2007). Os autores analisaram 55 tumores primários de próstata e 9 metástases em linfonodos de diferentes pacientes usando a metodologia de cDNA microarrays para CGH, plataforma *Stanford Functional Genomics Facility* que incluía 39,632 cDNAs humanos, representando 22,279 genes mapeados. Em um estudo prévio, Lapointe *et al.* (2004) mostraram que foi possível

identificar subtipos de câncer de próstata, indistinguíveis histopatologicamente, baseado nos diferentes padrões de expressão gênica. Usando a tecnologia de cDNA microarrays, contendo 26,260 genes humanos, os autores identificaram 3 subtipos de CaPs: (1) tumores que apresentavam comportamento clínico favorável (tumores AZGP1+/MUC1- avaliados por IHQ) e sobrevida livre da doença favorável independente de estadiopatológico, Gleason e dosagem de PSA pré-cirúrgico. Os subtipos (2) e (3) mostravam formas mais agressivas da doença (tumores MUC1+). O subtipo (3) incluía tumores primários bem como a maioria das metástases em linfonodo pélvico e o subtipo (2) compreendia a maior parte dos tumores, apresentando expressão gênica característica, mas que também mostravam expressão característica do subtipo (3). Na análise de CGH em cDNA microarray, Lapointe *et al* (2007) encontraram perdas genômicas muito mais significativas do que ganhos. As alterações cromossômicas mais freqüentes incluíram ganhos em 8q (27% dos casos) e perdas em 13q (52%), 8p (47%), 6q (38%), 10q (28%) e 12p (27%). As metástases em linfonodos mostraram um padrão complexo de ganhos e perdas genômicas, como os casos do nosso estudo. A **Tabela 18** apresenta as regiões genômicas descritas pelos autores.

Tabela 18. Alterações no número de cópias característico dos subtipos descritos por Lapointe *et al*. (2007), identificados usando o método SAM (*Significance Analysis of Microarrays*).

Subtipo 1	Subtipo 2	Metástases em Linfonodo
Associações positivas		
Perda 2q22.3-23.1 (2) 2q23.3 2q24.2 5q21.1-21.3 (2) 6q13 6q14.3-22.31 (8)	Perda 8p11.21-23.3 (10; <i>NKX3-1</i>) 16q23.1 17q21.2 18q23 21q22.2(<i>TMPRSS-ERG</i>) Ganho 6p22.1	Perda 1p36.12-36.13 (2) 2q37.1 4q31.1 10q23.31 (<i>PTE</i>) 16q22.2-23.3 (5) Ganho 8p11.23-12 (2) 8q12.3-21.13(7) 8q22.1-23.1 (4) 8q23.3-24.22(6, <i>MYC</i>) 9q21.13-21.33(5) 9q22.32-21.31.3(5) 11q12.3-13.1(2) 16p11.2-12.1(2) 16p12.3-13.3 (6) 20q13.2
Associações negativas		

8p12-23.1 (6, <i>NKX3-1</i>) 8p11.21		
------------------------------------------	--	--

Entre parênteses está indicado o número de bandas cromossômicas incluídas no intervalo descrito.

A análise comparativa dos dados de Lapointe *et al.* (2007) com os resultados do presente estudo revelou achados interessantes. Alterações em 5q21 e 6q15 descritas pelos autores como características do subtipo (1) foram também observadas no nosso estudo entre os tumores do grupo I e em metástases. Uma grande discrepância foi observada na comparação entre as alterações descritas no subtipo (2) (tumores mais agressivos) e os casos do presente estudo. Um exemplo foi a presença de perda em 21q22 em todas as amostras que apresentaram evolução clínica favorável (grupo II). As alterações descritas no subtipo (3) foram também detectadas entre as amostras do grupo I, II (2 casos) e em mais de 70% das amostras do grupo III. Alterações em 16q23 estavam presentes em uma alta proporção dos nossos casos. A **Tabela 19** apresenta um resumo das alterações detectadas por HR-CGH em relação aos subtipos descritos por Lapointe *et al.* (2007).

Tabela 19. Análise comparativa caso a caso entre os subtipos descritos por Lapointe *et al.* (2007) e os resultados de HR-CGH.

Subgrupo 1 (n=10 CaP) menos agressivos				
Perda	grupo I - CaP	grupo I - metástases	grupo II - CaP	grupo III - CaP
5q21	P9 (apresentou meta em linfonodo)	P13M e P14M1 (apresentou meta em testículo), P2M (meta óssea)	P29	Mais de 70% das amostras
6q15	P3 e P9 (apresentaram meta em linfonodo), P13 e P14 (meta em testículo)	P14M2 (meta em peritônio)	-	-
Subgrupo 2 (n=34 CaP) mais agressivos				
Perda (gene)	grupo I - CaP	grupo I - metástases	grupo II - CaP	grupo III - CaP
8p21 (<i>NKX3-1</i>)	P7 (meta em linfonodo), P1 (meta óssea) P11 e P13 (meta em testículo)	P11m e P13M (meta em testículo)	P29	Mais de 70% das amostras
21q22 (<i>TMPRSS2-ERG</i>)	P7 (meta em linfonodo), P1 (meta óssea),	P11M, P13M e P14M1 (meta em testículo),	100% das amostras	Mais de 70% das amostras

	P3 (meta em linfonodo), P11 e P13 (meta em testículo)	P1M e P5M (meta óssea), P14M2 (meta em peritônio)		
Subgrupo 3 (n=9 metástase em linfonodos)				
Perda (gene)	grupo I - CaP	grupo I - metástases	grupo II - CaP	grupo III - CaP
10q23 (PTEN)	P7 (meta em linfonodo), P1 (meta óssea), P11 e P13 (meta em testículo)	P14M2 (meta em peritônio), P8M (meta óssea), P11m (meta em testículo), P9M (meta em linfonodo)	P30 e P32	Mais de 70% das amostras
12p13 (CDKN1B)	P3 (meta em linfonodo), P11 (meta em testículo)	P8M (meta óssea), P11M, P12M e P14M1 (meta em testículo),	P30 e P32	Mais de 70% das amostras
13q14 (RB1)	P11 e P13 (meta em testículo) P3 (meta em linfonodo), P1 (meta óssea),	P14M2 (meta em peritônio), P1M e P5M (meta óssea), P13M e P14M1 (meta em testículo), P9M (meta em linfonodo)	P32	Mais de 70% das amostras
16q23	P11, P12, P13, P14 (meta em testículo), P3 e P7 (meta em linfonodo), P1 (meta óssea),	P1M, P2M, P5M, P8M (meta óssea), P11M, P12M e P14M1 (meta em testículo), P9M (meta em linfonodo)	100% das amostras	Mais de 70% das amostras
17p13 (TP53)	P1 (meta óssea), P3 (meta em linfonodo), P11 e P12 (meta em testículo)	P3M e P9M (meta em linfonodo) P1M, P2M (meta óssea),	P30	Mais de 70% das amostras
Ganho (gene)	grupo I - CaP	grupo I - metástases	grupo II - CaP	grupo III - CaP
8q24 (MYC)	-	-	-	-
16p13	-	-	-	-

Meta = metástase

A comparação entre os achados de Lapointe *et al.* (2007) e os dados do presente estudo apontaram alguns genes que poderiam ser incluídos na validação em nosso estudo. Perdas em **10q23** (região do gene *PTEN*) foram observadas pelos autores no grupo de amostras que apresentou metástases em linfonodos. A plataforma utilizada em nosso estudo de CGH-array não possui BACs contendo o gene *PTEN*. Os autores relataram a perda de **RB1** em

todas as amostras. No presente estudo, observamos perdas significativas no grupo IM, e nos grupos de metástases em testículos e metástases em linfonodos. Nos grupos IP e II esta alteração não foi detectada. A perda do gene **CDKN1** foi recorrente em todas as amostras dos autores. No nosso estudo, foram observadas perdas do gene **CDKN1** no grupo IM (metástases em linfonodos e em testículo). No grupo IP não foram observadas alterações envolvendo este gene. O grupo II não mostrou alterações no número de cópias para este gene. Estes resultados apontam que estes genes são candidatos a validação e devem ser importantes marcadores em CaP.

Os autores relataram ganhos comuns na região **16p13** para o grupo que apresentou metástases em linfonodos. Curiosamente, nossos resultados apontam, para o subgrupo de amostras de metástases linfonodais, uma prevalência de perdas para a região 16p13, com uma única região de ganho, em 16p13.12 (BAC RP11-160D13), que contém o gene *A2BP1* (proteína de ligação ao RNA, localizada na via de sinalização trans-Golgi e que tem sido associada com a ataxia espinocerebelar tipo 2). A mesma análise para o grupo de todas as metástases apontou perda, assim como para as metástases em testículo. O conjunto de amostras do grupo IP não apresentou alterações. Individualmente, as amostras que apresentaram ganhos para a região 16p13 foram P1, P1M, P3, P3M, P11, P11M, P13, P13M e 30pr.

Os autores relataram ganhos comuns na região **8q24** para o grupo que apresentou metástases em linfonodos, onde está mapeado o gene *MYC*. Em nossa casuística, foram observados ganhos do gene *MYC* nos casos IP, o que não foi observado nos casos do grupo II ou nas metástases. Perdas recorrentes foram relatadas na região **8p21** nos tumores do subtipo 2, com prevalência no gene *NKX3-1*. Nossa plataforma não contém BACs com o gene *NKX3-1*.

Alterações em **5q21** foram relatadas como presentes nos casos do subtipo 1. Os resultados de CGH-array concordam com os obtidos da análise de HR-CGH e indicaram deleções em 5q21 nos casos P1, P13M, P14 e P14. Nos agrupamentos avaliados, foram detectadas deleções desta região entre as metástases em linfonodos. Dentre as amostras do grupo II, uma de quatro amostras (P32) apresentou deleção da região 5q21.

Em conjunto, essas comparações revelam grande homogeneidade entre os resultados obtidos da análise de HR-CGH e de CGH-array dos casos do nosso estudo. Um subgrupo de alterações coincide com as descritas por Lapointe *et al.* (2007).

O paciente P32 do grupo II de bom prognóstico iniciou com terapia hormonal três anos após a prostatectomia radical devido à recorrência da doença. Este tumor apresentou alterações comuns aos casos de prognóstico desfavorável (grupo I CaP e/ou metástases) e que o diferenciava dos demais casos do grupo II, tais como: perda de 3q13.1, 5q23, 13q14-21, 15q12, 15q21, 18q11.2 e ganho de 2q23 e 8q22. Dessa forma, poderia ser sugerido que essas alterações diferenciam os tumores de próstata indolentes dos mais agressivos com progressão metastática. Dentre essas alterações, a perda de 13q foi considerada como um evento inicial da tumorigênese prostática, seguida preferencialmente por perdas de 6q e 18q no modelo de progressão descrito por Ribeiro *et al.* (2006), como já mencionado anteriormente. Lapointe *et al.* (2007) também relataram ganhos de 8q22.1 nas amostras de metástase em linfonodo pélvico. A busca por genes candidatos mapeados nessas localizações cromossômicas foi realizada por análises *in silico* ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/)), permitindo o acesso a todos os genes mapeados nessas regiões e suas respectivas funções. Dentre os possíveis candidatos destacam-se os genes: *RB1* (*Retinoblastoma 1* – 13q14) e *RBBP8* (*Retinoblastoma binding protein 8* – 18q11.2) como supressores tumorais; *NMI* (*N-myc and STAT interactor* – 2q23) e *SDC2* (*Syndecan 2* – 8q22) como oncogenes. Uma vez que esse estudo revelou indícios de que essas regiões cromossômicas possam discriminar os tumores mais agressivos a investigação da expressão desses genes, e de outros, em tumores de próstata em diferentes estágios de progressão podem vir a confirmar essa hipótese.

Existem poucos estudos publicados que avaliaram amostras de PIN (neoplasia intraepitelial prostática) por CGH. No mais recente, Bettendorf *et al.* (2008) relatam a ausência de alteração cromossômica em dez amostras de PIN avaliadas por CGH cromossômico. Zitzelsberger *et al.* (2001) avaliaram 12 amostras de PIN microdissecadas a *laser*, amplificadas por DOP-PCR para a

realização da CGH convencional. Os autores detectaram ganho dos cromossomos 8q (42%), 7 (25%), 17 (25%), 20 (25%) e perda em 13q14 (25%) como sendo alterações mais freqüentes em PIN. Ganhos em 1p, 4p15-16, 11q13, 12q, 15q, 22q, X, bem como perdas em 4q, 2p25, 3p24-26, 3q26-29, 5q21, 6q, 8p, 10q24, 12q21-24, 18q21-22 e Y foram detectadas em menor freqüência (apenas um caso cada). Todas essas alterações foram detectadas no correspondente tumor primário também avaliado no estudo. Beheshti *et al.* (2002) que também avaliaram amostras de PIN (n=3) microdissecadas a *laser* e amplificadas por DOP-PCR para a CGH cromossômica, relataram que focos tumorais, também avaliados nesse estudo, apresentavam mais alterações de perdas e ganhos que a PIN de um mesmo paciente. Das três PIN avaliadas apenas duas apresentaram alterações: A) ganho de 3p24-pter, 3p12.2-q13.2, 8q, 15q15-q21.2 e perda do cromossomo 20; B) ganho de 2q24.1-q31.2, 8q21.3-q22.3, Xq21.3-q22.2 e perda do cromossomo Y. Todas essas alterações foram comuns as amostras de PIN e CaP do mesmo paciente evidenciando que a PIN pode ser uma lesão precursora do carcinoma. No presente estudo, não foi possível comparar as alterações das amostras de PIN (caso 166) com focos do tumor do mesmo paciente por não termos a disponibilidade de amostras tumorais. Entretanto, a maioria das alterações detectadas nas amostras de PIN também estavam presentes nos outros CaP avaliados, corroborando com a hipótese de que as neoplasias intraepiteliais possam ser precursoras dos carcinomas. Além disso, foram detectadas alterações exclusivas das amostras de PIN: ganhos de **3p12**, **5q11.2**, **5q21**, **8q11.2**, **8q13-q21.1**, **12p11.2-p13**, **15q26** e **21q11.2**, não detectados em nenhum tumor primário ou metástase. Em geral, as amostras de PIN apresentaram perfil de alterações diferente dos CaP, sendo observado maior número de ganhos quando comparados aos CaP avaliados. O significado dessa diferença não está claro, de forma que outros estudos avaliando um maior número de PIN e focos adjacentes de CaP poderão contribuir para a confirmação destes resultados e o esclarecimento dessas diferenças.

Ao comparar as duas amostras de CaP de um mesmo paciente foi observada uma similaridade de aproximadamente 50% entre as regiões de perdas genômicas, essa concordância não foi tão expressiva entre os ganhos,

variando de 0% a 6,8%. Para as amostras de PIN houve uma similaridade de ~27% para perdas e de ~37% para ganhos. Essas diferenças detectadas entre as duas amostras de um mesmo paciente refletem a heterogeneidade das alterações genéticas existentes em diferentes focos tumorais. Em geral, as amostras de um mesmo paciente foram obtidas de locais diferentes da próstata (**Tabela 20**). As amostras dos casos 177 e 166, mesmo tendo sido coletadas na mesma região prostática são focos distintos, tumorais e de neoplasia intraepitelial (PIN), respectivamente. Embora sejam tumores adjacentes, as diferenças genéticas detectadas entre as duas amostras do caso 177 são tantas quanto as detectadas em focos tumorais mais distantes na próstata, o que parece sugerir que a heterogeneidade exista independente do local prostático acometido pelo tumor.

Tabela 20. Caracterização dos dois diferentes focos tumorais de cada paciente avaliado do grupo III e informações relevantes.

Paciente	Localização prostática do tumor	Escore de Gleason	TNM	PSA pré-cirúrgico	PSA pós-cirúrgico	% concordância
15	F2: BD	7(3+4)	T2bN0M0	12,10	0,27	47% das perdas 1,5% dos ganhos
	F3: AE+ME	7(3+4)				
48	P3: AE	6(3+3)	pT2bN0M0	2,5	0,0	58,9% das perdas 0% dos ganhos
	F2: ME	6(3+3)				
70	F1: AD	7(4+3)	T2cN0M0	9,94	0,03	59,3% das perdas 2,4% dos ganhos
	F2: BD	6(3+3)				
177	P1: AD	7(3+4)	T2cN0M0	11,0	0,0	47% das perdas 6,8% dos ganhos
	P2: AD	7(3+4)				
166	F1: MD	PIN 8(3+5)*	T2cN0M0	6,93	s.i.	27,1% das perdas 37% dos ganhos
	F2: MD	PIN 8(3+5)*				

AD = ápice direito; AE = ápice esquerdo; BD = base direita; BE = base esquerda; MD = médio direito; ME = médio esquerdo; F = fragmento coletado a fresco; P = fragmento obtido de tecido de bloco de parafina; s.i.= sem informação; (*) = escore de Gleason obtido do laudo anátomo-patológico, uma vez que a amostra se refere a neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Os escores de Gleason das demais amostras foram obtidos para cada fragmento coletado. A % de concordância se refere a similaridade das alterações de perdas e ganhos detectadas por HR-CGH para as duas amostras de cada paciente e reflete a heterogeneidade genética apresentada por dois diferentes focos tumorais de uma mesma próstata.

