UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA

CAMPUS DE BOTUCATU

ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM ADENOCARCINOMAS DE PRÓSTATA

FLÁVIA CILENE MACIEL DA CRUZ ALVES

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU-SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA

CAMPUS DE BOTUCATU

ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM ADENOCARCINOMAS DE PRÓSTATA

Doutoranda: Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Regina Rogatto

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU-SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP

DIVISÃO TECNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Alves, Flávia Cilene Maciel da Cruz. Alterações epigenéticas em adenocarcinomas de próstata / Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientadora: Sílvia Regina Rogatto Assunto CAPES: 40105008

1. Próstata - Câncer - Aspectos genéticos

CDD 616.99263

Palavras chave: Câncer de Próstata Gene CDH1; Gene RARB; Gene RASSF1A; IHC; Metilação; MSP-PCR; RT-PCR

.... o meu caminho está encoberto ao Senhor.... Não sabes, não ouviste que o eterno Deus, o Senhor, o Criador dos fins da terra, nem se cansa, nem se fatiga?.... Faz forte ao cansado e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor.... mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam....

Isaías cap.40 vers.27 a 31



Às minhas filhas Ana Carolina e Mariana, minha eterna gratidão pelo carinho e paciência e ao meu marido Jaime pelo amor, incentivo, respeito, carinho e apoio nas dificuldades e por fazer parte da minha vida.

Obrigado por tudo que vocês fizeram por mim!!!!

Aos meus pais, Osvaldo e Neide agradeço pela confiança em mim depositada, ajudando a buscar forças para concluir esta etapa da minha formação profissional, propiciando a mim atenção nos momentos difíceis.

Obrigado por tudo e eu amo muito vocês!!!!



AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pois sem Ele nada do que foi feito se faria.

Aos meus irmãos Fábio e Fernando, cunhadas Margareth e Regina, sobrinhos Ricardo, Beatriz e Luccas, minha sogra Dalila e meu sogro Waldomiro (*in memorian*), cunhada Suely, cunhado Santana, que, com os seus auxílios, orações e contribuições, permitiram a realização deste curso.

À minha orientadora Prof. Dra. Sílvia Regina Rogatto, pelo incentivo e apoio durante todo este processo de crescimento profissional, intelectual e pessoal. E também pela integridade de caráter científico e pela amizade.

À Dra. Sandra Drigo, por sua participação essencial em todas as etapas deste trabalho, pelo carinho, orientação segura e disponibilidade. Muito Obrigado!

À Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, um especial agradecimento ao incentivo constante e pela atenção, presteza e disposição a mim sempre dispensadas. Obrigado de coração minha amiga...

Ao Dr. José Carlos de Souza Trindade, Dr. José Carlos de Souza Trindade Filho e Dr. Márcio Nobrega de Jesus, pela participação essencial na análise das informações clínicas, cujos ensinamentos nortearam minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo, agradeço a oportunidade de cursar este doutorado e pela acolhida em Botucatu!!!

À Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, pelo apoio, incentivo e pela amizade cultivada.

À Dra. Cláudia Aparecida Rainho, pelas importantes sugestões que enriqueceram este trabalho.

À todos os amigos do laboratório NeoGene, Fabíola, Renata Canevari, Renata Bueno, Rodrigo, Fábio, Lívia, Luciana, Eliana, Míriam, André, Cássia, Fernanda, Sara, Priscila, Nádia, Leda, Érica, Michele (USP/Bauru) e Greicy que participaram efetivamente deste trabalho científico e também participaram emocionalmente desta minha jornada.

A todos os amigos do Departamento de Patologia, Professora Maria Luíza, Lúcia, Denise, Cícera, Luciano, Cristina, José Carlos, Priscila Negraes e Shadia, e também do Departamento de Urologia, Andréa e Glaucia, pela convivência harmoniosa dos últimos anos.

À Tânia, secretária do programa de pós-graduação em Patologia, por sua sempre gentil presteza em informações.

Aos técnicos do laboratório de Imunohistoquímica, Marquinhos e Celene, pela importante participação na realização da imunohistoquímica e pela boa vontade em sempre ajudar.

Ao Dr. Francisco Fonseca, Dr. Fernando Soares, Ivan (laboratório de imunohistoquímica) e a Cláudia, do Hospital A.C. Camargo, pela contribuição na disponibilização dos dados clínicos dos pacientes e pelas valiosas orientações.