Avaliando as alterações exclusivas dos tumores primários do grupo I (que evoluíram para metástases) foram detectadas por HR-CGH **perdas** de **7q11.2** (3/8), **7q22** (5/8), **12q12-13** (3/8), **13q12-13** (6/8) e **13q21** (4/8). A metodologia de CGH-array confirmou apenas as perdas de **7q22**, **12q12** e **13q21** como sendo exclusivas dos CaP do grupo I. Quanto as alterações exclusivas dos CaP do grupo II (boa evolução clínica) foram detectadas por HR-CGH **ganhos** de **7q11.2** (3/5), **7q22** (1/5), **12q12-13** (3/5), **13q21** (3/5) e **13q12-13** (1/5). A CGH-array confirmou os ganhos de **7q22**, **12q12-13** e **13q12-13** como sendo exclusivas dos CaP do grupo II. Estes resultados sugerem que essas alterações poderiam discriminar tumores de pior prognóstico dos de bom prognóstico. As alterações detectadas exclusivamente nos CaP do grupo I (**perda de 7q22 e 13q12-13**) poderiam ser sugeridas como alterações relacionadas a pior prognóstico, uma vez que nenhum tumor do grupo II, de bom prognóstico, apresentou perda dessas regiões. Nessas regiões cromossômicas estão mapeados os genes supressores tumorais *PAI-1* (*Plasminogen activator inhibitor-1*) (7q22) e *BRCA2* (*Breast cancer 2 tumor suppressor*) (13q12-13) que poderiam ser sugeridos como candidatos associados a pior prognóstico a serem investigados no câncer de próstata. Por outro lado, **ganhos de 7q11.2, 12q12-13 e 13q21** detectadas exclusivamente nos CaP do grupo II poderiam ser sugeridas como alterações que poderiam estar relacionadas a grupos de amostras com prognóstico favorável. Essas regiões cromossômicas poderiam conter genes com função de supressão tumoral ou reguladores da proliferação celular e que ganhos ou ampliações desses genes promoveriam aumento de expressão de transcritos ou proteínas capazes de interferir no processo tumoral. Alguns genes mapeados nestas regiões incluem *CLDN3* (*Claudin 3*) e *CLDN4* (*Claudin 4*) (7q11.2); *ADAMST20* (*ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 20*) e *ARID2* (*AT rich interactive domain 2*) (12q12-13); *PCDH8* (*Protocadherin 8*), *PCDH9* (*Protocadherin 9*) e *PCDH20* (*Protocadherin 20*) (13q21). O envolvimento destes genes em carcinomas de próstata, bem como a avaliação da expressão gênica ou protéica em relação a características clínicas poderá esclarecer se estes seriam realmente marcadores prognóstico no câncer de próstata.

Validação dos resultados de HR-CGH e CGH-array pela metodologia de qRT-PCR

Foram selecionados cinco genes, *ARID1A*, *MTSS1*, *NME1*, *S100A4* e *TOP2A*, para validação dos achados de HR-CGH utilizando, para isso, a metodologia de qRT-PCR. Os critérios para seleção destes genes foram associação entre a função e o tipo de alteração encontrada nas amostras estudadas e dados em literatura relacionados ao câncer. Outro critério adotado para seleção dos genes foi a concordância entre os achados de alterações genômicas detectadas no presente estudo (por HR-CGH) e aqueles detectados por outro estudo da equipe utilizando a metodologia de CGH-array.

1. *ARID1A* (AT rich interactive domain 1A) (Aliases: *RP1-50O24.1*, *B120*, *BAF250*, *BAF250a*, *BM029*, *C1orf4*, *P270*, *SMARCF1*)

O gene *ARID1A* está mapeado em 1p36.1 e codifica um membro da família SWI/SNF (complexo de remodelamento da cromatina), que possui atividade helicase e ATPase e regula a transcrição de determinados genes, alterando a estrutura de sua cromatina (Nagl *et al.*, 2005). A proteína *ARID1A* ou p270 é constituída por pelo menos dois domínios conservados, importantes para o desempenho de sua função. O primeiro é um domínio de ligação ao DNA que pode se ligar especificamente a uma seqüência rica em AT para ser reconhecida pelo complexo SNF/SWI. O segundo é o domínio C-terminal da proteína, que pode estimular a ativação da transcrição dependente do receptor de glicocorticóide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=21264565>).

Este gene está associado com a via de sinalização do receptor de andrógeno, do receptor de estrógeno e na manutenção da transcrição mediada pela cromatina (Inoue *et al.*, 2002). Além disso, Nagl *et al.* (2005, 2007) mostraram a associação do *ARID1A* e o controle do ciclo celular. Os autores utilizaram como modelo a linhagem celular pré-osteoblástica MC3T3-E1, cujo processo de diferenciação é bem caracterizado, e bloquearam a proteína p270 (*ARID1A*) por métodos de RNA de interferência (RNAi) para avaliar o papel desta proteína no controle da proliferação celular. Os resultados desse estudo mostraram que as células com depleção de p270 normalmente apresentavam falha na parada do ciclo celular, evidenciada pela síntese contínua de DNA e

pela ausência de outras características, como o aumento da regulação de ciclinas, a diminuição da expressão de Histona H4 e a atividade quinase cdc2-específica.

O gene *ARID1A* é expresso em todos tecidos humanos normais examinados (Dallas *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004b), porém a expressão protéica não é detectável ou apresenta-se muito reduzida em linhagens tumorais, incluindo o carcinoma cervical e mamário (Nie *et al.*, 2000; DeCristofaro *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004b). Resultados das análises em 241 tumores (incluindo mama, útero, cólon ovário, estômago, pulmão, reto, rim, dentre outras) por *tissue array* mostraram que a expressão da proteína p270 estava diminuída em aproximadamente 30% dos carcinomas renais e em 10% dos carcinomas de mama (Wang *et al.*, 2004b). Foi também demonstrado que seu papel na regulação do ciclo celular pode ser mediado pela sua interação com proteínas supressoras de tumor, como por exemplo, a TP53 (Lee *et al.*, 2002) e RB1 (Trouche *et al.*, 1997), desempenhando assim um papel crítico na supressão tumoral em camundongos e em humanos (para revisão Roberts, 2004). O conjunto desses resultados, associado aos conhecimentos das funções do gene, sugerem que o *ARID1A* pode ter um papel importante na carcinogênese (DeCristofaro *et al.*, 2001; Nie *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004a).

As análises de HR-CGH em amostras de carcinoma de próstata do presente estudo mostraram perdas da região cromossômica 1p36.1 em 63% (5/8) dos casos do grupo I (que evoluíram com metástases), em 60% (3/5) do grupo II (boa evolução) e em 75% (6/8) das amostras do grupo III (diferentes biópsias de tumor primário de um mesmo paciente). Estes resultados foram comparados aos achados de CGH-array em um subgrupo das mesmas amostras. Resultados concordantes com perdas do BAC mapeado nesta região (e que contém a seqüência do gene *ARID1A*) foram detectados em 1/6 amostras de tumores primários e em 2/6 metástases de pacientes do grupo I. No entanto, não foram detectadas perdas deste BAC nos tumores do grupo II (boa evolução), sugerindo que este gene deve ter um papel relevante na carcinogênese da próstata principalmente relacionado à progressão da doença. Essas diferenças de resultados obtidos pelas duas metodologias, HR-CGH e CGH-array, podem ser explicadas pelas diferenças de sensibilidade das metodologias. Pela CGH-array é possível detectar alterações de perdas e

ganhos genômicos inferiores a 1Mb, enquanto que a HR-CGH é menos sensível, permitindo detectar perdas de segmentos de DNA de ~2Mb. Além disso, a resolução da HR-CGH é variável e pode depender da região cromossômica envolvida (Schoumans et al., 2004). Por esta razão, as perdas em 1p detectadas por HR-CGH nas amostras do grupo II se referem a grandes seqüências genômicas, que não necessariamente incluiriam a seqüência do gene *ARID1A*, e por este motivo não foram detectadas por CGH-array. A perda do gene *ARID1A* revelada pela metodologia de CGH-array, que confirma os resultados de HR-CGH, apenas em um subgrupo de amostras do grupo I, um tumor primário que evoluiu para metástase e em duas das metástases, e ainda a ausência de alterações neste BAC nos tumores primários do grupo II (boa evolução clínica) sugerem que este gene poderia discriminar um subgrupo de tumores com bom e mau prognóstico. Alterações genômicas associadas ao câncer de próstata numa região bem próxima da detectada neste estudo já haviam sido relatadas. Perdas em 1p32-1p36 foram relatadas por Nupponen *et al.* (1998b) e van Dekken *et al.* (2004) em linhagens celulares de CaP avaliadas por CGH e CGH-array, respectivamente, e por Nupponen *et al.* (1998a) em tumores de próstata recorrentes avaliados por CGH. Baseados na potencialidade de aplicação desses resultados na prática clínica e nas funções descritas em literatura para o gene *ARID1A* que indicam que este gene é um supressor tumoral, este foi selecionado para a validação por qRT-PCR em um grupo maior de carcinomas prostáticos.

Os resultados da qRT-PCR para validação dos resultados de perdas do gene *ARID1A* detectadas no presente estudo indicaram que a maior parte dos tumores de próstata (72%) expressa níveis aumentados do gene, enquanto que níveis normais ou diminuídos foram detectados em 24% e 4% das amostras, respectivamente. Dos três casos com expressão diminuída de *ARID1A*, dois apresentavam características de mau prognóstico, tais como: escore de Gleason e risco de recorrência altos, recidiva bioquímica (PSA pós > 0,2ng/mL) e presença de metástase no caso 38T. O terceiro caso (34T) não apresentou recidiva bioquímica (PSA pós=0,05ng/mL) durante o seguimento clínico (36 meses). Este caso apresentava baixo risco de recorrência (escore de Gleason baixo e pT2a).

A perda do gene detectada apenas nas amostras do grupo I (1/6, 17%) pelo método de CGH-array sugere seu envolvimento na progressão da doença. Desta forma, foram avaliados os perfis de expressão gênica de acordo com os dados clínicos e patológicos. As análises mostraram que níveis normais ou diminuídos da expressão do gene estão associados à pior evolução da doença, confirmando os achados de HR-CGH e CGH-array. Pacientes cujos tumores têm expressão normal ou diminuída de *ARID1A* apresentam maior risco de recorrência bioquímica que aqueles com expressão aumentada ($P=0,0223$, $OR=5,40$, $IC_{95\%}=1,26-23,05$). Além disso, os níveis normais ou diminuídos de expressão do gene *ARID1A* estão associados com diminuição do tempo de sobrevida livre de doença (SLD) em comparação com os pacientes com expressão aumentada do gene ($P=0,0131$; $OR=2,706$; $IC_{95\%}= 1,320-10,70$), sendo as medianas de SLD de 17 e de 72 meses, respectivamente. Vale ressaltar, que nesta análise foram excluídos os pacientes sem recidiva bioquímica cujo tempo de seguimento clínico foi inferior a 24 meses, de modo a eliminar qualquer viés na análise em decorrência do pouco tempo de acompanhamento dos pacientes.

Considerando que o gene *ARID1A* é um supressor tumoral, seja pelo controle do ciclo celular ou por outras funções ainda não conhecidas, e ainda os resultados deste estudo associando níveis normais ou diminuídos do gene com os tumores com pior evolução clínica, nós postulamos uma hipótese para explicar os resultados de expressão deste gene nos carcinomas prostáticos. Assim, no início do processo de proliferação anormal do tecido prostático ocorreria o aumento da ativação deste gene, levando ao seu aumento da expressão, na tentativa de controlar o crescimento do tumor. Esta hipótese é reforçada pela alta frequência de aumento de expressão deste gene nas amostras de CaP, HNP e do tecido adjacente ao tumor em comparação ao tecido prostático normal. No entanto, ao longo do processo tumoral, naqueles tumores mais agressivos, parte das células neoplásicas perde o gene por deleção, pelo menos em um alelo, o que levaria à detecção de níveis normais ou diminuídos dos transcritos, dependendo da proporção de células com deleção desta região gênica. É importante salientar que como na análise de qRT-PCR foi utilizado mRNA extraído de um pool de células do tumor (com deleção e sem deleção), pode-se detectar níveis normais do transcrito, em que

o aumento da expressão de *ARID1A* numa população celular é compensada pela diminuição em outra. A validação dos resultados pela análise protéica de p270 num número maior de tumores de diferentes graus bem como em amostras de HNP e tecido adjacente, poderá confirmar os achados de expressão gênica do presente estudo e ainda reforçar a nossa hipótese para o papel deste gene nos tumores prostáticos. A utilização da metodologia de imunohistoquímica para esta análise facilitaria a sua aplicação futura na prática diagnóstica dos carcinomas de próstata.

Em resumo, os resultados deste estudo sugerem que o *ARID1A* tem o potencial para ser utilizado como uma ferramenta diagnóstica, podendo auxiliar na discriminação de um subgrupo de pacientes cujos tumores apresentam caráter mais agressivo, e com isso, permitir uma conduta clínica mais adequada nestes casos.

2. *MTSS1* (Metastasis Suppressor 1) (Aliases: DKFZp781P2223, FLJ44694, KIAA0429, MIM, MIMA, MIMB)

O gene *MTSS1* está mapeado em 8q24.1. Esse gene, também conhecido como *MIM* (*Missing in Metastasis*), foi identificado por Lee *et al.* (2002) como um novo gene candidato à supressão de metástases. Os autores identificaram por *Northern blot* a presença dos transcritos em tecidos normais como baço, próstata, testículo, útero, cólon e sangue periférico, porém estavam ausentes em linhagens metastáticas de câncer de bexiga, bem como em linhagens metastáticas de câncer de mama e de próstata. Análise funcional da proteína MIM mostrou que está implicada no controle do citoesqueleto de actina, e que o mecanismo supressor de metástase desta proteína poderia estar relacionado à re-organização da actina e/ou alterações na adesão celular (Woodings *et al.*, 2003).

Em outro estudo (Loberg *et al.*, 2005) foi avaliada a expressão do *MTSS1* (*MIM-A*) e duas variantes de *splicing* [*MIM(12del)* e *MIM-B*], que apresentam homologia de seqüência de aminoácidos acima de 50% em relação à proteína MIM-A. Os autores mostraram diminuição de expressão dos três transcritos em linhagens de tumores de próstata bem como em tumores primários de pacientes CaP em relação ao tecido prostático normal. Além disso, os autores transfectaram o gene *MIM-A* em uma linhagem celular de

CaP (PC-3) e observaram que a expressão diminuída do gene estava associada com a diminuição dos filamentos de actina e que o aumento da expressão do *MTSS1* estava associado principalmente com a diminuição da proliferação celular, porém não alterava a adesão ou motilidade celular. Estes dados sugeriram que a redução da expressão desse gene no CaP e em outros cânceres pode contribuir para o desenvolvimento do tumor, bem como, de metástases.

Recentemente, Wang *et al* (2007) investigaram a expressão da proteína MTSS1 por imunohistoquímica em tumores de bexiga de baixo grau, de alto grau e em células normais. Os níveis de MTSS1 nos tumores de baixo grau foram semelhantes aos das células normais, ao passo que nos tumores de alto grau apresentaram-se significativamente diminuídos. No mesmo estudo foi analisada a expressão de MTSS1 em linhagens de células epiteliais transicionais normais (SV-HUC-L) e de células de carcinoma transicionais (TCCSUP) mostrando alta expressão nas linhagens normais e baixa expressão na linhagem tumoral. Os autores sugeriram que a regulação negativa de MTSS1/MIM pode se correlacionar com a transição das células tumorais de morfologia do tipo epitelial mais diferenciada para carcinomas menos diferenciados.

Os resultados de HR-CGH revelaram perda de 8q24.1 em 75% (6/8) das amostras de CaP e 64% (7/11) das metástases do grupo I, em 80% (4/5) dos CaP do grupo II e em todas as amostras de CaP do grupo III (n=8). Os resultados de aCGH mostraram perdas em 4/6 tumores primários e em 3/6 metástases do grupo I e ganho dessa região genômica em 1/6 tumores primários também do grupo I. Por outro lado, no grupo II, de boa evolução clínica, não foi observada alteração. No grupo III foram detectados ganhos em 2/4 amostras de dois pacientes. Estes resultados sugerem que a perda do gene *MTSS1*, um supressor de metástase, poderia contribuir para o processo metastático do câncer de próstata. Na validação por qRT-PCR, os resultados obtidos mostraram diminuição de expressão de *MTSS1* num subgrupo de pacientes (6/74, 8%), enquanto que expressão normal e aumentada do gene foi detectada em 50% (n=37) e em 42% (n=31) das amostras, respectivamente.

Dos seis pacientes com diminuição de expressão (23T, 34T, 51T, 176, 213 e 217), cinco apresentaram risco de recorrência alto (exceto 34T), destes

apenas 23T e 176 tiveram recorrência bioquímica. O caso 51T não pôde ser avaliado devido a ausência dos dados de PSA pós-cirúrgico. Dos três casos restantes, os casos 213 e 217 estão sendo acompanhados por 4 e 12 meses, respectivamente, e um está sendo acompanhado há 36 meses (caso 34T). Além disso, para o caso 38T, que comprovadamente teve metástases, a expressão de *MTSS1* foi de 0,59, próxima do limite considerado para diminuição de expressão ($QR \geq 2,0$). É possível que este curto período de seguimento clínico de alguns pacientes não permita inferir se eles realmente constituem um subgrupo de pior prognóstico que poderá evoluir para metástases.

Foram avaliadas as freqüências de casos com expressão normal ou diminuída de *MTSS1* nos grupos com e sem recidiva bioquímica e não foram observadas diferenças entre os grupos. Vale ressaltar que para esta análise foram excluídos os pacientes sem recidiva bioquímica com menos de 24 meses de seguimento clínico. Com relação aos parâmetros clínico-histopatológicos, a análise dos níveis de *MTSS1* em relação ao *PSA pós-cirúrgico elevado* ($\geq 0,2\text{ng/mL}$) apresentou diferença marginalmente significativa ($P=0,0564$), evidenciando que níveis mais baixos do gene poderiam estar relacionados à recorrência bioquímica. Este resultado foi confirmado numa análise posterior, quando foram excluídos os casos com seguimento clínico inferior a 24 meses, indicando que níveis mais baixos do gene estão associados significativamente com recidiva bioquímica nos pacientes com carcinoma de próstata ($P=0,0376$).

Embora não foram observadas diferenças nas freqüências de casos com expressão normal ou diminuída de *MTSS1* nos grupos com e sem recidiva bioquímica, os achados de associação significante entre menores níveis de expressão do gene e níveis mais altos de PSA pós-cirúrgico, confirmam, pelo menos em parte, os achados de perda do gene por CGH-array no grupo de pacientes com pior evolução. O aumento da casuística, principalmente de pacientes acompanhados por períodos mais longos, poderá contribuir para estabelecer o papel do gene *MTSS1* na progressão dos carcinomas de próstata.

3. NME1 (non-metastatic cells 1) (Aliases: AWD, GAAD, NDPK-A, NDPKA, NM23, NM23-H1)

O gene *NME1*, localizado em 17q21.3 foi isolado a partir de uma biblioteca de cDNA de linhagens celulares metastáticas de camundongos e foi descrito, como um supressor de metástases, apresentando baixa expressão de mRNA em células com alto potencial metastático (Varesco *et al.*, 1992; Steeg *et al.*, 1998).

Diversos estudos indicam que a redução da expressão de *NME1* está associada com características histopatológicas agressivas do tumor, comportamento agressivo, menor sobrevida do paciente, bem como metástases em vários carcinomas (Bevilacqua *et al.*, 1989; Ayhan *et al.*, 1993; Royds *et al.*, 1993; Tokunaga *et al.*, 1993; Koderer *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1994; Tannapfel *et al.*, 1995; Engel *et al.*, 1998; Steeg *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2001; Curtis *et al.*, 2007; Wiese *et al.*, 2007; Carinci *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008).

A expressão reduzida da proteína NM23 em carcinomas colorretais primários foi sugerida como um preditor de metástases em fígado e em linfonodos (Berney *et al.*, 1999). Garinis *et al.* (2003) avaliaram a expressão de *NME1* em 52 tumores colorretais e detectaram a diminuição da expressão em 54% dos carcinomas e associaram estes achados com a presença de metástases em linfonodos. A maioria dos estudos sugere que NM23 tem um papel prognóstico em carcinomas gástrico e colorretal (Dursun *et al.*, 2002). Carcinomas bem diferenciados apresentam marcação intensamente corada para a proteína NM23 quando comparados aos adenocarcinomas moderadamente e pouco diferenciados (Yeung *et al.*, 1998; Dursun *et al.*, 2002).

Embora boa parte dos estudos mostre a diminuição da expressão de *NME1* ou da sua proteína em vários tipos tumorais e correlacionem com características de pior prognóstico, há uma grande controvérsia na literatura a respeito da expressão desse gene e seu valor prognóstico. Há estudos que mostraram o aumento da expressão de *NME1* em tumores invasivos e relacionam esse aumento de expressão com a progressão da doença. Zhao *et al.* (2004) relataram que o aumento da expressão do gene leva a alteração do

ciclo celular e a resposta a danos do DNA, apoptose, transdução de sinal, angiogênese, adesão, invasão e metástase. Lee *et al.* (2006) avaliaram a expressão da proteína NM23 numa plataforma de *tissue microarrays* de linfomas e detectaram aumento da expressão associado com alto escore da doença e baixa taxa de sobrevivência dos pacientes. O aumento da expressão de *NME1* também foi relatada por Wiese *et al.* (2007) ao avaliarem genes diferencialmente expressos em carcinomas colorretais invasivos em um estudo de cDNA *microarrays*. Por outro lado, outros relatos mostraram que o aumento da expressão do gene está associado com agressividade reduzida e com bom prognóstico em carcinoma de células renais (Kanayama *et al.*, 1994; Nakagawa *et al.*, 1998).

Em câncer de próstata, os trabalhos publicados também refletem esta controvérsia quanto ao papel de *NME1* na carcinogênese. Konish *et al.* (1993) encontraram redução da expressão proteica de *NME1* por imunohistoquímica em CaP de pacientes com doença metastática e relataram coloração moderadamente positiva para as amostras de HNP. Por outro lado, Igawa *et al.* (1994) mostraram que a coloração positiva de *NME1* (por imunohistoquímica) estava associada com CaPs de alto grau, indicando que em CaP o *NME1* não parece exercer função de supressor tumoral.

Os resultados desses estudos são conflitantes e não permitem uma conclusão sobre o real papel desta proteína nos cânceres em geral, em especial, no CaP, o que indica que outros estudos devem ser conduzidos para elucidar este papel do *NME1*. Além disso, como em outros casos, a proteína pode ter papéis diferentes na evolução do tumor dependendo da fase do tumor e também em diferentes tumores.

Os resultados do estudo de HR-CGH mostraram deleções em 17q21.3 em 88% (7/8) das amostras de CaP e nas 11 metástases do grupo I, em 60% (3/5) dos CaP do grupo II e em 88% (7/8) dos CaP do grupo III. A avaliação por CGH-array revelou perdas afetando o gene *NME1* em 3/4 amostras de CaP de dois pacientes (grupo III, analisado na plataforma de 19k7.1 *single-spotted microarrays*). O gene *NME1* não estava representado na plataforma BACs HB68 (6k) e, portanto, não foi possível avaliar o comportamento deste gene nas amostras dos grupos I e II.

Os resultados de expressão gênica do presente estudo mostraram diminuição de expressão em 14% dos carcinomas primários (casos 2T, 3T, 8T, 13T, 14T, 26T, 34T, 38T, 51T e 217) e aumento em 30%. Estes casos apresentaram características clínicas bastante variadas que não mostraram associação com os níveis de expressão gênica. Os casos 34T, 51T e 217 também apresentaram diminuição de expressão do gene *MTSS1*. O único caso com metástases ao diagnóstico (38T), que apresentou diminuição de *NME1*, também mostrou expressão diminuída de *ARID1A* (QR=0,28) e discreta diminuição de *MTSS1* (QR=0,59). Sendo assim, não foi possível estabelecer nestes casos uma relação da diminuição de expressão deste gene e as características clínicas, uma vez que outros genes, incluindo os analisados neste estudo, também devem desempenhar um papel importância na evolução da doença.

A análise de associação entre os níveis do transcrito do *NME1* e os parâmetros clínico-histopatológicos isolados ou agrupados em escores não revelou nenhum resultado significativo. Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas entre os níveis normais e diminuídos de expressão gênica e recidiva bioquímica, tampouco com o tempo de sobrevida livre de doença. Borchers et al.(1996) avaliaram a expressão de *NME1* por qRT-PCR em amostras de HNP e CaP, e verificaram a relação da expressão gênica com características clínicas. Eles encontraram níveis significativamente mais baixos de *NME1* nas amostras de CaP em relação as amostras de HNP ($P=0,028$). Não foi encontrada diferença significativa de expressão gênica entre os diferentes graus de Gleason (3 -10) nem com relação a tratamento hormonal. Segundo os autores, os resultados sugerem que alteração da regulação de *NME1* poderia ocorrer durante o desenvolvimento do carcinoma de próstata, mas que este não seria um marcador de metástases nestes carcinomas.

Desta forma, os resultados de expressão do gene *NME1* por qRT-PCR não validaram os achados de HR-CGH. No entanto, este resultado não descarta o envolvimento da região 17q21.3 como importante na carcinogênese da próstata, outros genes mapeados nesta região podem estar envolvidos e poderiam ser investigados como potenciais genes candidatos no CaP.

4. S100A4 (S100 calcium binding protein A4) (Aliases: 18A2, 42A, CAPL, FSP1, MTS1, P9KA, PEL98)

O gene *S100A4* está mapeado em 1q21. A proteína codificada por esse gene constitui parte da família de proteínas de ligação ao cálcio S100 que compreende cerca de 20 membros com funções relacionadas a processos celulares, tais como divisão celular, motilidade, secreção, síntese protéica e permeabilidade da membrana (Schafer e Heizman, 1996; Heizman *et al.*, 2002; Donato, 2003). No entanto, alguns membros da família, como S100A2, S100A4, S100A5, S100A6, S100A8, S100A9 e S100A11 desempenham papéis importantes no desenvolvimento e progressão tumoral (Hanqc *et al.*, 2004; Rehman *et al.*, 2004a; 2004b; 2005; Cross *et al.*, 2005; Helfman *et al.*, 2005).

O gene *S100A4* é reconhecido como um marcador de progressão tumoral, invasão, metástase e pior prognóstico em vários tipos de câncer, tais como mama, bexiga, colorretal, cólon, pâncreas, tireóide, pulmão, próstata e ovário (Davies *et al.*, 1993; 2002; Takenaga *et al.*, 1997; Rudland *et al.*, 2000; Yonemura *et al.*, 2000; Gongoll *et al.*, 2002; Mazzucchelli, 2002; Grupta *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2003; Jenkinson *et al.*, 2004; Helfman *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2005; Rudland *et al.*, 2006; Agerbaek *et al.*, 2006; Hemandas *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Saleen *et al.*, 2006; Kikuchi *et al.*, 2006; Ai *et al.*, 2008; Min *et al.*, 2008).

Davies *et al.* (1993) mostraram que a transfecção de linhagem celular epitelial benigna de camundongos com *S100A4* induziu a um aumento da motilidade e alta incidência de metástases. Takenaga *et al.* (1997) mostraram que a diminuição da expressão do *S100A4* por RNA *antisense* suprimiu a capacidade metastática de células de carcinoma pulmonar de rato Lewis altamente metastático. Em adição, a expressão aumentada da proteína S100A4 foi associada com metástase e diminuição da sobrevida em vários tipos de câncer, incluindo o de bexiga (Davies *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2007), mama (Rudland *et al.*, 2000), colorretal (Gongoll *et al.*, 2002; Hemandas *et al.*, 2006), ovário (Kikuchi *et al.*, 2006), estômago (Yonemura *et al.*, 2000) e esôfago (Ninomiya *et al.*, 2001).

Recentemente, Ai *et al.* (2008) relataram expressão positiva de S100A4 por imunohistoquímica em 61,3% de tumores pancreáticos (n=62). Além disso, os autores relataram que a expressão aumentada de S100A4 estava

significativamente correlacionada com o tamanho do tumor, estadiamento (TNM) e pior prognóstico, sugerindo que o aumento de expressão de S100A4 poderia acentuar a motilidade celular e a invasividade tumoral.

Em carcinomas de próstata, a expressão aumentada da proteína S100A4 e do seu mRNA foi observado em 28/37 (76%) dos CaPs em comparação com 3/36 (8%) das HPB e prostatites. Além disso, foi observado um aumento progressivo da expressão com o aumento do grau do tumor. Neste trabalho também foram avaliadas linhagens celulares de CaP que também mostraram aumento da expressão protéica em todas as células de carcinoma, enquanto baixos níveis de expressão (constitutivos) foram observados em outras linhagens de células não-malignas (Grupta *et al.*, 2003).

O *S100A4* exibe um amplo espectro de funções, tanto extracelulares quanto intracelulares, como um membro típico da família S100. A proteína intracelular S100A4 pode influenciar funções celulares vitais, tais como motilidade celular, invasão, divisão e morte celular (Grigorian *et al.*, 2001). Apesar das evidências de que as proteínas S100 possuem funções extracelulares, seu mecanismo ainda não é totalmente conhecido. Embora haja relatos da relação entre a expressão do *S100A4* e pior prognóstico, o mecanismo real de indução tumoral permanece ainda pouco estudado (Marenholz *et al.*, 2004). S100A4 é secretada constitutivamente por fibroblastos em cultura, e a cultura simultânea de células tumorais e fibroblastos estimula a liberação da S100A4 por este tipo celular (Watanabe *et al.*, 1992; Schmidt-Hansen *et al.*, 2004). Têm-se proposto que a S100A4 intracelular acelera a progressão tumoral pela estimulação da motilidade das células endoteliais, promovendo deste modo a angiogênese. A invasão pode não ser dependente da estimulação da proliferação celular, mas correlacionado com a modulação transcricional de genes envolvidos com degradação proteolítica da matriz extracelular (Schmidt-Hansen *et al.*, 2004). Neste sentido, é sabido que S100A4 extracelular estimula a atividade da metaloproteinase 13 (MMP-13), que tem como função a degradação de componentes da matriz extracelular, e age como fator moderador pró-metastático de células tumorais (Schmidt-Hansen *et al.*, 2004). Estudos recentes em outros tumores, como carcinoma de mama e de cabeça e pescoço, mostraram que a proteína S100A4 é expressa em células dendríticas presentes no estroma do tecido (Ambrosio *et al.*, 2007).

A análise de HR-CGH permitiu a identificação de ganhos em 1q21 em em 38% (3/8) dos CaP e em 55% (6/11) das metástases do grupo I, em 20% (1/5) dos CaP do grupo II e em 25% (2/8) dos CaP do grupo III. Por outro lado, perdas dessa região cromossômica foram detectadas em 50% (4/8) dos CaP e em 9% (1/11) das metástases do grupo I e em 50% (4/8) dos CaP do grupo III. Os resultados de CGH-array mostraram perdas do BAC que contém o gene *S100A4* em 2/4 amostras de tumores primários do grupo II (bom prognóstico) e perda no tumor primário em 1/6 casos do grupo I.

A análise dos transcritos de *S100A4* mostrou que 51% dos tumores apresentaram níveis dentro dos limites normais de expressão, sendo que a porcentagem de casos com aumento (22%) e diminuição (27%) dos transcritos foi semelhante. O subgrupo de pacientes com níveis mais altos do gene apresentaram características de mau prognóstico. Em relação às comparações dos níveis de expressão de *S100A4* e os parâmetros clínico-histopatológicos, foi observada associação significativa entre os níveis aumentados de expressão do *S100A4* e presença de *extensão extra prostática* ($P=0,008$). Esses achados foram confirmados por outra análise, que mostrou a força de associação entre expressão aumentada do gene e presença de extensão extra-prostática ($P=0,020$; $OR=5,66$, $IC_{95\%}=1,171-27,37$, teste de Fisher). Esses resultados sugerem que o aumento da expressão de *S100A4* estaria relacionado à maior capacidade invasiva das células tumorais. Adicionalmente, a análise da expressão de *S100A4* em relação aos escores clínico-histopatológicos revelou que uma associação marginalmente significativa ($P=0,048$) entre a presença de pelo menos um fator de pior prognóstico (escore de 1 a 5) e níveis mais altos de *S100A4*. Assim, estes resultados validam os achados de CGH-array e estão de acordo com os dados da literatura. O conjunto dos resultados reforça a hipótese de que níveis diminuídos do gene decorrentes, por exemplo, da deleção de pelo menos um alelo, estariam relacionados às características de bom prognóstico.

Diferentemente dos demais genes avaliados nesse estudo foi observada diferença marginalmente significativa ($P=0,054$) entre os níveis de *S100A4* nos tumores em relação ao tecido adjacente, sendo que estes últimos apresentaram níveis mais altos. Quando os grupos de amostras de tecidos adjacentes e HNP foram agrupados e comparados às amostras tumorais, essa

diferença ficou ainda mais evidente ($P= 0,021$). A semelhança entre o padrão de expressão do tecido adjacente com o tecido tumoral para a maioria dos genes analisados constitui um achado interessante, sugerindo que o tecido adjacente poderia conter células do tumor não detectadas por análise morfológica. Por outro lado, a diferença de expressão entre tecido adjacente e o tecido tumoral detectada para o gene *S100A4* poderia ser explicado pela maior frequência de células estromais no tecido adjacente. De acordo com dados previamente publicados, células que expressam *S100A4* foram detectadas no estroma de cânceres de mama (Rudland *et al.*, 2000; Nikitenko *et al.*, 2000), carcinoma do cólon (Taylor *et al.*, 2002), câncer colorretal (Hemandas *et al.*, 2006, Cho *et al.*, 2005) e câncer prostático (Grupta *et al.*, 2003). Outros estudos observaram a expressão de *S100A4* em várias células que participam da formação do estroma tumoral, como macrófagos, linfócitos-T e neutrófilos (Grigorian *et al.*, 1993; 1994; Takenaga *et al.*, 1994). Modelos animais sugerem que a expressão de *S100A4* e sua produção por células do estroma contribuem para a progressão tumoral e metástase (Grum-Schwensen *et al.*, 2005). Recentemente, Cabezón *et al.* (2007) utilizaram anticorpos específicos em combinação com imunohistoquímica para identificar os tipos celulares que expressam *S100A4* em biópsias de câncer mamário obtidas de pacientes de alto risco para metástase. Os autores demonstraram que a *S100A4* é produzida por fibroblastos, macrófagos e linfócitos ativados e é lançado para o fluido intersticial tumoral, onde é encontrado em diversas formas correspondentes a variantes protéicas.

Tem se tornado evidente que o microambiente contribui para tumorigênese em cânceres de origem epitelial, incluindo o de próstata (Cunha *et al.*, 2002, 2003). Dezoito amostras de células do estroma de diferentes origens histológicas/patológicas de zona de transição normal, zona periférica, hiperplasia prostática benigna e cânceres de próstata foram avaliadas por cDNA *microarrays* (Zhao *et al.*, 2007). Os autores observaram aumento do transcrito *S100A4* e também da proteína em amostras de hiperplasia prostática benigna comparadas às células normais da zona de transição. Demonstrou-se que a proteína é expressa por fibroblastos, possivelmente derivada de células epiteliais por meio de transformação epitélio-mesênquima durante a fibrose

(Strutz *et al.*, 1995; Iwano *et al.*, 2002). Sua expressão também é induzida por citocinas classicamente associadas com fibrose (Okada *et al.*, 1997).

A grande maioria dos estudos em literatura não realizou procedimentos de microdissecção das células tumorais na análise de expressão do gene *S100A4*. Considerando que a expressão do gene *S100A4* ocorre em outras células incluindo as do estroma, e que todos os casos de CaP do presente estudo foram microdissecados, garantindo a presença predominante de células tumorais, essa poderia ser uma possível explicação para a diferença dos níveis gerais de expressão desse gene detectada entre CaP (níveis mais baixos) e tecido adjacente (níveis mais altos).

Finalmente, é importante ressaltar que o clone representativo do gene *S100A4* presente na plataforma de BACs HB68 (RP11-139D23) continha vários membros da família S100, além de outros genes. Uma análise de homologia de seqüências foi realizada utilizando a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) entre o clone e os genes relacionados. Foi verificada alta similaridade (~90%) entre alguns genes da família S100: *S100A7*, *S100A6*, *S100A5*, *S100A3* e *S100A2* e entre outros genes contidos no BAC e descritos na *gene list* (~80%): *KIAA0460*, *TARSL1*, *ADAMTSL4*. Portanto, os resultados de perda deste BAC nos tumores podem propiciar a avaliação de outros genes candidatos nos carcinomas de próstata, além do gene avaliado neste estudo.