À Janete Aparecida Silva, Nathanael Pinheiro Salles e Regina Célia Spadin, membros da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina, pela prontidão com que sempre me atenderam. À todos os membros da Igreja Presbiteriana Maranata que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, pois fazemos parte de uma grande família abençoada por Cristo Jesus.



RESUMO

Introdução: As alterações epigenéticas desempenham funções críticas na regulação de vários genes, funções celulares e conseqüentes mudanças no controle do ciclo celular. Estas modificações têm sido associadas ao desenvolvimento tumoral. Em câncer de próstata, muitos genes hipermetilados foram descritos e indicados como potenciais marcadores diagnósticos, incluindo *RARB, RASSF1A, SFN* e *CDH1*. O presente estudo tem como objetivo avaliar a freqüência da hipermetilação dos genes *SFN, RARB, RASSF1A* e *CDH1* nos adenocarcinomas de próstata (CaP) e correlacionar essas alterações com a expressão gênica e proteica e com parâmetros clínicos e histopatológicos.

Métodos: O padrão de metilação dos genes *SFN*, *RARB*, *RASSF1A* e *CDH1* foi determinado por PCR-metilação específica em 68 amostras de CaP e em 27 amostras de próstata não neoplásicas (PNN). Expressão dos transcritos *RARB* e *RASSF1A* foram avaliados por RT-PCR quantitativo em 73 amostras de CaP, 15 amostras de tecidos prostáticos adjacentes não neoplásicos (PAdj) e dois tecidos prostáticos normais (N). A expressão das proteínas foi avaliada por imunohistoquímica em 141 amostras de CaP, 40 PAdj e dois N. Os resultados foram correlacionados com parâmetros clinico-histopatológicos. A expressão proteica de E-caderina também foi investigada em uma série de 39 CaP e 27 PNN.

Resultados: Os genes *RARB* e *RASSF1A* apresentaram-se hipermetilados em CaP (P<0,0001 e P = 0,0017, respectivamente), mas nenhuma diferença foi detectada para *SFN*. Os níveis dos transcritos e proteínas RASSF1A foram semelhantes entre amostras de CaP e PAdj. Entre os tumores foi detectada a diminuição dos níveis de transcritos de RAR β (P=0,001) e da proteína (P=0,0007). Níveis diminídos do mRNA foram associados com a hipermetilação de *RARB*. A expressão proteica de RAR β era nuclear e citoplasmática nos tecidos tumorais. A análise multivariada demonstrou que a presença de RAR β citoplasmático estava independentemente associada com a diminuição da sobrevida livre de recorrência bioquímica (P=0,019, HR = 1,891). Não houve nenhuma diferença significativa entre a hipermetilação do promotor de *CDH1* em CaP (56 %) e nas amostras PNN (56 %) pareados pela idade. Além disso, nenhuma associação foi encontrada entre a hipermetilação de metilação de *CDH1* e a expressão proteica foi confirmada em análise posterior utilizando células tumorais isoladas por microdissecção por captura a laser (LMC). Em um subconjunto de amostras tumorais, os padrões de expressão da E-caderina apresentaram-se heterogêneos e

foram associados com escore de Gleason alto e pior prognóstico (recidiva bioquímica em três casos). A análise da proteína E-caderina em um número maior de pacientes (TMA) não mostrou nenhuma associação na comparação com os parâmetros clínico-histopatológicos.

Conclusões: Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos padrões de metilação entre CaP e tecidos PNN pareados quanto a idade apenas para os genes *RARB* e *RASSF1A*. A hipermetilação de *RARB* parece ser um dos mecanismos envolvidos na diminuição de expressão de RAR β em CaP. Sugerimos que a presença de marcação citoplasmática da proteína RAR β é um marcador de pior prognóstico independente e que pode ser considerado um novo biomarcador em câncer de próstata. A hipermetilação do promotor de *CDH1* não foi associada à expressão protéica. Em um subconjunto de amostras, o padrão de expressão heterogênea da proteína foi significativamente associado a um alto escore de Gleason, corroborando sua associação com tumores mais agressivos.



ABSTRACT

Introduction: Epigenetic alterations play critical roles in regulation of several genes and cellular functions and their deregulation may disrupt the cellular control leading to tumor development. In prostate cancer (PCa), many hypermethylated genes have been described and indicated as potential prostate cancer diagnostic markers, including *RARB*, *RASSF1A*, *SFN* and *CDH1*. The current study aimed to evaluate *SFN*, *RARB*, *RASSF1A*, and *CDH1*hypermethylation frequencies in prostate carcinoma (PCa) and to correlate these alterations with down-regulations at transcriptional and protein levels and with clinical outcome.