5. *TOP2A* (topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa) (Aliases: DNA topoisomerase II, 170 kD; DNA topoisomerase II, alpha isozyme)

O gene *TOP2A*, mapeado em 17q21-q22, adjacente ao oncogene *HER2*, codifica a enzima topoisomerase II- α , que cataliza o relaxamento da super-helicoidização das moléculas de DNA, essencial para a síntese de RNA e duplicação do DNA (Mondal e Parvin, 2001). Além disso, a *TOP2A* está envolvida em processos como condensação cromossômica, separação de cromátides e reparo do DNA (Zwelling, 1985).

O aumento da expressão de *TOP2A* tem sido relatado em cerca de 20 a 62% dos adenocarcinomas mamários (Cardoso *et al.*, 2004; Rudolph *et al.*, 1995; Coon *et al.*, 2002; Durbecq *et al.*, 2004; Bhargava *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2005; Miyoshi *et al.*, 2008) e a amplificação gênica descrita em

aproximadamente 12–24% dos cânceres de mama (Cardoso *et al.*, 2004; Coon *et al.*, 2002; Bhargava *et al.*, 2005; Mueller, *et al.*, 2004; Knoop *et al.*, 2005). Além dos tumores mamários, cânceres de ovário (Chekerov *et al.*, 2006; Walker *et al.* 2007) e de pulmão (Keith *et al.*, 1992) também apresentaram expressão aumentada de *TOP2A*.

Estudos avaliando a expressão protéica do *TOP2A* têm mostrado aumento da expressão dessa proteína (por imunohistoquímica) em cânceres de bexiga, mama, ovário e próstata (Simon *et al.*, 2003; Bhargava *et al.*, 2005; Chekerov *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2006; Bai *et al.* 2007; Nielsen *et al.*, 2008; Kosari *et al.*, 2008; Rody *et al.*, 2008; Arriola *et al.*, 2008).

Chekerov *et al.* (2006) avaliando a expressão do gene *TOP2A* em células tumorais e estromais microdissecadas a partir de tumores ovarianos primários (n=34) e recorrentes (n=28), por qRT-PCR, hibridação *in situ* utilizando sonda de RNA e imunohistoquímica, mostraram que esse gene apresenta padrão de expressão distinto para células tumorais e estromais adjacentes ao tumor ovariano. A expressão de *TOP2A* era muito mais abundante em células tumorais do que no estroma, em nível de RNA e proteína. Entretanto, um padrão específico de expressão foi encontrado nas amostras de tumores recorrentes após quimioterapia: a expressão de *TOP2A* era mais abundante (RNA e proteína) em células tumorais de pacientes não tratados do que nos pacientes tratados, e o padrão inverso foi encontrado em células estromais (expressão mais abundante em tumores recorrentes do que nos tumores primários). Os autores reportam que essas diferenças no padrão de expressão do *TOP2A* em células epiteliais e no estroma adjacente poderiam refletir os efeitos diversos da quimioterapia em duas subpopulações celulares e que as células estromais possivelmente desempenhariam algum papel na progressão tumoral ovariana e resistência à quimioterapia.

Em câncer de próstata, Murphy *et al.* (2007), avaliaram 100 amostras de carcinoma prostático (41 localizados e 59 avançados) e 42 casos de hiperplasia prostática benigna, com uso de *tissue microarrays*, para os genes *TOP2A* e *HER2*, por avaliação imunohistoquímica e FISH (hibridação fluorescente *in situ*). Os autores observaram reatividade para o HER2 em oito tumores dos quais seis também expressaram *TOP2A* (75%) revelando uma associação estatisticamente significativa ($P=0,0009$) entre o aumento de

expressão protéica de HER2 e de TOP2A. O aumento de expressão desses genes foi confirmado por FISH, que revelou amplificação em baixo número de cópias (1,5 a 2,19 cópias) nos cinco tumores para o gene *TOP2A* e em quatro para o *HER2*. Não foi detectado alto nível amplificação (número de cópias $\geq 3,0$) para os genes avaliados. Os resultados mostraram ainda forte correlação entre a amplificação de *TOP2A* e resistência a andrógenos bem como uma associação entre amplificação do *TOP2A* e diminuição da sobrevida.

Os resultados do estudo com HR-CGH mostraram ganhos no cromossomo 17q em 1/5 tumores do grupo II (paciente P29). A avaliação por CGH-array revelou que o BAC contendo o gene *TOP2A* estava envolvido em ganhos em 1/4 amostras de carcinoma de próstata de dois pacientes (grupo III, analisado na plataforma de 19k7.1 *single-spotted microarrays*), em 1/4 tumores do grupo II (paciente P29) e em 1/6 tumores primários e 1/6 metástases de pacientes do grupo I avaliados na plataforma BACs HB68 (6k), confirmando os achados de HR-CGH.

Na análise de expressão gênica o aumento de *TOP2A* foi detectado em 84% das amostras de CaP avaliadas, sendo que 41% apresentou alto nível de expressão (QR>10). A análise de associação entre os níveis do transcrito do *TOP2A* e os parâmetros clínico-histopatológicos agrupados em escores não mostrou nenhuma associação estatisticamente significativa entre os níveis aumentados de transcritos e escores de pior prognóstico. Entretanto, nossos resultados mostraram que os níveis mais altos de *TOP2A* nos tumores primários estão associados aos maiores escores de Gleason, sugerindo que este gene pode estar envolvido com o caráter mais agressivo dos tumores de próstata.

Altos níveis de expressão em comparação aos tecidos prostáticos normais foram observados em 61/73 (84%) amostras de CaP, em 4/6 (67%) amostras de HNP e em 13/19 (68%) amostras de tecido adjacente indicando ser este um evento precoce da carcinogênese prostática relacionado a proliferação celular anormal. Recentemente, Kosari *et al* .(2008) utilizaram análise de expressão por microarray em 100 amostras microdissecadas a *laser* incluindo o epitélio não neoplásico, CaP (escores de Gleason 3, 4 e 5) e metástases nodulares. Entre os genes relatados como associados com progressão sistêmica nos carcinomas de próstata estavam incluídos o *TOP2A*

e *RRM2*, os quais foram validados por qRT-PCR. Estes genes foram identificados como parte de um *cluster* de genes de proliferação por Tabach et al. (2005).

Hughes *et al.* (2006) já haviam sugerido um aumento da expressão protéica de TOP2A associado com o aumento dos escores de Gleason e com insensibilidade a hormônios. Os autores avaliaram HNP e CaP com diferentes escores de Gleason (de 6 a 10) numa plataforma de tissue microarray. Eles encontraram marcações positivas da TOP2A inclusive nas HNP, mostrando que não houve diferença significativa entre HNP e CaP com escore de Gleason 6(3+3). Por outro lado, mostraram que os CaPs com escores de Gleason mais altos (8, 9, 10) apresentavam aumento de expressão da TOP2A significativa em relação aos CaPs com escores de Gleason mais baixos (6 e 7). Dentre os CaP com maiores escores de Gleason os autores avaliaram os casos resistentes ao tratamento hormonal (n=15) contra os que não haviam recebido nenhum hormônio (n=34) e encontraram diferença significativa, sugerindo que expressão aumentada de TOP2A estaria relacionada à insensibilidade hormonal. Os resultados de expressão gênica do presente estudo corroboram esses achados. Embora detectados níveis altos de expressão de TOP2A para as amostras de HNP, não houve diferença significativa entre elas e os CaPs com escore de Gleason 5 e 6 ($P=0,150$). Além disso, mostramos que quanto mais alto o escore de Gleason maior o nível de expressão de TOP2A ($P=0,0006$). Quanto ao tratamento hormonal, não foi possível avaliar a relação da expressão de TOP2A com este dado clínico, pois o número de casos que receberam tratamento hormonal em nossa casuística era muito pequeno – apenas 4 dos 75 CaP avaliados (casos 1T, 38T, 50T e 88). Esses casos apresentaram características clínicas variáveis, dentre elas escore de Gleason 7(3+4), 7(4+3) e 9 (5+4), risco de recorrência de moderado a alto, e QR para TOP2A variou de 6,04 a 49,01.

A associação dos níveis mais altos dos transcritos de TOP2A com os maiores escores de Gleason mostrada neste estudo, sugere o envolvimento deste gene na progressão da tumorigenese prostática. Sendo assim, este poderia ser um marcador adicional para a detecção de tumores com caráter mais agressivo, e com isso, auxiliar na prática clínica e eventualmente no tratamento destes pacientes. Sendo assim, estudos por imunohistoquímica

avaliando a expressão da TOP2A já estão em andamento para a confirmação destes resultados, e uma vez confirmados, poderia ser empregado como marcador diagnóstico de tumores mais agressivos. Além disso, a investigação da expressão do oncogene *HER-2* associada a expressão de TOP2A nas amostras de nossa população poderiam auxiliar no delineamento de tratamento específico para um subgrupo de pacientes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia de HR-CGH é de grande utilidade para os estudos de citogenética molecular em tumores sólidos. As vantagens desta técnica incluem: não depender de preparações cromossômicas; ser aplicável a tecido fixado e incluído em parafina; avaliar o genoma como um todo, usando uma pequena quantidade de DNA; não depender do conhecimento prévio de regiões genômicas afetadas, mostrando-se, portanto, como uma ferramenta alternativa para a triagem dos desequilíbrios genômicos e identificação de novos marcadores nos diferentes tumores, incluindo os carcinomas de próstata.

Nesse estudo, a aplicação da HR-CGH permitiu a identificação diversas regiões cromossômicas envolvidas em perdas e ganhos genômicos, refletindo a complexidade das alterações genéticas dos tumores de próstata. Além disso, esta análise permitiu detectar alterações cromossômicas em diferentes tipos de amostras de CaP, ou seja, com e sem evolução metastática, incluindo as próprias metástases. Assim foi possível detectar as semelhanças e as diferenças entre os perfis de alterações de cada grupo, com o intuito de identificar novas regiões cromossômicas que poderiam conter genes envolvidos com a carcinogênese prostática. Entretanto, devido à limitação dessa metodologia quanto à resolução das regiões cromossômicas envolvidas em perdas e ganhos, comparamos os resultados desse estudo com os resultados de CGH-array realizado pelo nosso grupo em um subgrupo das amostras avaliadas por HR-CGH. Assim, os resultados de CGH-array (não apresentados) auxiliaram na escolha dos genes mapeados nas regiões cromossômicas alteradas detectadas por HR-CGH, e que poderiam ser marcadores tumorais e de metástases para o câncer de próstata. Além disso, a seleção dos genes levou em consideração a função e o tipo de alteração encontrada nas amostras estudadas e dados em literatura relacionados ao câncer. Desta forma, os genes selecionados, *ARID1A*, *MTSS1*, *NME1*, *S100A4* e *TOP2A*, foram validados por qRT-PCR em outro grupo de amostras de CaP e em número maior.

Três genes supressores tumorais localizados em regiões de perdas, *ARID1A*, *MTSS1* e *NME1*, e dois oncogenes, *S100A4* e *TOP2A*, foram selecionados com base nos resultados de HR-CGH e CGH-array.

Especificamente em relação a estes dois últimos genes, resultados conflitantes foram observados entre as duas metodologias. Os resultados da CGH-array mostraram perda do BAC que contém a seqüência do gene *S100A4* em um subgrupo de amostras dos grupos I e II e ganho do BAC contendo a seqüência do *TOP2A* em um subgrupo de amostras dos três grupos estudados. Em desacordo com esses resultados, a HR-CGH revelou ganho da região 1q21.2 (*S100A4*) em um subgrupo de amostras dos grupos I, II e III e perda em outro subgrupo de amostras dos grupos I e III, enquanto que para a região 17q12-21 (*TOP2A*) foram detectadas perdas para a maioria das amostras dos três grupos e apenas a amostra P29 (grupo II) apresentou ganho. Esse conflito nos resultados revelados por essas metodologias também foi um dos motivos que levou a escolha desses genes para a validação, na tentativa de elucidar qual seria o comportamento destes genes num número maior de amostras. A análise dos transcritos de *S100A4* mostrou que 51% dos tumores apresentaram níveis dentro dos limites normais de expressão, sendo que a porcentagem de casos com aumento (22%) e diminuição (27%) dos transcritos foi semelhante. O subgrupo de pacientes com níveis mais altos do gene apresentaram associação com características de pior prognóstico, bem como com tumores com invasão extra-prostática. Esses resultados sugerem que o aumento da expressão de *S100A4* estaria relacionado à maior capacidade invasiva das células tumorais. O conjunto dos resultados reforça a hipótese de que níveis diminuídos do gene decorrentes, por exemplo, da deleção de pelo menos um alelo, estariam relacionados às características de bom prognóstico. Com relação ao gene *TOP2A*, a análise de expressão por qRT-PCR revelou o aumento de *TOP2A* em 84% das amostras de CaP avaliadas, sendo que 41% apresentou alto nível de expressão (QR>10). Nossos resultados mostraram que os níveis mais altos de *TOP2A* nos tumores primários estão associados aos maiores escores de Gleason, sugerindo que este gene pode estar envolvido com o caráter mais agressivo dos tumores de próstata.

De acordo com os resultados apresentados nesse estudo podemos concluir que a HR-CGH se mostrou uma ferramenta útil na triagem das alterações genômicas do câncer de próstata e suas metástases. Estes resultados associados aos obtidos da análise de CGH-array tornou possível a seleção de genes candidatos como marcadores tumorais e de progressão da

doença, que revelaram resultados interessantes e até promissores. Nossos resultados sugerem que os genes *ARID1A* e *TOP2A* poderiam ser utilizados como ferramenta diagnóstica para detecção de tumores com caráter mais agressivo, e com isso, permitir uma conduta clínica mais adequada nestes casos. Para isso, os resultados de expressão de mRNA deverão ser confirmados pela análise da expressão da proteína por imunohistoquímica, o que pode ser futuramente aplicado facilmente como método diagnóstico. O aumento da casuística, principalmente de pacientes acompanhados por períodos mais longos, poderá contribuir para estabelecer o papel dos genes avaliados nesse estudo na progressão dos carcinomas de próstata. A presença de outros genes mapeados nas regiões cromossômicas estudadas (principalmente em 1q21.2 e 17q21.3) e em outras regiões levantadas como relevantes na análise de HR-CGH (como por exemplo 6p12) devem estar envolvidos e deverão ser investigados. Vale ainda considerar que, além de seqüências gênicas, essas regiões cromossômicas alteradas podem conter seqüências que codificam microRNAs (miRNAs), que poderiam ser importantes na regulação da expressão de genes relacionados com a carcinogênese. Tem sido descritos miRNAs com atividade oncogênica e outros com atividade supressora. A importância dessas moléculas na carcinogênese pode ser avaliada pelo crescente número de relatos na literatura associando os miRNAs, o desenvolvimento e progressão de diferentes tumores (para revisão Schickel et al, 2008). Estudos têm demonstrado que boa parte dos miRNAs conhecidos estão localizados em regiões cromossômicas instáveis associadas com o câncer (Calin et al., 2004) e que grande parte das regiões genômicas envolvidas em alterações do número de cópias de DNA contem genes que codificam miRNAs (Zhang et al., 2006b). Assim, o presente estudo abre novas perspectivas para pesquisas futuras, que poderão auxiliar na compreensão dos eventos relacionados ao câncer de próstata.

REFERÊNCIAS

- Afonso A, Emmert-Buck MR, Duray PH, Bostwick DG, Linehan WM, Vocke CD. Loss of heterozygosity on chromosome 13 is associated with advanced stage prostate cancer. *Urol. Sep*;162(3 Pt 1):922-6. 1999.
- Agerbaek M, Alsner J, Marcussen N, Lundbeck F, Von der Maase H. Focal S100A4 protein expression is an independent predictor of development of metastatic disease in cystectomized bladder cancer patients. *Eur Urol. Oct*;50(4):777-85. 2006.
- Ai KX, Lu LY, Huang XY, Chen W, Zhang HZ. Prognostic significance of S100A4 and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol. Mar 28*;14(12):1931-5. 2008.
- Alberti C. Genetic and microenvironmental implications in prostate cancer progression and metastasis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci. May-Jun*;12(3):167-75. 2008
- Alberti I, Barboro P, Barbesino M, Sanna P, Pisciotta L, Parodi S, Nicolò G, Boccardo F, Galli S, Patrone E, Balbi C. Changes in the expression of cytokeratins and nuclear matrix proteins are correlated with the level of differentiation in human prostate cancer. *J Cell Biochem. Sep 7*;79(3):471-85. 2000.
- Albertson DG, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet*, 12:R145-152, 2003.
- Alcaraz A, Takahashi S, Brown JA, Herath JF, Bergstralh EJ, Larson-Keller JJ, Lieber MM, Jenkins RB. Aneuploidy and aneusomy of chromosome 7 detected by fluorescence *in situ* hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Res*, 54: 3998-4002, 1994.
- Alers JC, Krijtenburg P-J, Vis AN, Hoedemaeker RF, Wildhagen MF, Hop WCJ, van der Kwast TH, Schröder FH, Tanke HJ, van Dekken H. Molecular cytogenetic analysis of prostatic adenocarcinomas from screening studies: early cancers may contain aggressive genetic features. *Am J Pathol* 158: 399-406, 2001.
- Alers JC, Rochat J, Krijtenburg P-J, Hop WCJ, Kranse R, Rosenberg C, Tanke HJ, Schroder FH, van Dekken H. Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Lab Invest* 80: 931-942, 2000.
- Ambrosio E, Silveira C, Silveira S, Carvalho A, Soares F, Domingues MA, Kowalski L, Rogatto S. Biological significance of S100A4 amplification expression at RNA and protein level in oral cavity squamous cells carcinoma. *Oral Oncol Suppl*, 2: 207, 2007.
- Andrieux J. Array-CGH for routine diagnosis of cryptic chromosomal imbalances. *Pathol Biol (Paris)*. Sep;56(6):368-74. 2008
- Antunes AA, Srougi M, Dall'Oglio MF, Crippa A, Paranhos M, Cury J, et al. Microvascular invasion is an independent prognostic factor in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *International Braz J Urol*. 32: 668- 77. 2006;

- Arason A, Barkardottir RB, Egilsson V. Linkage analysis of chromosome 17q markers and breast-ovarian cancer in Icelandic families, and possible relationship to prostatic cancer. *Am J Hum Genet*, 52: 711-717, 1993.
- Arps S, Rodewald A, Schmalenberger B, Carl P, Bressel M, Kastendieck H. Cytogenetic survey of 32 cancers of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, 66: 93-99, 1993.
- Arriola E, Marchio C, Tan DS, Drury SC, Lambros MB, Natrajan R, Rodriguez-Pinilla SM, Mackay A, Tamber N, Fenwick K, Jones C, Dowsett M, Ashworth A, Reis-Filho JS. Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines. *Lab Invest*. May;88(5):491-503. 2008
- Atkin NB, Baker MC. Chromosome study of five cancers of the prostate. *Hum Genet*, 70: 359-364, 1985.
- Ayhan A, Yasui W, Yokozaki H, Kitadai Y, Tahara E. Reduced expression of nm23 protein is associated with advanced tumor stage and distant metastases in human colorectal carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 63:213-218, 1993.
- Bai J, Sata N, Nagai H. Gene expression analysis for predicting gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer patients. *HPB (Oxford)*. 9(2):150-5. 2007.
- Beheshti B, Vukovic B, Marrano P, Squire JA, Park PC. Resolution of genotypic heterogeneity in prostate tumors using polymerase chain reaction and comparative genomic hybridization on microdissected carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia foci. *Cancer Genet Cytogenet* 137: 15-22, 2002.
- Berney CR, Fisher RJ, Yang J, Russell PJ, Crowe PJ. Protein markers in colorectal cancer: predictors of liver metastasis. *Ann Surg*, 230:179-184, 1999.
- Bettendorf O, Schmidt H, Staebler A, Grobholz R, Heinecke A, Boecker W, Hertle L, Semjonow A. Chromosomal imbalances, loss of heterozygosity, and immunohistochemical expression of TP53, RB1, and PTEN in intraductal cancer, intraepithelial neoplasia, and invasive adenocarcinoma of the prostate. *Genes Chromosomes Cancer*. Jul;47(7):565-72. 2008.
- Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS. Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res*, 49:5185-5190, 1989.
- Bhargava R, Lal P, Chen B, HER-2/neu and topoisomerase IIa gene amplification and protein expression in invasive breast carcinomas: chromogenic in situ hybridization and immunohistochemical analyses, *Am. J. Clin. Pathol*. 123: 889–895, 2005.
- Bostwick DG, & Dundore PA. **Biopsy Pathology of the Prostate**. Chapman & Hall Medical, London, 1997.
- Bova GS; Carte BS; Bussemarks, MJG, Emi M; Fujiwara Y; Kyprianou N; et al. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res*, 53:3869-73, 1993.
- Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, et al. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res*.60:6111–15. 2000.

- Brandes, D; Kirchleim, D e Scott, W. Ultrastructure of the human prostate: Normal and neoplastic. *Lab Invest.* 13: 1541, 1964.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2008. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 10 nov. 2008.
- Brewster SF, Browne S, Brown KW. Somatic allelic loss at the DCC, APC, nm23-H1 and p53 tumor suppressor gene loci in human prostatic carcinoma. *J Urol*, 151: 1073-1077, 1994.
- Brookman-Amisshah N, Duchesnes C, Williamson MP, Wang Q, Ahmed A, Feneley MR, Mackay A, Freeman A, Fenwick K, Iravani M, Weber B, Ashworth A, Masters JR. Genome-wide screening for genetic changes in a matched pair of benign and prostate cancer cell lines using array CGH. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 8:335-343, 2005.
- Brothman AR, Peehl DM, Patel AM, MacDonald GR, McNeal JE, Ladaga LE, Schellhammer PF. Cytogenetic evaluation of 20 cultured primary prostatic tumours. *Cancer Genet Cytogenet*, 55:79-84, 1991.
- Bruder CE, Hirvelä C, Tapia-Paez I, Fransson I, Segraves R, Hamilton G, Zhang XX, Evans DG, Wallace AJ, Baser ME, Zucman-Rossi J, Hergersberg M, Boltshauser E, Papi L, Rouleau GA, Poptodorov G, Jordanova A, Rask-Andersen H, Kluwe L, Mautner V, Sainio M, Hung G, Mathiesen T, Möller C, Pulst SM, Harder H, Heiberg A, Honda M, Niimura M, Sahlén S, Blennow E, Albertson DG, Pinkel D, Dumanski JP. High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. *Hum Mol Genet*, 10:271-282, 2001.
- Buratti E, Brindisi A, Giombi M, Tisminetzky S, Ayala YM, et al. TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J Biol Chem* 280: 37572–84. 2005.
- Cabezón T, Celis JE, Skibshoj I, Klingelhöfer J, Grigorian M, Gromov P, Rank F, Myklebust JH, Maeldandsmo GM, Lukanidin E, Ambartsumian N. Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer. *Int J Cancer*, Oct 1;121(7):1433-44. 2007.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2999–3004. 2004.
- Camp NJ, Tavtigian SV.. Meta-analysis of associations of the Ser217Leu and Ala541Thr variants in ELAC2 (HPC2) and prostate cancer. *Am J Hum Genet* 71:1475–1478. 2002.
- Cardoso F, Durbecq V, Larsimont D, Paesmans M, Leroy J Y, Rouas G, Sotiriou G, Renard N, Richard V, Piccart M J, Di Leo A, Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase IIalpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer, *Int. J. Oncol.* 24:201–209, 2004.

- Carinci F, Arcelli D, Lo Muzio L, Francioso F, Valentini D, Evangelisti R, Volinia S, D'Angelo A, Meroni G, Zollo M, Pastore A, Ionna F, Mastrangelo F, Conti P, Tetè S. Molecular classification of nodal metastasis in primary larynx squamous cell carcinoma. *Transl Res*. Oct;150(4):233-45. 2007.
- Chaudhary J, Schmidt M. The impact of genomic alterations on the transcriptome: a prostate cancer cell line case study. *Chromosome Res*, 14:567-586, 2006.
- Chekerov R, Klamann I, Zafrakas M, Könsgen D, Mustea A, Petschke B, Lichtenegger W, Sehoul J, Dahl E. Altered expression pattern of topoisomerase IIalpha in ovarian tumor epithelial and stromal cells after platinum-based chemotherapy. *Neoplasia*. Jan;8(1):38-45. 2006.
- Chen C, Bhalala HV, Vessella RL, Dong JT. KLF5 is frequently deleted and down-regulated but rarely mutated in prostate cancer. *Prostate*. May 1;55(2):81-8. 2003.
- Chen C, Lamharzi N, Weiss NS, Etzioni R, Dightman DA, Barnett M, DiTommaso D, Goodman G. Androgen receptor polymorphisms and the incidence of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11: 1033-1040, 2002.
- Chen XL, Zhang WG, Chen XY, Sun ZM, Liu SH. Correlations of S100A4 protein expression to invasion and metastasis of non-small cell lung cancer. *Ai Zheng*, 25: 1134-7, 2006.
- Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Pin SS, Epstein JI, Isaacs WB, Jensen RH. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res*, 56:3091-3102, 1996.
- Cher ML, Ito T, Weidner N, Carroll PR, Jensen RH. Mapping of regions of physical deletion on chromosome 16q in prostate cancer cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Urol*, 153:249-254, 1995.
- Cher ML, MacGrogan D, Bookstein R, Brown JA, Jenkins RB, Jensen RH. Comparative genomic hybridization, allelic imbalance, and fluorescence in situ hybridization on chromosome 8 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 11: 153-162, 1994.
- Cho YG, Kim CJ, Nam SW, Yoon SH, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Overexpression of S100A4 is closely associated with progression of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. Aug 21;11(31):4852-6. 2005.
- Cho YG, Nam SW, Kim TY, Kim YS, Kim CJ, Park JY, Lee JH, Kim HS, Lee JW, et al. Overexpression of S100A4 is closely related to the aggressiveness of gastric cancer. *APMIS*, 111: 539 -545, 2003.
- Chu LW, Pettaway CA, Liang JC. Genetic abnormalities specifically associated with varying metastatic potential of prostate cancer cell lines as detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 127: 161–167, 2001.
- Chu LW, Troncoso P, Johnston DA, Liang JC. Genetic markers useful for distinguishing between organ-confined and locally advanced prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 36:303-312, 2003.
- Clark J, Edwards S, Feber A, Flohr P, John M, Giddings I, Crossland S, Stratton MR, Wooster R, Campbell C, Cooper CS. Genome-wide screening for complete genetic loss in prostate

- cancer by comparative hybridization onto cDNA microarrays. *Oncogene* 22: 1247-52, 2003.
- Coon J S, Marcus E, Gupta-Burt S, Seelig S, Jacobson K, Chen S, Renta S, Fronda G, Preisler H D, Amplification and overexpression of topoisomerase IIalpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 8: 1061–1067, 2002.
- Cooney KA, Wetzel JC, Merajver SD, Macoska JA, Singleton TP, Wojno KJ. Distinct regions of allelic loss on 13q in prostate cancer. *Cancer Res*, 56: 1142-1145, 1996.
- Cross SS, Hamdy FC, Deloulme JC, Rehman I. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology*, 46:256-269, 2005.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Ricke WA. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer*, 107 :1-10. 2003.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation*. Dec;70(9-10):473-85. Review. 2002.
- Curtis CD, Likhite VS, McLeod IX, Yates JR, Nardulli AM. Interaction of the tumor metastasis suppressor nonmetastatic protein 23 homologue H1 and estrogen receptor alpha alters estrogen-responsive gene expression. *Cancer Res*. Nov 1;67(21):10600-7. 2007.
- Cybulski C, Huzarski T, Gorski B, et al.. A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res*;64:2677–9. 2004.
- Dallas PB, Pacchione S, Wilsker D, Bowrin V, Kobayashi R, Moran E. The human SWI/SNF complex protein p270 is an ARID family member with nonsequence-specific DNA binding activity. *Mol Cell Biol*, 20:3137-3146, 2000.
- Davidsson J, Collin A, Olsson ME, Lundgren J, Soller M. Deletion of the SCN gene cluster on 2q24.4 is associated with severe epilepsy: An array-based genotype-phenotype correlation and a comprehensive review of previously published cases. *Epilepsy Res*. Sep;81(1):69-79. 2008.
- Davies BR, Davies MP, Gibbs FE, Barraclough R, Rudland PS. Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9Ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene EJ-ras-1. *Oncogene*, 8:999-1008, 1993.
- Davies BR, O'Donnell M, Durkan GC, Rudland PS, Barraclough R, Neal DE, Mellon JK. Expression of S100A4 protein is associated with metastasis and reduced survival in human bladder cancer. *J Pathol*, 196:292-299, 2002.
- De Pinieux G, Flam T, Zerbib M, Taupin P, Bellahcène A, Waltregny D, Vieillefond A, Poupon MF. Bone sialoprotein, bone morphogenetic protein 6 and thymidine phosphorylase expression in localized human prostatic adenocarcinoma as predictors of clinical outcome: a clinicopathological and immunohistochemical study of 43 cases. *J Urol*. Nov;166(5):1924-30. 2001.

- DeCristofaro MF, Betz BL, Rorie CJ, Reisman DN, Wang W, Weissman BE. Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies. *J Cell Physiol*, 186:136-145, 2001.
- DeMarzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 7: 256-269, 2007.
- DeMarzo, A.m.; Nelson, W.G.; Isaacs, W.B.; Epstein, J.I. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *The Lancet*. 361: 955-64, 2003.
- Doak SH, Jenkins SA, Hurle RA, Varma M, Hawizy A, Kynaston HG, Parry JM. Bone morphogenic factor gene dosage abnormalities in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. Jul 15;176(2):161-5. 2007.
- Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, 60:540-551, 2003.
- Dong X, Wang L, Taniguchi K, et al.. Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet*. 72:270–80. 2003.
- Durbecq V, Paesmans M, Cardoso F, Desmedt C, Di Leo A, Chan S, Friedrichs K, Pinter T, Van Belle S, Murray E, Bodrogi I, Walpole E, Lesperance B, Korec S, Crown J, Simmonds P, Perren T J, Leroy J Y, Rouas G, Sotiriou C, Piccart M, Larsimont D, Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel, *Mol. Cancer Ther*. 3:1207–1214, 2004.
- Dursun A, Akyurek N, Gunel N, Yamac D. Prognostic implication of Nm23-H1 expression in colorectal carcinoma. *Pathology*, 34:427-432, 2002.
- Dutt N, Bates AW, Baithun SI. Secondary neoplasms of the male genital tract with different patterns of involvement in adults and children. *Histopathology*, 37: 323-331, 2000.
- Eagle LR, Yin X, Brothman AR, Williams BJ, Atkin NB, Prochownik EV. 1995. Mutation of the MX11 gene in prostate cancer. *Nat Genet* 9:249 –255.
- Emmert- Buck, Mr; Vocke, CD; Pozzatti, RO; Duray, PH; Jennings, SB; Florence, CD; Zhuang, Z; Bostwick, DG; Liotta, La; Linehan, WM. Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res*, 55:2959-62, 1995.
- Engel M, Seifert M, Theisinger B, Seyfert U, Welter C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and nm23-H1/nucleoside diphosphate kinase A. Two old enzymes combine for the novel Nm23 protein phosphotransferase function. *J Biol Chem*, 273:20058-20065, 1998.
- Ensembl. Cambridge, U K. European Bioinformatics Institute (EBI) - European Molecular Biology Laboratory (EMBL) e Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), 2008 (revisado em: nov. 2008). Disponível em: <http://www.ensembl.org/>. Acesso em: 26 nov. 2008.
- Epstein JI, Algaba F, Allsbrook Jr WC, Bastacky S, Boccon-Gibod L, De Marzo AM, et al. Tumours of the prostate: Acinar adenocarcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World health organization classification of tumours - **Pathology and**

- genetics of tumours of the urinary system and male genital organs.** Lyon: IARC;. p. 159-92. 2004.
- Epstein JI, Allsbrook-Jr WC, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol.*; 29: 1228-42. 2005a.
- Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, Egevad L, Humphrey PA, Mikuz G, et al. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl.*; 216: 34-63. 2005b.
- Fan S, Meng Q, Auburn K, Carter T e Rosen EM. *BRCA1* and *BRCA2* as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer cells. *British Journal of Cancer.* 94, 407 – 426. 2006.
- Feng Q, Deftereos G, Hawes SE, Stern JE, Willner JB, Swisher EM, Xi L, Drescher C, Urban N, Kiviat N. DNA hypermethylation, Her-2/neu overexpression and p53 mutations in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* Nov;111(2):320-9. 2008.
- Ferrari D, Lombardi M, Ricci R, Michiara M, Santini M, De Panfilis G. Dermatopathological indicators of poor melanoma prognosis are significantly inversely correlated with the expression of NM23 protein in primary cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol.* Sep;34(9):705-12. 2007.
- Foster LS, Jajodia P, Fournier G Jr, et al: The value of prostate specific antigen and transrectal ultrasound guided biopsy in detecting prostatic fossa recurrences following radical prostatectomy. *J Urol*;149:1024–1028.1993.
- Fritz P, Cabrera C M, Dippon J, Gerteis A, Simon W, Aulitzky W E, van der Kuip H, c-erbB2 and topoisomerase IIalpha protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study, *Breast Cancer Res.* 7:374–384, 2005.
- Fu W, Bubendorf L, Willi N, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G, Gasser TC. Genetic changes in clinically organ-confined prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Urology* 56: 880-885, 2000.
- Fu Z, Kitagawa Y, Shen R, Shah R, Mehra R, Rhodes D, Keller PJ, Mizokami A, Dunn R, Chinnaiyan AM, Yao Z e Keller ET. Metastasis Suppressor Gene Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) Is a Novel Prognostic Marker in Prostate Cancer. *The Prostate.* 66:248-256. 2006.
- Garinis GA, Manolis EN, Spanakis NE, Patrinos GP, Peros G, Menounos PG. High frequency of concomitant nm23-H1 and e-cadherin transcriptional inactivation in primary non-inheriting colorectal carcinomas. *J Mol Med,* 81: 256-263, 2003.
- Gleason, DF. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma, *In: Urologic pathology: The prostate*, Tannenbaum, M; Lea e Febiger, Philadelphia, 1977.
- Gongoll S, Peters G, Mengel M, Piso P, Klemptner J, Kreipe H, von Wasielewski R. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer. *Gastroenterology,* 123:1478-1484, 2002.

- Grignon, DJ; Ro, JY; Ordoñez, NG; Ayala, AG e Cleary, KR. Basal cell hyperplasia, adenoid basal cell tumor, and adenoid cystic carcinoma of the prostate gland: an immunohistochemical study. *Hum Pathol*. 19:1425-1433,1988.
- Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem*, 276:22699-708, 2001.
- Grigorian M, Tulchinsky E, Burrone O, Tarabykina S, Georgiev G, Lukanidin E. Modulation of mts1 expression in mouse and human normal and tumor cells. *Electrophoresis*, 15:463-8, 1994.
- Grigorian MS, Tulchinsky EM, Zain S, Ebralidze AK, Kramerov DA, Kriajevska MV, Georgiev GP, Lukanidin EM. The mts1 gene and control of tumor metastasis. *Gene*,135:229-38, 1993.
- Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Berg CH, El-Naaman C, Grigorian M, Lukanidin E, Ambartsumian N. Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the *S100A4(mts1)* gene. *Cancer Res*, 65: 3772-3780, 2005.
- Grupta S, Hussain T, MacLennan GT, Fu P, Patel J, Mukhtar H. Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 21:106-112, 2003.
- Haapala K, Kuukasjaervi T, Hyytinen E, Rantala I, Helin HJ, Koivisto PA, Androgen receptor amplification is associated with increased cell proliferation in prostate cancer. *Human Pathology* Mar;38(3):474-8. 2007.
- Haapala K, Rökman A, Palmberg C, Hyytinen ER, Laurila M, Tammela TLJ, Koivisto PA. Chromosomal changes in locally recurrent, hormone-refractory prostate carcinomas by karyotyping and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 131: 74-78, 2001.
- Hancq S, Salmon I, Brotchi J, De Witte O, Gabius HJ, Heizmann CW, Kiss R, Decaestecker C. S100A5: A marker of recurrence in WHO grade I meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30:178-187, 2004.
- Hanks, G.E.; Myers, C.E.; Scardino, P.T. Câncer of the prostate. In: **Câncer: Principles & Practice of Oncology**, 4^a ed., edited by Vincent T. DeVita Jr, Smuel Hellman, Steven A. Rosenberg. J.b. Lipcott Co, 1993.
- He WW; Sciavolino PJ; Wing J; Augustus M; Hudson P; Meissner PS et al.. A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. *Genomics*, 43:69-77, 1997.
- Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: Structure, functions and pathology. *Front Biosci*, 7:1356-1368, 2002.
- Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer*, 92:1955-1958, 2005.