Methods: Methylation pattern of *SFN*, *RARB*, *RASSF1A* and *CDH1* were determined by methylationspecific PCR (MSP) in 68 PCa samples and 27 non-neoplastic prostate tissues (NNP). *RARB* and *RASSF1A* transcripts expression were evaluated by quantitative RT-PCR in 73 PCa, 15 adjacent nonneoplastic prostate tissues (AdjP) and two normal prostate (N). Methylation and mRNA analysis for *RARB* and *RASSF1A* were done in matched samples from 30 PCa and 10 AdjP. Protein expression assessed by immunohistochemistry was evaluated in an independent cohort of 141 PCa, 40 AdjP and two normal prostate tissues. Paired E-cadherin protein and methylation analysis was also investigated in 33 PCa and 20 NNP. The findings were correlated with clinicopathological parameters.

Results: RARB and RASSF1A genes were hypermethylated in PCa (P < 0.0001 and P = 0.0017, respectively), but no difference was detected for SFN. RASSF1A mRNA and protein levels were similar in PCa and AdjP samples. Down-expression of RAR β in transcript (P=0.001) and protein (P=0.0007) levels were detected in tumors. Lower mRNA levels were associated with RARB hypermethylation. Nuclear and cytoplasmic RAR β protein expression was detected in tumor tissues. Multivariate analysis demonstrated that cytoplasmic RAR β immunostaining was independently associated with decreased biochemical recurrence-free survival (P=0.019, HR=1.891). There were no differences between the CDH1 promoter hypermethylation in PCa (56%) and age-matched NNP (56%) samples. None association was also found between CDH1 hypermethylation and protein expression in prostate tissues. Absence of association between CDH1 methylation status and protein expression was confirmed in further MSP analysis in distinct tumor cells isolated by laser microdissection capture (LMC) according to protein expression patterns. Heterogeneous E-cadherin protein expression patterns were detected in a subset of tumor samples and was associated with high

Gleason score and worse outcome. E-cadherin protein analysis in a large number of patients (TMA) showed no association with clinicopathological parameters.

Conclusions: Statistically significant differences in methylation patterns between PCa and agematched NNP tissues were observed only for the *RARB* and *RASSF1A* genes. *RARB* hypermethylation seems to be one of the mechanisms involved in RAR β down-expression in PCa. Cytoplasmic RAR β protein was an independent predictor of poor prognosis that may be considered as a new biomarker in prostate cancer. *CDH1* promoter hypermethylation was not associated with protein expression level. In a subset of samples was detected a heterogeneous protein expression pattern significantly associated with higher Gleason score, giving an additional evidence of its association with more aggressive tumors.

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de Siglas e Abreviaturas

Genes	
APC	adenomatous polyposis coli
AR	Receptor de Andrógeno
ARF ou CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
ASC ou PYCARD	PYD and CARD domain containing
BRCA2	breast cancer 2
Catenina α	catenin (cadherin-associated protein), alpha
Catenina β ou CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1
CAV1	caveolin 1
CCND2	cvclin D2
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
CDC20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
CDH1 ou E-caderina	cadherin 1. type 1. E-cadherin (epithelial)
CDH13	cadherin 13. H-cadherin (heart)
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CDKN2A ou p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16)
CLSTN1	calsyntenin 1
DAB2IP	DAB? interacting protein
DAPK1	death-associated protein kinase 1
DNMT	DNA-methyltransferase
DPYS	dihydronyrimidinase
FDNRB	endothelin recentor type B
EFP ou TRIM25	estragen -responsive finger protein
FSR1	estrogen recentor 1
ESR2	estrogen receptor 7
GPX6	alutathione perovidase 6
GSTP1	glutathione S-transferase ni 1
GSTT1	alutathione S-transferase theta 1
HIC1	hypermethylated in cancer 1
HIN-1 on SCGB3A1	secretoalohin family 34 member 1
I AMA3	Jaminin alnha 3
MCAM	melanoma cell adhesion molecule
MDR1 ou ABCB1	ATP-binding cassette sub-family B (MDR/TAP) member 1
MGMT	0.6-methylauanine_DNA methyltransferase
MMPQ	matrix metallonentidase 0
MSMR	microsominoprotein beta
NKV2 5	NK2 transcription factor related locus 5
NSE1 ou EAM84A	family with sequence similarity 84 member A
PTGS2	prostaglandin endoneroride synthese ?
PAPR	ratinoic acid recentor beta
PAPB?	retinoic acid receptor, beta ?
	retinoic acid receptor, beta 2
	Pat Sarcoma Virus
	Rai Surconde Virus Ras association (RalCDS/AF 6) domain family member 1
PUNY3	runt related transcription factor 3
SFN $(14.3.3\pi)$	Stratifin
SI C16412	solute carrier family 16 member 12 (monocarboxylic acid
SECTORIZ	transporter 12)
SMAD4	SMAD family member 4
SPOCK2	sparc/osteonectin cwcv and kazal-like domains
51 ((1))	proteoglycan (testican) 2