- Hemandas AK, Salto-Tellez M, Maricar SH, Leong AF, Leow CK. Metastasis-associated protein S100A4--a potential prognostic marker for colorectal cancer. *J Surg Oncol*; 93:498-503, 2006.
- Herlyn, M e Malkowicz, SB. Regulatory pathways in tumor growth and invasion. *Lab. Invest.*, 65, 262–271. 1991.
- Hermans KG, van Alewijk DC, Veltman JA, van Weerden W, van Kessel AG, Trapman J. Loss of a small region around the PTEN locus is a major chromosome 10 alteration in prostate cancer xenografts and cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 39: 171-84, 2004.
- Hill R, Song Y, Cardiff RD e Van Dyke T. Heterogeneous Tumor Evolution Initiated by Loss of pRb Function in a Preclinical Prostate Cancer Model. *Cancer Res*; 65(22): 10243-54, 2005.
- Holcomb IN, Grove DI, Kinnunen M, Friedman CL, Gallaher IS, Morgan TM, Sather CL, Delrow JJ, Nelson PS, Lange PH, Ellis WJ, True LD, Young JM, Hsu L, Trask BJ, Vessella RL. Genomic alterations indicate tumor origin and varied metastatic potential of disseminated cells from prostate cancer patients. *Cancer Res*. Jul 15;68(14):5599-608. 2008.
- Huang SF, Xiao S, Renshaw AA, Loughlin KR, Hudson TJ, Fletcher JA. Fluorescence in situ hybridization evaluation of chromosome deletion patterns in prostate cancer. *Am J Pathol*, 149: 1565-1573, 1996.
- Huang SF, Xiao S, Renshaw AA, Loughlin KR, Hudson TJ, Fletcher JA. Fluorescence in situ hybridization evaluation of chromosome deletion patterns in prostate cancer. *Am J Pathol*, 149: 1565-1573. 1996.
- Hughes C, Murphy A, Martin C, et al. Topoisomerase II-a expression increases with increasing Gleason score and with hormone insensitivity in prostate carcinoma. *J Clin Pathol*;59:721–4. 2006.
- Hui AB, Lo KW, Teo PM, To KF, Huang DP. Genome wide detection of oncogene amplifications in nasopharyngeal carcinoma by array based comparative genomic hybridization. *Int J Oncol*, 20:467-473, 2002.
- Hui AB, Lo KW, Yin XL, Poon WS, Ng HK. Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest*, 81:717-723, 2001.
- Hukku B, Mally M, Cher ML, Peehl DM, Kung H, Rhim JS. Stepwise genetic changes associated with progression of nontumorigenic HPV-18 immortalized human prostate cancer-derived cell line to a malignant phenotype. *Cancer Genet Cytogen* 120: 117-126, 2000.
- Husemann, Y. et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13, 58–68 2008.
- Huusko P, Ponciano-Jackson D, Wolf M, Kiefer JA, Azorsa DO, Tuzmen S, et al. 2004. Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer. *Nat Genet* 36:979–983.
- Igawa M, Rukstalis D B, Tanabe T and Chodak G W. High-levels of nm23 expression are related to cell proliferation in human prostate cancer. *Cancer Res.*, 54: 1313, 1994

- Ijjin K, Wolf M, Edgren H, Drupta S, Kilpinen S, Skotheim RI, Peltola M, Smit F, Verhaegh G, Schalken J, Nees M, Kallioniemi O. TMPRSS2 fusions with oncogenic EST factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res*, 66:10242-10246, 2006.
- Inoue H, Furukawa T, Giannakopoulos S, Zhou S, King DS, Tanese N. Largest subunits of the human SWI/SNF chromatin-remodeling complex promote transcriptional activation by steroid hormone receptors. *J Biol Chem*, 277:41674-41685, 2002.
- Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol*. 145:1301-8, 1994.
- Ittmann M. Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res*, 56: 2143-2147, 1996.
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*, 110: 341-350, 2002.
- Jarrard DF, Sarkar S, Shi Y, Yeager TR, Magrane G, Kinoshita H, Nassif N, Meisner L, Newton MA, Waldman FM, Reznikoff CA. p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells. *Cancer Res*, 59: 2957-2964, 1999.
- Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res*, 57:524-531, 1997.
- Jenkinson SR, Barraclough R, West CR, Rudland PS. S100A4 regulates cell motility and invasion in an in vitro model for breast cancer metastasis. *Br J Cancer*, 90:253-262, 2004.
- Jiang M, Li M, Fu X, Huang Y, Qian H, Sun R, Mao Y, Xie Y, Li Y. Simultaneously detection of genomic and expression alterations in prostate cancer using cDNA microarray. *Prostate*. Mar 25. 2008.
- Joos S, Bergerheim USR, Pan Y, Matsuyama H, Bentz M, du Manoir S, Lichter P. Mapping of chromosomal gains and losses in prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 14: 267-276, 1995.
- Jorgenson E, Deitcher SR, Cicek M, Liu X, Plummer S, Casey G, Witte JS. Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) polymorphism 4G/5G is associated with prostate cancer among men with a positive family history. *Prostate*. Feb 1;67(2):172-7. 2007
- Kanayama H, Takigawa H, Kagawa S. Analysis of nm23 gene expression in human bladder and renal carcinomas. *Int J Urol*, 1: 324-331, 1994.
- Kasahara K, Taguchi T, Yamasaki I, Kamada M, Shuin T. Genetic changes in localized prostate cancer of Japanese patients shown by comparative genomic hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 159: 84-88. 2005.
- Kasahara K, Tagushi T, Yamasaki Y, Kamada M, Yuri K, Shuin T. Detection of genetic alterations in advanced prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 137: 59-63, 2002.

- Keith WN, Tan KB, Brown R. Amplification of the topoisomerase II alpha gene in a non-small cell lung cancer cell line and characterisation of polymorphisms at the human topoisomerase II alpha and beta loci in normal tissue. *Genes Chromosomes Cancer* ;4:169-75, 1992.
- Kempski HM, Austin N, Chatters SJ, Toomey SM, Chalker J, Anderson J, Sebire NJ. Previously unidentified complex cytogenetic changes found in a pediatric case of solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas. *Cancer Genet Cytogenet*, 164:54-60, 2006.
- Khan MH, Yasuda M, Higashino F, Haque S, Kohgo T, Nakamura M, Shindoh M. Nm23-H1 suppresses invasion of oral squamous cell carcinoma-derived cell lines without modifying matrix metalloproteinase-9 expression. *Am J Pathol*, 158:1785-1791, 2001.
- Kikuchi N, Horiuchi A, Osada R, Imai T, Wang C, Chen X, Konishi I. Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: an important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Sci*; 97: 1061-1069, 2006.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J et al. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer* 25:410-413, 1999.
- Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 38: 740-744, 2001.
- Knoop A S, Knudsen H, Balslev E, Rasmussen B B, Overgaard J, Nielsen K V, Schonau A, Gunnarsdóttir A, Olsen K E, Mouridsen H, Ejlertsen B, Danish Breast Cancer Cooperative Group: retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group, *J. Clin. Oncol.* 23 7483–7490, 2005.
- Kodera Y, Isobe K, Yamauchi M, Kondoh K, Kimura N, Akiyama S, Itoh K, Nakashima I, Takagi H. Expression of nm23 H-1 RNA levels in human gastric cancer tissues. A negative correlation with nodal metastasis. *Cancer*, 73:259–265, 1994.
- Koff WJ, Pompeo ACL, Damião R, Carrerette FB, editors. **Diretrizes em urooncologia**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Urologia; 2005. 261p.
- Konig JJ, Teubel W, Romijn JC, Schroder FH, Hagemeyer A. Gain and loss of chromosome 1, chromosome 7, chromosome 8, chromosome 10, chromosome 18, and chromosome Y in 46 prostate cancers. *Hum Pathol*, 27:720-727, 1996.
- Konishi N, Nakaoka S, Tsuzuki T et al.. Expression of nm23-H1 and nm23-H2 proteins in prostate carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 84: 1050–54. 1993.
- Kosari F, Munz JM, Savci-Heijink CD, Spiro C, Klee EW, Kube DM, Tillmans L, Slezak J, Karnes RJ, Chevillat JC, Vasmatzis G. Identification of prognostic biomarkers for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* Mar 15;14(6):1734-43. 2008.

- Kraus J, Pantel K, Pinkel D, Albertson DG, Speicher MR. High-resolution genomic profiling of occult micrometastatic tumor cells. *Genes Chromosomes Cancer* 36: 159-66, 2003.
- Langston, A. A.; Stanford, J. L.; Wicklund, K. G.; Thompson, J. D.; Blazej, R. G.; Ostrander, E. A. Germ-line BRCA1 mutations in selected men with prostate cancer. *Am J Hum Genet*, 58: 881-885, 1996.
- Lapointe J, Higgins JP et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 811-6, 2004.
- Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, Ferrari M, Hernandez-Boussard T, Brooks JD, Pollack JR Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 67: 8504-10, 2007.
- LeDuc, IE. The anatomy of the prostate and the pathology of early benign hypertrophy. *J Urol*, 42:1217, 1939.
- Lee JH, Cho SJ, Zhang X, Zheng Z, Lee ES, Kim A, Kim YS, Chae YS, Kim I. Nm23-H1 protein expression and gene mutation in 150 patients with non-hodgkin's lymphomas. *J Korean Med Sci*, 21:645-651, 2006.
- Lee, Y.-G.; Macoska, J. A.; Korenchuk, S.; Pienta, K. J. MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. *Neoplasia* 4: 291-294, 2002.
- Li C, Larsson C, Futreal A, Lancaster J, Phelan C, Aspenblad U, Sundelin B, Liu Y, Ekman P, Auer G, et al. Identification of two distinct deleted regions on chromosome 13 in prostate cancer. *Oncogene*, 16: 481-487, 1998.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275:1943-1947, 1997.
- Liu SJ, Sun YM, Tian DF, He YC, Zeng L, He Y, Ling CQ, Sun SH. Downregulated NM23-H1 expression is associated with intracranial invasion of nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer*. Jan 29;98(2):363-9. 2008.
- Liu W, Chang B, Sauvageot J, Dimitrov L, Gielzak M, Li T, Yan G, Sun J, Sun J, Adams TS, Turner AR, Kim JW, Meyers DA, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J. Comprehensive assessment of DNA copy number alterations in human prostate cancers using Affymetrix 100K SNP mapping array. *Genes Chromosomes Cancer*. Nov;45(11):1018-32. 2006.
- Loberg RD, Neeley CK, Adam-Day LL, Fridman Y, St John LN, Nixdorf S, Jackson P, Kalikin LM, Pienta KJ. Differential expression analysis of MIM (MTSS1) splice variants and a functional role of MIM in prostate cancer cell biology. *Int J Oncol*. Jun;26(6):1699-705. 2005.
- Lundgren R, Mandahl N, Heim S, Limon J, Henrikson H, Mitelman F. Cytogenetic analysis of 57 primary prostatic adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 4: 16-24, 1992.
- Macoska JA, Micale MA, Sakr WA, Benson PD, Wolman SR. Extensive genetic alterations in prostate cancer revealed by dual PCR and FISH analysis. *Genes Chromosomes Cancer*, 8: 88-97, 1993.

- Macoska JA, Trybus TM, Sakr WA, Wolf MC, Benson PD, Powell IJ, Pontes JE. Fluorescence in situ hybridization analysis of 8p allelic loss and chromosome 8 instability in human prostate cancer. *Cancer Res*, 54: 3824-3830, 1994.
- Macri E e Loda M. Role of p27 in prostate carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 17: 337-344, 1999.
- Mantripragada KK, Buckley PG, de Stahl TD, Dumanski JP. Genomic microarrays in the spotlight. *Trends Genet*, 20:87-94, 2004.
- Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 1;322(4):1111-22. 2004.
- Masuda H, Fukabori Y, Nakano K, Takezawa Y, CSuzuki T, Yamanaka H. Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer. *Prostate*. Mar 1;54(4):268-74. 2003.
- Matsumoto K, Irie A, Satoh T, Ishii J, Iwabuchi K, Iwamura M, Egawa S, Baba S. Expression of S100A2 and S100A4 predicts for disease progression and patient survival in bladder cancer. *Urology*. Sep;70(3):602-7. 2007.
- Matsuura H, Shiraishi T, Yatani R, Kawamura J. Interphase cytogenetics of prostate cancer: fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of Japanese cases. *Br J Cancer*, 74: 1699-1704, 1996.
- Matsuyama H, Pan Y, Skoog L, Tribukait B, Naito K, Ekman P, Lichter P, Bergerheim USR. Deletion mapping of chromosome 8p in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*, 9: 3071-3076, 1994.
- Mattfeldt T, Wolter H, Trijic D, Gottfried HW, Kestler HA. Chromosomal regions in prostatic carcinomas studied by comparative genomic hybridization, hierarchical cluster analysis and self-organizing feature maps. *Anal Cell Pathol*, 24: 167-179, 2002.
- Mattila PK, Salminen M, Yamashiro T, Lappalainen P. Mouse MIM, a tissue-specific regulator of cytoskeletal dynamics, interacts with ATP-actin monomers through its C-terminal WH2 domain. *J Biol Chem*. Mar 7;278(10):8452-9. 2003.
- Mazzucchelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol*, 160:7-13, 2002.
- McDonnell TJ, Chari NS, Cho-Vega JH, Troncoso P, Wang X, Bueso-Ramos CE, Coombes K, Brisbay S, Lopez R, Prendergast G, Logothetis C, Do KA. Biomarker expression patterns that correlate with high grade features in treatment naive, organ-confined prostate cancer. *BMC Med Genomics*. Jan 31;1:1. 2008.
- McDonnell TJ, Navone NM, Troncoso P, Pistors LL, Conti C, von Eschenbach AC, Brisbay S, Logothetis CJ. Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer. *J Urol*. Feb;157(2):569-74. 1997.
- McNeal, JE; Redwine, EA; Freiha, FS e Stamey, TA. Zonal distribution of the prostatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 12:897,1988.

- Melamed J, Einhorn JM, Ittmann MM. Allelic loss on chromosome 13q in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res.* Oct;3(10):1867-72. 1997.
- Meng S et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin. Cancer Res.* 10, 8152–8162. 2004.
- Micale MA, Mohamed A, Sakr W, Powell IJ, Wolman SR. Cytogenetics of primary prostatic adenocarcinoma. Clonality and chromosome instability. *Cancer Genet Cytogenet*, 61: 165-73, 1992.
- Min HS, Choe G, Kim SW, Park YJ, Park DJ, Youn YK, Park SH, Cho BY, Park SY. S100A4 expression is associated with lymph node metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid. *Mod Pathol.* Mar 21. 2008.
- Miyoshi Y, Kurosumi M, Kurebayashi J, Matsuura N, Takahashi M, Tokunaga E, Egawa C, Masuda N, Kim SJ, Okishiro M, Yanagisawa T, Ueda S, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S; Collaborative Study Group of Scientific Research of the Japanese Breast Cancer Society. Topoisomerase IIalpha-positive and BRCA1-negative phenotype: association with favorable response to epirubicin-based regimens for human breast cancers. *Cancer Lett.* Jun 8;264(1):44-53. 2008.
- Mondal N e Parvin JD. DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature.* Sep 27;413(6854):435-8. 2001.
- Moorhead Ps, Nowell Pc, Mellman Wj, Battips Dm, Hungerford Da. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*, 20: 613-616, 1960.
- Mostofi, FK e Price Jr, EB. **Tumors of the male genital system, Atlas of tumor pathology**, 2^o Série, Fascículo 8, Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., 1973.
- Mueller A, Schafer BW, Ferrari S, Weibel M, Makek M, Höchli M, Heizmann CW. The calcium-binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity. *J Biol Chem*, 280: 29186-29193, 2005.
- Mueller R E, Parkes R K, Andrulis I, O'Malley F P, Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples, *Genes Chromosomes Cancer* 39: 288–297, 2004.
- Muller, V. et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin. Cancer Res.* 11, 3678–3685. 2005.
- Murphy AJ, Hughes CA, Barrett C, Magee H, Loftus B, O'Leary JJ, Sheils O. Low-level TOP2A amplification in prostate cancer is associated with HER2 duplication, androgen resistance, and decreased survival. *Cancer Res.* Mar 15;67(6):2893-8. 2007.
- Nagl Jr NG, Ptsialou A, Haines DS, Dallas PB, Beck Jr GR, Moran E. The p270 (ARID1A/SMARCF1) subunit of mammalian SWI/SNF-related complexes is essential for normal cell cycle arrests. *Cancer Res*, 65:9236-9244, 2005.
- Nagl NG Jr, Wang X, Patsialou A, Van Scoy M, Moran E. Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control. *EMBO J.* Feb 7;26(3):752-63. 2007.