SSBP2 TIG1	single-stranded DNA binding protein 2 mediator complex subunit 15
TGF-β	transforming growth factor, beta 1
TP16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
TP53	tumor protein p53
XPA	xeroderma pigmentosum complementation group A

Metodologias	
CGH-array	Comparative Genomic Hybridization-arrays
IHQ	Imunohistoquímica
MS-PCR	Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
qMSP	Quantitative MSP
qRT-PCR	Quantitative RT-PCR
TMA	Tissue microarray

Geral	
ADT	Terapia Privativa de Androgênio
AIP	Progressão Independente de Andrógeno
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Ca	Câncer
CaP	Câncer de Próstata
CPRH	Câncer de Próstata Refratário a Hormônios
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
Н3-Н9	Histona H3-Lysine 9
HDAC	Histona Desacetilase
HNP	Hiperplasia Nodular da Próstata
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LNCaP	células cancerígenas de próstata
М	Metástases à Distância
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
MVI	Invasão Microvascular
Ν	Linfonodos Regionais
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
PIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática
PSA	Antígeno Prostático Específico
PSADT	PSA doubling-time
RDA	Análise Representativa Diferencial
RISC	Complexo de silenciamento RNA induzido
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
SNPs	single nucleotide polymorphisms
Т	Tumor Primário
EMT	Transição Epitélio-Mesênquima



Alves, Flávia Cilene Maciel da Cruz

Índice	
I. Revisão de Literatura	15
1. Câncer de Próstata: incidência e fatores de risco	15
2. Aspectos anatômicos e histopatológicos do Câncer de Próstata	18
3. Aspectos clínicos do Câncer de Próstata	21
4. Alterações Genéticas e Epigenéticas	24
5. Metilação do DNA e silenciamento gênico	28
6. Alterações Genéticas e Epigenéticas no Câncer de Próstata	29
7. Gene <i>CDH1</i>	33
8. Gene SFN	37
9. Gene <i>RARB</i>	39
10. Gene RASSF1	43
11. Justificativa	46
II. Objetivos	48
III. Referências	49
IV. Artigos	67
1. RARB is a biomarker of poor prognosis in prostate carcinomas	67
Referências	80
Tabela 1	83
Tabela 2	85
Tabela 3	86
Tabela 4	87
Tabela 5	88
Figura 1	90
Figura 2	91
2. CDH1 methylation pattern and heterogeneous E-cadherin expression in prostate cancer	92
Referências	106
Tabela 1	110
Tabela 2	112
Tabela 3	113
Tabela 4	114
Tabela 5	115
Figura 1	118
Figura 2	119
Figura 3	120
V. Conclusão	121

VI. Anexos

Termo de Consentimento

Parecer Comitê de Ética

Parecer Consubstânciado

REVISÃO DA LITERATURA

1. Câncer de Próstata: incidência e fatores de risco

O câncer de próstata (CaP) representa um sério problema de saúde pública, em função de suas altas taxas de incidência e mortalidade. No Brasil, esta neoplasia é a segunda causa de óbitos por câncer em homens, sendo superada apenas pelo câncer do pulmão. Dados de Incidência e Morte por Câncer estimaram a ocorrência de 49.530 novos casos para o ano de 2008, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2008). Estes valores correspondem a um risco estimado de 52 novos casos a cada 100 mil homens. O aumento observado nas taxas de incidência, comparado aos últimos anos, pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida do brasileiro.

Os fatores de risco associados ao risco de desenvolvimento do câncer de próstata são idade avançada, etnia e predisposição familial. O CaP é a doença com a mais alta incidência em homens idosos no mundo ocidental (Linton e Hamdy, 2003; Chan *et al.*, 2004). As taxas elevadas de lesões encontradas *post mortem* em homens assintomáticos apontam a estreita correlação entre CaP e a idade. Estima-se que aos 80 anos, aproximadamente 70% dos homens devam possuir células cancerosas na próstata (Carter *et al.*, 1990; Sakr *et al.*, 1994; Soos *et al.*, 2005) e que mais de 80% possuem lesões atípicas à autopsia (Billis, 1986). Este tumor raramente é observado em homens com menos de 40 anos de idade e o risco para seu desenvolvimento aumenta a cada década subseqüente. Jemal *et al.* (2003) relataram que a probabilidade de um homem com menos de 40 anos ser diagnosticado com CaP é de 1:19.299 homens; na faixa etária de 40 a 59 anos o risco aumenta para 1:45 e entre 60 e 79 anos é ainda maior chegando a acometer 1:7 homens. Ao longo da vida, o risco total foi estimado em aproximadamente 1 a cada 6 homens.

As taxas de incidência do câncer de próstata são variáveis entre as populações do mundo (Stanford *et al.*, 1999). As menores incidências foram relatadas entre os asiáticos e as maiores entre os europeus (Parkin *et al.*, 1997; Hsing *et al.*, 2000). Os afro-americanos, no entanto, apresentam a maior incidência de CaP do mundo, na América do Norte, a incidência é 60% maior do que em indivíduos caucasianos (Miller *et al.*, 1996). Tais diferenças podem ocorrer devido a fatores genéticos, ambientais e sociais (Haas e Sakr, 1997).

Além da etnia e idade, a historia familial é o terceiro fator de risco atribuído ao CaP (Bracarda *et al.*, 2005). Estudos em várias populações sugerem que a história familial é um dos mais importantes fatores de risco para o câncer de próstata (Cannon *et al.*, 1982; Carter *et al.*, 1992; Grönberg *et al.*, 1996). A presença do câncer de próstata em um pai ou irmão aumenta o risco para a doença, sendo inversamente relacionado à idade do parente afetado (Cannon *et al.*, 1982; Grönberg *et al.*, 1996; Ghadirian *et al.*, 1997; Matikaine *et al.*, 2001; Stanford e Ostrander, 2001). Uma meta-análise de 33 estudos epidemiológicos demonstrou que o risco parece ser maior para homens com irmãos afetados do que para homens com pais afetados (Zeegers *et al.*, 2003). Uma hipótese para explicar este fato inclui herança ligada ao X ou herança recessiva. Em adição, o risco para o desenvolvimento da doença aumenta com o número de parentes de primeiro grau afetados.

Até o presente, não são conhecidos genes de alta penetrância que confiram predisposição ao carcinoma de próstata. O candidato mais próximo é o *BRCA2*, que confere um risco para o desenvolvimento do câncer de próstata 20 vezes maior em pacientes portadores de mutações do que na população geral. Os cânceres de próstata associados ao *BRCA2* são agressivos, sugerindo a necessidade testes de triagem nos membros das famílias de pacientes afetados pela mutação. Entretanto as mutações em *BRCA2* são raras em homens com câncer de próstata. Estudos em larga escala tem identificado vários novos genes *loci* candidatos. O gene *MSMB* foi considerado como promissor, porque ele codifica um fator de ligação de imunoglobulina que está presente no fluido seminal (revisado em Foulkes, 2008).

Vários SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) localizados em genes candidatos relacionados ao desenvolvimento de câncer de próstata, incluindo os componentes de resposta ao antígeno prostático, enzimas, hormônios e seus receptores, proteínas de regulação do ciclo celular, citocinas, moléculas de adesão entre outros tem sido o foco de centenas de estudos epidemiológicos. Deleções nos genes das glutationa S-transferases (GSTs), especialmente *GSTT1*, são as alterações mais amplamente estudadas na suscetibilidade ao CaP. Em um contexto de análise de todo o genoma, Amundadottir *et al.* (2006) relataram que múltiplos SNPs localizados em 8q24 apresentavam uma significativa associação com a suscetibilidade a esse carcinoma. Subseqüentemente, estudos de múltiplas populações e do tipo caso-controle confirmaram esta região como um lócus de suscetibilidade ao CaP. Em 2007, Gudmundsson *et al.* (2007) relataram dois locos de suscetibilidade ao CaP localizados em 8q