- Nakagawa Y, Tsumatami K, Kurumatani N, Cho M, Kitahori Y, Konishi N, Ozono S, Okajima E, Hirao Y, Hiasa Y. Prognostic value of nm23 protein expression in renal cell carcinomas. *Oncology*, 55: 370-376, 1998.
- Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, et al. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 294:2563– 2566. 2001.
- National Center for Biotechnology Information – NCBI. Bethesda, U.S. National Library of Medicine; 2008 (revisado em: 23 jul. 2008). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 26 nov. 2008.
- Ness GO, Lybaek H, Houge G. Usefulness of high resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 113:125-136, 2002.
- New York, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center – MSKCC. Prostate nomogram – PSA doubling time. 2007. Disponível em: <http://www.mskcc.org/>. Acesso em: 20 nov.2007.
- Nie Z, Xue Y, Yang D, Zhou S, Deroo BJ, Archer TK, Wang W. A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex. *Mol Cell Biol*, 20:8879-8888, 2000.
- Nielsen KV, Ejlersen B, Møller S, Jørgensen JT, Knoop A, Knudsen H, Mouridsen HT. The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: Update of DBCG trial 89D. *Acta Oncol*. 47(4):725-34. 2008.
- Nikitenko LL, Lloyd BH, Rudland PS, Fear S, Barraclough R. Localisation by in situ hybridisation of S100A4 (p9Ka) mRNA in primary human breast tumour specimens. *Int J Cancer*, 86: 219-228, 2000.
- Ninomiya I, Ohta T, Fushida S, Endo Y, Hashimoto T, Yagi M, Fujimura T, Nishimura G, Tani T, Shimizu K, Yonemura Y, Heizmann CW, Schafer BW, Sasaki T, Miwa K. Increased expression of S100A4 and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*; 18:715-720, 2001.
- Nishio Y, Yamada Y, Kokubo H, Nakamura K, Aoki S, Taki T, Honda N, Nakagawa A, Saga S e Hara K. Prognostic Significance of Immunohistochemical Expression of the Her-2/Neu Oncoprotein in Bone Metastatic Prostate Cancer. *Urology* 68: 110–115, 2006
- Nupponen NN e Visakorpi T. Molecular cytogenetics of prostate cancer. *Microsc Res Tech*. 51: 456-63, 2000.
- Nupponen NN, Hyytinen ER, Kallioniemi AH, Visakorpi T. Genetic alterations in prostate cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. Feb;101(1):53-7. 1998b.
- Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol* 153: 141-148, 1998a
- Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol*, 273: F563-F574, 1997.

- Pan Y, Lui WO, Nupponen N, Larsson C, Isola J, Visakorpi T, Bergerheim US, Kytölä S. 5q11, 8p11, and 10q22 are recurrent chromosomal breakpoints in prostate cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 187-195, 2001.
- Pang ST, Weng WH, Flores-Morales A, Johansson B, Pourian MR, Nilsson P, Pousette A, Larsson C and Norstedt G. Cytogenetic and Expression profiles Associated With Transformation to Androgen-Resistant Prostate Cancer. *The Prostate* .66:157-172. 2006.
- Pantel K e Alix-Panabieres C. The clinical significance of circulating tumor cells. *Nature Clin.Pract. Oncol.* 4, 62–63. 2007.
- Pantel K e Brakenhoff R H. Dissecting the metastatic cascade. *Nature Rev. Cancer.* 4, 448–456. 2004.
- Paris PL, Andaya A, Fridlyand J, Jain NA, Weinberg V, Kowbel D, Brebner JH, Simko J, Watson JEV, Volik S, Albertson DG, Pinkel D, Alers JC, van der Kwast TH, Vissers KJ, Schroder FH, Wildhagen MF, Febbo PG, Chinnaiyan AM, Pienta KJ, Carroll PR, Rubin MA, Collins C, van Dekken H. Whole genome scanning identifies genotypes associated with recurrence and metastasis in prostate tumors. *Hum Molec Genet*, 13:1303-1313, 2004.
- Paris PL, Weinberg V, Simko J, Andaya A, Albo G, Rubin MA, Carroll PR, Collins C. Preliminary evaluation of prostate cancer metastatic risk biomarkers. *Int J Biol Markers*, 20:141-145, 2005.
- Partin AW, Kattan MW, Subong EN, Walsh PC, Wojno KJ, Oesterling JE, et al. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. *Jama.* 227: 1445-51. 1997
- Pasquali D, Rossi V, Staibano S, De Rosa G, Chieffi P, Prezioso D, Mirone V, Mascolo M, Tramontano D, Bellastella A, Sinisi AA. The endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)/prokineticin 1 and 2 and receptor expression in human prostate: Up-regulation of EG-VEGF/prokineticin 1 with malignancy. *Endocrinology.* Sep;147(9):4245-51. 2006.
- Patel SR, Richardson RL, Kvols L. Metastatic cancer to the testes: a report of 20 cases and review of the literature. *J Urol.* Oct;142(4):1003-5. 1989
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 20:207-211, 1998.
- Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, Borell TJ, Herath JF, Lieber MM, Jenkins RB. Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Res*, 55: 5408-5414, 1995.
- Rehman I, Azzouzi AR, Cross SS, Deloulme JC, Catto JW, Wylde N, Larre S, Champigneulle J, Hamdy FC. Dysregulated expression of S100A11 (calgizzarin) in prostate cancer and precursor lesions. *Hum Pathol*, 35:1385-1391, 2004b.

- Rehman I, Cross SS, Azzouzi AR, Catto JW, Deloulme JC, Larre S, Champigneulle J, Fromont G, Cussenot O, Hamdy FC. S100A6 (Calcyclin) is a prostate basal cell marker absent in prostate cancer and its precursors. *Br J Cancer*, 91:739-744, 2004a.
- Rehman I, Cross SS, Catto JW, Leiblich A, Mukherjee A, Azzouzi AR, Leung HY, Hamdy FC. Promoter hyper-methylation of calcium binding proteins S100A6 and S100A2 in human prostate cancer. *Prostate*, 65:322-330, 2005.
- Revelos K, Petraki C, Gregorakis A, Scorilas A, Papanastasiou P, Koutsilieris M. Immunohistochemical expression of Bcl2 is an independent predictor of time-to-biochemical failure in patients with clinically localized prostate cancer following radical prostatectomy. *Anticancer Res*. Jul-Aug;25(4):3123-33. 2005.
- Ribeiro, FR; Diep, CB; Jeronimo, C; Henrique, R; Lopes, C; Eknæs, M; Lingjærde, OC; Lothe, RA; Teixeira, MR. Statistical dissection of genetic pathways involved in prostate carcinogenesis. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 45:154-163. 2006.
- Richmond, PJ; Karaylannakis, AJ; Nagalichi, AV; Pignatelli, M. Aberrant E-cadherin and α -catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer Res*, 57:3189-93, 1997.
- Riener MO, Nikolopoulos E, Herr A, Wild PJ, Hausmann M, Wiech T, Orłowska-Volk M, Lassmann S, Walch A, Werner M. Microarray comparative genomic hybridization analysis of tubular breast carcinoma shows recurrent loss of the CDH13 locus on 16q. *Hum Pathol*. Jul 23. 2008.
- Roberts CW, Orkin SH. The SWI/SNF complex chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer*;4:133–42. 2004
- Roberts SG, Blute ML, Bergstralh EJ, Slezak JM, Zincke H. PSA doubling time as a predictor of clinical progression after biochemical failure following radical prostatectomy for prostate cancer. *Mayo Clin Proc*. Jun;76(6):576-81. 2001.
- Rody A, Karn T, Ruckhäberle E, Müller V, Gehrman M, Solbach C, Ahr A, Gätje R, Holtrich U, Kaufmann M. Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Mar 14. 2008.
- Rogatto SR, Rainho, CA. Citogenética Molecular e Câncer. In: Guerra M. **FISH-Conceitos e aplicações na citogenética**:149-170, 2004.
- Rökman A, Koivisto PA, Matikainen MP, Kuukasjärvi T, Poutiainen M, Helin HJ, Karhu R, Kallioniemi O-P, Schleutker J. Genetic changes in familial prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Prostate* 46: 233-239, 2001.
- Royds JA, Stephenson TJ, Rees RC, Shorthouse AJ, Silcocks PB. Nm23 protein expression in ductal in situ and invasive human breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 85:727–731, 1993.
- Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, Wets CR, Winstanley JH, Robertson L, Barraclough R. Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res*, 60:1595-1603, 2000.

- Rudland SS, Martin L, Roshanlall C, Winstanley J, Leinster S, Platt-Higgins A, Carroll J, West C, Barraclough R, Rudland P. Association of S100A4 and osteopontin with specific prognostic factors and survival of patients with minimally invasive breast cancer. *Clin Cancer Res.* Feb 15;12(4):1192-200. 2006.
- Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, Frahm S O, de Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre J M, Parwaresch R, Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase IIalpha expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases, *Breast Cancer Res. Treat.* 55: 61–71, 1995.
- Saleen M, Kweon MH, Johnson JJ, Adhami VM, Elcheva I E, Khan N, Hafeez BB, Bhat KMR, sarfaraz S, Reagan-Shaw S, Spiegelman VS, Setaluri V, Mukhtar H. S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9. *PNAS*, 103: 14825-14830, 2006.
- Saramäki OR, Porkka KP, Vessella RL, Visakorpi T. Genetic aberrations in prostate cancer by microarray analysis. *Int J Cancer*, 119:1322-1329, 2006.
- Saric T, Brkanac Z, Troyer DA, Padalecki SS, Sarosdy M, Williams K, Abadesco L, Leach R, O'Connell P. Genetic pattern of prostate cancer progression. *Int J Cancer*, 81: 219–24, 1999.
- Sattler HP, Rohde V, Bonkhoff H, Zwergel T, Wullich B. Comparative genomic hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer. *Prostate* 39: 79-86, 1999.
- Schafer BW e Heizman CW. The S100 family of EF-hand calcium binding proteins: Functions and pathology. *Trends Biochem Sci*, 21:134-140, 1996.
- Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*. Oct 9;27(45):5959-74. 2008.
- Schmidt-Hansen B, Klingelhöfer J, Grum-Schwensen B, Christensen A, Andresen S, Kruse C, Hansen T, Ambartsumian N, Lukanidin E, Grigorian M. Functional significance of metastasis-inducing S100A4 (Mts1) in tumor-stroma interplay. *J Biol Chem*. 23:24498-504, 2004.
- Schoumans J, Nielsen K, Jeppesen I, anderlid B-M, Blennow E, Brondum-Nielsen, Nordenskjöld B-M. A comparison of different metaphase CGH methods for the detection of cryptic chromosome aberrations of defined sizes. *Eur J Hum Genet*, 12:447-454, 2004.
- Schoumans J, Nielsen K, Jeppesen I, anderlid B-M, Blennow E, Brondum-Nielsen, Nordenskjöld B-M. A comparison of different metaphase CGH methods for the detection of cryptic chromosome aberrations of defined sizes. *Eur J Hum Genet* 12: 447-454, 2004.
- Shaffer LG e Bejjani BA. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenet Genome Res*, 115:303-309, 2006.
- Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 245:87-98, 2007.

- Shapira M, Ben-Izhak Or, Slotky M, Goldin O, Lahav-Baratz S e Hershko DD. Expression of the Ubiquitin Ligase Subunit Cyclin Kinase Subunit 1 and its Relationship to S-Phase Kinase Protein 2 and p27Kip1 in Prostate Cancer. *The Journal of Urology* .176, 2285-2289. 2006.
- Simon R, Atefy R, Wagner U, et al. HER2 and TOP2A coamplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer*.;107:764–72. 2003.
- Slavotinek AM. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet*. May 30. 2008.
- Snijders AM, Nowee ME, Fridlyand J, Piek JM, Dorsman JC, Jain AN, Pinkel D, van Diest PJ, Verheijen RH, Albertson DG. Genome-wide-array-based comparative genomic hybridization reveals genetic homogeneity and frequent copy number increases encompassing CCNE1 in fallopian tube carcinoma. *Oncogene*, 22:4281-4286, 2003.
- Soejima H, Miyoshi O, Yoshinaga H, Masaki Z, Ozaki I, Kajiwara S, Niikawa N, Matsushashi S, Mukai T. Assignment of the programmed cell death 4 gene (PDCD4) to human chromosome band 10q24 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 87(1-2):113–114. 1999.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, 20:399-407, 1997.
- Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res*. Jan 1;56(1):218-22. 1996.
- Stanford JL, Feng Z, Hamilton AS, et al. Urinary and sexual function after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. *JAMA*. 283:354–360. 2000.
- Steeg OS, Hartsough MT, Clare SE. Nm23, breast differentiation and cancer metastasis. In: Bowcock AM (eds): **Breast Cancer: Molecular Genetics, Pathogenesis, and Therapeutics**. Humana Press Inc, Totowa, pp 267-283, 1999.
- Steeg PS, Bevilacqua G, Kooper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME. Evidence for a novel gene associated with a low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst*, 80:200-204, 1998.
- Stein U, Arlt F, Walther W, Smith J, Waldman T, Harris ED, Mertins SD, Heizmann CW, Allard D, Birchmeier W, Schlag PM, Shoemaker RH. The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology*, 13:1486-500, 2006.
- Steineck G, Helgesen F, Adolfsson J, et al. Quality of life after radical prostatectomy or watchful waiting. *N Engl J Med*. 347:790–796. 2002.
- Steiner T, Junker K, Burkhardt B, Braunsdorf A, Janitzky V, Schubert J. Gain in chromosome 8q correlates with early progression in hormonal treated prostate cancer. *Eur Urol*, 41: 167-171, 2002.

- Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, Dothan ZA, Bianco FI Jr, Lilja H, Scardino PT. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol*, 24: 3973-3978, 2006.
- Strohmeyer DM, Berger AP, Moore DH, Bartsch G, Klocker H, Carroll PR, Loening SA, Jensen RH. Genetic aberrations in prostate carcinoma detected by comparative genomic hybridization and microsatellite analysis: association with progression and angiogenesis. *The Prostate* 59:43-58, 2004.
- Strutz F, Okada H, Lo CW, Dannoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol*, 130: 393-405, 1995.
- Sun J, Liu W, Adams TS, Sun J, Li X, Turner AR, Chang B, Kim JW, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J. DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies. *Prostate*. May 15;67(7):692-700. 2007.
- Sun X, Frierson HF, Chen C, Li C, Ran Q, Otto KB, et al. Frequent somatic mutations of the transcription factor ATBF1 in human prostate cancer. *Nat Genet* 37:407-412. 2005.
- Tabach Y, Milyavsky M, Shats I, Brosh R, Zuk O, Yitzhaky A, Mantovani R, Domany E, Rotter V, Pilpel Y. The promoters of human cell cycle genes integrate signals from two tumor suppressive pathways during cellular transformation. *Mol Syst Biol*.;1:2005.0022. 2005.
- Takahashi S, Qian J, Brown JA, Alcaraz A, Bostwick DG, Lieber MM, Jenkins RB. Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by fluorescence in situ hybridization in needle biopsies. *Cancer Res*, 54:3574-3579, 1994.
- Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S. Cellular localization of pEL98 protein, an S100-related calcium binding protein, in fibroblasts and its tissue distribution analyzed by monoclonal antibodies. *Cell Struct Funct*, 19: 133-141, 1994.
- Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S. Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S-100 related calcium binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells. *Oncogene*, 14:331-337, 1997.
- Tannapfel A, Kockerling F, Katalinic A, Wittekind C. Expression of nm23-H1 predicts lymph node involvement in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*, 38:651-654, 1995.
- Tavtigian SV, Simard J, Teng DH, Abtin V, Baumgard M, Beck A, et al. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat Genet* 27:172-180. 2001.
- Taylor S, Herrington S, Prime W, Rudland PS, Barraclough R. S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br J Cancer*, 86: 409-416, 2002.
- Tefilli MV, Gheiler EL, Tiguert R, Barroso U Jr, Barton CD, Wood DP Jr, Pontes JE. Quality of life in patients undergoing salvage procedures for locally recurrent prostate cancer. *J Surg Oncol*. Nov;69(3):156-61. 1998.
- Teixeira MR, Ribeiro FR, Eknaes M, Waehre H, Stenwig AE, Giercksky KE, Heim S, Lothe RA. Genomic analysis of prostate carcinoma specimens obtained via ultrasound-guided needle biopsy may be of use in preoperative decision-making. *Cancer* 101:1786-1793. 2004.

- Tokunaga Y, Urano T, Furukawa K, Kondo H, Kanematsu T, Shiku H. Reduced expression of nm23-H1, but not of nm23-H2, is concordant with the frequency of lymph-node metastasis of human breast cancer. *Int J Cancer*, 55:66-71, 1993.
- Tornillo L, Duchini G, Carafa V, Lugli A, Dirnhofer S, Di Vizio D, Boscaino A, Russo R, Tapia C, Schneider-Stock R, Sauter G, Insabato L, Terracciano LM. Patterns of gene amplification in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Lab Invest*, 85:921-931, 2005.
- Trouche D, Le Chalony C, Muchardt C, Yaniv M, Kouzarides T. RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1. *Proc Natl acad Sci USA*, 94: 11268-11273, 1997.
- Trybus T, Burgess AC, Wojno KJ, Glover T, Macoska J. Distinct areas of allelic loss on chromosomal regions 10p and 10q in human prostate cancer. *Cancer Res* 56: 2263-2267, 1996.
- Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med*, 50: 401-23, 1999.
- Tsou JA, Galler JS, Siegmund KD, Laird PW, Turla S, Cozen W, Hagen JA, Koss MN, Laird-Offringa IA. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Mol Cancer*. Oct 29;6:70. 2007.
- Umbas, R; Isaacs, WB; Bringuler, PP; Schaalma, HE; Karthaus, HFM, Oosterhol, GON; Debruyne, MJ; Schalken, JA. Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res*. 54:3929-33, 1994.
- Umbas, R; Schalken, JA; Aalders, TW; Carter, BS; Karthaus, HFM; Schaalma, HE; Debruyne, MJ; Isaacs, WB. Expression of cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res*, 52:5104-09, 1992.
- van Dekken H, Paris PL, Albertson DG, Alers JC, Andaya A, Kowbel D, van der Kwast TH, Pinkel D, Schroder FH, Vissers KJ, Wildhagen MF and Collins C. Evaluation of Genetic Patterns in Different Tumor Areas of Intermediate-Grade Prostatic Adenocarcinomas by High-Resolution Genomic Array Analysis. *Genes, Chromosomes & Cancer* 39:249-256. 2004.
- van Duin M, van Marion R, Watson JE, Paris PL, Lapuk A, Brown N, Oseroff VV, Albertson DG, Pinkel D, de Jong P, Nacheva EP, Dinjens W, van Dekken H, Collins C. Construction and application of a full-coverage, high-resolution, human chromosome 8q genomic microarray for comparative genomic hybridization. *Cytometry A*, 63A:10-19, 2005.
- Varesco L, Caligon MA, Simi P, Black DM, Nardimi V, Casarino L, Ferrara G, Solomon E, Belavicqua G. The nm23 gene maps to human chromosome band 17q22 and shows a restriction fragment length polymorphism with BglIII. *Genes Chromosomes Cancer*, 4: 84-88, 1992.
- Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S, Olshen AB, Korkola JE, DeVries S, Carroll P, Kuo WL, Pinkel D, Albertson D, Cordon-Cardo C, Jain AN, Waldman FM. Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res*, 63:2872-2880, 2003.

- Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merks G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet*, 70:1269-1276, 2002.
- Verhagen PCMS, van Duijn PW, Hermans KGL, Looijenga LHJ, van Gorp RJHLM, Stoop H, van der Kwast TH and Trapman J. The PTEN gene in locally progressive prostate cancer is preferentially inactivated by bi-allelic gene deletion. *J Pathol*. 208: 699–707 2006.
- Virgin JB, Hurley PM, Nahhas FA, Bebhuk KG, Mohamed AN, Sakr WA, Bright RK, Cher ML. Isochromosome 8q formation is associated with 8p loss of heterozygosity in a prostate cancer cell line. *Prostate* 41: 49-57, 1999.
- Visakorpi T, Kallioniemi A, Syvanen A-C, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, Isola JJ, Kallioniemi O-P. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*, 55: 342-347, 1995.
- Vlietstra RJ, van Alewijk DC, Hermans KG, van Steenbrugge GJ, Trapman J. Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res*. Jul 1;58(13):2720-3. 1998
- Vocke CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, Florence CD, Jennings SB, Strup SE, Duray PH, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Linehan WM. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12–21. *Cancer Res*, 56: 2411-2416, 1996.
- Vogel W, Maier C, Paiss T. Prostate cancer and the problem of genotype phenotype correlation. *Cytogenet Cell Genet*, 93: 162-167, 2001.
- Vukovic B, Beheshti B, Park P, Lim G, Bayani J, Zielenska M, Squire JA. Correlating breakage-fusion-bridge events with the overall chromosomal instability and in vitro karyotype evolution in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res*, 116:1-11, 2007.
- Walker G, MacLeod K, Williams AR, Cameron DA, Smyth JF, Langdon SP. Estrogen-regulated gene expression predicts response to endocrine therapy in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. Sep;106(3):461-8. 2007.
- Wang L, McDonnell SK, Slusser JP, Hebbiring SJ, Cunningham JM, Jacobsen SJ, Cerhan JR, Blute ML, Schaid DJ, Thibodeau SN. Two common chromosome 8q24 variants are associated with increased risk for prostate cancer. *Cancer Res*, 67:2944-50, 2007.
- Wang X, Nagl Jr N, Flowers S, Zweitzig D, Dallas PB, Moran E. Expression of p270 (ARID1A), a component of human SWI/SNF complexes, in human tumors. *Int J Cancer*, 112: 636-642, 2004b.
- Wang X, Nagl NG, Wilsker D, Van Scoy M, Pacchione S, Yaciuk P, Dallas PB, Moran E. Two related ARID family proteins are alternative subunits of human SWI/SNF complexes. *Biochem J*, 383:319-325, 2004a.
- Wang YF, Chen JY, Chang SY, Chiu JH, Li WY, Chu PY, Tai SK, Wang LS. Nm23-H1 expression of metastatic tumors in the lymph nodes is a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. Jan 15;122(2):377-86. 2008.

- Watanabe Y, Usuda N, Tsugane S, Kobayashi R, Hidaka H. Calvasculin, na encoded protein from mRNA termed pEL-98, 18A2, 42A, or p9Ka, is secreted by smooth muscle cells in culture and exhibits Ca(2+)-dependent binding to 36-kDa microfibril-associated glycoprotein. *J Biol Chem*, 267: 17136-17140, 1992.
- Webb HD, Hawkins AL, Griffin CA. Cytogenetic abnormalities are frequent in uncultured prostate cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet.* Jun;88(2):126-32. 1996.
- Weiss MM, Kuipers EJ, Postma C, Snijders AM, Pinkel D, Meuwissen SG, Albertson D, Meijer GA. Genomic alterations in primary gastric adenocarcinomas correlate with clinicopathological characteristics and survival. *Cell Oncol.*26(5-6):307-17. 2004.
- Wicker N, Carles A, Mills IG, Wolf M, Veerakumarasivam A, Edgren H, Boileau F, Wasyluk B, Schalken JA, Neal DE, Kallioniemi O, Poch O. A new look towards BAC-based array CGH through a comprehensive comparison with oligo-based array CGH. *BMC Genomics.* Mar 29;8:84, 2007.
- Wiese AH, Auer J, Lassmann S, Nährig J, Rosenberg R, Höfler H, Rüger R, Werner M. Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer Detect Prev.*;31(4):282-95. 2007.
- Wilhelm M, Veltman JA, Olshen AB, Jain AN, Moore DH, Presti JC, Kovacs G, Waldman FM. Array-based comparative genomic hybridization for the differential diagnosis of renal cell cancer. *Cancer Res*, 62:957-960, 2002.
- Wilsker D, Patsialou A, Dallas PB, Moran E. ARID proteins:A new family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation,and development. *Cell Growth Differ.* 13: 95–106, 2002.
- Wolf M, Edgren H, Muggerud A, Kilpinen S, Huusko P, Sorlie T, Mousses S, Kallioniemi O. NMD microarray analysis for rapid genome-wide screen of mutated genes in cancer. *Cell Oncol*, 27:169-173, 2005.
- Wolf M, Mousses S, Hautaniemi S, Karhu R, Huusko P, Allinen M, Elkahloun A, Monni O, Chen Y, Kallioniemi A, Kallioniemi OP. High-Resolution Analysis of Gene Copy Number Alterations in Human Prostate Cancer Using CGH on cDNA Microarrays: Impact of Copy Number on Gene Expression. *Neoplasia* 6: 240-247, 2004.
- Wolter H, Gottfried HW, Mattfeldt T. Genetic changes in stage pT2N0 prostate cancer studied by comparative genomic hybridization. *BJU Int* 89: 310-316, 2002b.
- Wolter H, Trijic D, Gottfried HW, Mattfeldt T. Chromosomal changes in incidental prostatic carcinomas detected by comparative genomic hybridization. *Eur Urol*, 41: 328-34, 2002a.
- Woodhouse EC, Chuaqui RF and Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer*, Oct 15;80(8 Suppl):1529-37. 1997.
- Woodings JA, Sharp SJ, Machesky LM. MIM-B, a putative metastasis suppressor protein, binds to actin and to protein tyrosine phosphatase delta. *Biochem J*, 371:463-471, 2003.
- Yamaguchi A, Urano T, Goi T, Takeuchi K, Niimoto S, Nakagawara G, Furukawa K, Shiku H. Expression of human nm23-H1 and nm23-H2 proteins in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 73:2280-2284, 1994.

- Yang G, Stapleton AM, Wheeler TM, Truong LD, Timme TL, Scardino PT, Thompson TC. Clustered p53 immunostaining: A novel pattern associated with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res*, 2: 399-401, 1996.
- Yano S, Matsuyama H, Matsuda K, Matusomoto H, Yoshihiro S, Naito K. Accuracy of an array comparative genomic hybridization (CGH) technique in detecting DNA copy number aberrations: comparison with conventional CGH and loss of heterozygosity analysis in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 150: 122-127, 2004.
- Yeung P, Lee CS, Marr P, Sarris M, Fenton-Lee D. Nm23 gene expression in gastric carcinoma: an immunohistochemical study. *Aust N Z J Surg*, 68:180-182, 1998.
- Yin Z; Spitz MR; Babaian RJ; Strom SS; Troncoso P; Kagan J. Limiting the location of a putative human prostate cancer tumor suppressor gene at chromosome 13q14.3. *Oncogene*, 18:7576-83, 1999.
- Yonemura Y, Endou Y, Kimura K, Fushida S, Bandou E, Tanigushi K, Kinoshita K, Ninomiya I, Sugiyama K, Heizmann CW, Schafer BW, Sasaki T. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 6:4234-4242, 2000.
- Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9136–9141. 2006b.
- Zhang W, Kapusta L.R, Slingerland JM, Klotz LH. Telomerase activity in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, and benign prostatic epithelium. *Cancer Res*, 58: 619-621, 1998.
- Zhang Z, Rosen DG, Yao JL, Huang J, Liu J. Expression of p14ARF, p15INK4b, p16INK4a, and DCR2 increases during prostate cancer progression. *Mod Pathol*. Oct;19(10):1339-43. 2006a.
- Zhao H, Jhanwar-Uniyal M, Datta PK, Yemul S, Ho L, Khitrov G, Kupersmidt I, Pasinetti GM, Ray T, Athwal RS, Achary MP. Expression profile of genes associated with antimetastatic gene: nm23-mediated metastasis inhibition in breast carcinoma cells. *Int J Cancer*, 109:65-70, 2004.
- Zhao H, Ramos CF, Brooks JD, Peehl DM. Distinctive gene expression of prostatic stromal cells cultured from diseased versus normal tissues. *J Cell Physiol*, 210:111-21, 2007.
- Zheng L, Wang F, Qian C, Neumann RM, Cheville JC, Tindall DJ e Liu W. Unique Substitution of CHEK2 and TP53 Mutations Implicated in Primary Prostate Tumors and Cancer Cell Lines. *Human Mutation in Brief*. 928. 2006
- Zheng SL, Augustsson-Balter K, Chang B, et al. Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the prostate cancer in Sweden study. *Cancer Res*. 64:2918–22. 2004.
- Zitzelsberger H, Engert D, Walch A, Kulka U, Aubele M, Hofler H, Bauchinger M, Werner M. Chromosomal changes during development and progression of prostate adenocarcinomas. *Br J Cancer* 84: 202-208, 2001.

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

Zwelling LA. DNA topoisomerase II as a target of antineoplastic drug therapy. *Cancer Metastasis Rev* 4:263–76. 1985.

Apêndice A: Resultado da análise comparativa com 70% de similaridade entre todas as amostras de cada grupo e entre todos os CaP dos três grupos de amostras.

	Amostras	Perdas comuns	Ganhos comuns
Grupo I	CaP (P1, P3, P7, P9, P11, P12, P13, P14)	1p32-33, 2q35, 4p15.3-16, 5q34-35, 6q24-25, 7p14-15, 7q34-35, 8q22-24.3, 9p21, 9q32-34, 10q22, 10q24-26, 11q22-25, 12q22-24.3, 13q12-13, 14q31-32, 15q22-26, 16p12-13.2, 16q22-24, 17q11.2-25, 18q22-23, 19p13.1-13.3, 19q13.1-13.4, 20q13.1-13.3, 22q11.2-q13	-
	Metástases (P1M, P2M, P5M, P8M, P9M, P11M, P12M, P13M, P14M1, P14M2)	1p32-34.2, 7p14-15, 7q35, 8q24.2, 9q31-32, 9q34, 10q24, 10q26, 11q23, 12q24.1-24.3, 14q32, 15q22-24, 16p12-13.2, 16q22, 16q23-24, 17q12-22, 17q24, 18q22-23, 19p13.2-13.3, 19q13.1-13.3, 22q13	2p11.2, 5p13-14, 5q12
Grupo II	CaP (78P1, P29, P30, P31, P32)	1p31-34.1, 1p36.1, 2q36, 4p15.2-16, 8p12, 8q24.1-24.3, 9q31, 9q34, 10p12, 10q22, 10q24-26, 11q14-25, 12q23-24.3, 14q31-32, 15q15, 15q22-26, 16p12-13.3, 16q12.1, 16q22-24, 18q12-21, 18q21-23, 19p13.3, 19q13.3-13.4, 20p11.2-12, 20q13.1-13.3, 21q22, 22q11.2-13	2p11.2, 3p12, 3q13.1, 4q12-13, 5q12, 6q12
Grupo III	CaP (15F2, 15F3, 48F2, 48P3, 70F1, 70F2, 177F1, 177F2)	1p32-36.3, 1q22, 1q32-42, 2p12, 2p14-23, 2q14.1, 2q14.3, 2q21, 2q34, 2q36-37, 3p14-24, 3q13.2-26.2, 3q27-28, 5p13-15.3, 5q13-14, 5q21-34, 6p21.2-22, 6q16-21, 6q24, 7p13-22, 7q11.2-32, 7q34-36, 8p11.2-23, 8q11.2-24.3, 9p13-21, 9q21-34, 10p12-13, 10q21-23, 10q25-26, 11p12, 11p15, 11q13-14, 11q23-24, 12p12-13, 12q13-24.2, 13q14-21, 14q23-24, 14q32, 15q14-15, 15q21-26, 16p11.2-13.3, 16q12.1-24, 17p12-13, 17q12-22, 17q25, 18q12-22, 19p13.2-13.3, 19q13.2-13.4, 20p11.2, 20q11.2-13.1, 20q13.3, 21q21-22, 22q11.2 e 22q13	-
Grupos I, II e III	CaP	1p32-33, 8q24.1-24.3, 9q34, 10q22, 10q25-26, 11q23-24, 12q23-24.3, 14q32, 15q22-26, 16p12-13.2, 16q22-24, 18q22, 19p13.3, 19q13.3-13.4, 20q13.1, 20q13.3, 22q13.	-

Negrito: regiões mínimas comuns entre os tumores primários e metástases do grupo I.

Apêndice B: Alterações comuns entre as amostras de metástases e dos CaP agrupadas de acordo com a localização da metástase. Nas metástases ósseas e em testículo foram consideradas as perdas e ganhos presentes em pelo menos 3 das 4 amostras; nas metástases em linfonodos quando presente nas 2 amostras.

Metástases	Perdas	Ganhos
Ósseas (P1M, P2M, P5M e P8M)	1p31-34.1, 1p36.2-36.3, 1q32, 2p22, 2q37, 5q31, 7p13-14, 8p12, 9q31-34, 10q26, 11q13, 11q23, 11q25, 12q23-24.3, 13q33-34, 14q32, 15q22-24, 16p12-13.3, 16q21-24, 17q12-25, 18q22, 19p13.1-13.3, 19q13.1-13.3, 20q13.2-13.3, 22q13	1p12-13, 1q21-22, 2p11.2-13, 2q22-23, 2q24, 2q32, 3q11.2-12, 3q13.1, 4p12-14, 4q24-25, 5p12-13, 5q14, 5q21, 6p12, 6q12-16, 6q21-22, 8q12-13, 8q21.2
Testículos (P11M, P12M, P13M e P14M1)	1p21, 1p32-34.2, 1p35-36.1 , 1q32-44, 2q14.1-14.3, 2q21, 4p15.3- 16 , 4q33-34, 5q34-35, 6p12-22 , 6q24, 7p12-15, 7p21-22 , 7q22-32, 7q33-36, 8q24.1, 8q24.2-24.3 , 9q21-22, 9q31-33, 9q34, 10q24-25 , 10q26, 11q13-14, 11q21-22, 11q22-24, 12p13, 12q22- 24.3 , 14q31-32, 15q22-26, 16p12-13.3, 16q22-24 , 17q11.2- 23, 17q24-25 , 18q12-21, 18q22-23, 19p13.1-13.3, 19q13.2-13.4 , 20p11.2-13, 20q12- 13.3, 22q13	2p11.2, 5p13-14, 5q12
Linfonodos (P3M e P9M)	1p32, 2p21 , 3p14-21, 4p15.2-15.3, 7p14-15, 8q23-24.1, 8q24.3, 9q34 , 10q21-22, 10q24, 11q23, 11q24-25 , 12q13-14, 12q23-24.1, 15q15-21, 15q22-24 , 16q24, 17q21 , 18q21-22, 19q13.3-13.4, 22q13	2p11.2-12, 5q12, 8q12
CaP	Perdas	Ganhos
que evoluíram para metástases em Testículo (P11, P12, P13 e P14)	1p32-33, 1p35-36.1 , 2q37, 4p16 , 5q31, 5q34-35, 6p12-21.1 , 6q15, 7p14, 7p21, 7q34-35, 8q23-24.3 , 9p13-21, 9q32, 9q34 , 10q11.2, 10q22, 10q23-26, 11q22-25 , 12p11.2, 12q23-24.3 , 13q12-13, 15q21, 15q22-26, 16p11.2-13.2 , 16q12.1, 16q22-24, 17q21-25, 18q22-23, 19p13.1-13.3, 19q13.1-13.4, 20q13.1-13.3 e 22q11.2-13.	-
que evoluíram para metástases em Linfonodos (P3 e P9)	1p31, 1p32 , 1q31, 1q32, 2p21-22 , 2q35, 3p21 , 3p24, 3q22-24, 4p15.2-16 , 4q21-22, 4q28, 5q31, 5q32, 5q34, 6q13-14, 6q16-21, 6q22, 6q24-26, 7p12-14, 7q22, 8q22-24.3 , 9p21, 9q22-32, 9q34 , 10q26, 11q22-24, 12q22-24.2 , 13q21, 14q24-31, 15q15-21, 15q22-26 , 16p12-13.3, 17q12-24, 17q25, 18p11.2, 18q23, 19p13.1-13.3, 19q13.1- 13.3 e 22q11.2-13.	-

Negrito: regiões mínimas comuns entre determinado grupo de tumores primários e respectivo grupo de metástases dos mesmos pacientes.

São Paulo, 04 de Março de 2008.

À
Dra. Dirce Maria Carraro

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1024/07
"Hibridação comparativa de seqüências expressas (CESI) e expressão gênica em tempo real (qRT-PCR) na validação de ganhos e perdas genômicas detectados por CGH-array em adenocarcinomas de próstata".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 26/02/2008, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 11/12/2007, aprovaram a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções CNS;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Laboratório de Biologia Molecular;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Termo de Compromisso da Pesquisadora Responsável pelo projeto na Fac. de Medicina UNESP/Botucatu;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Urologia da Fac. de Medicina UNESP/Botucatu

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa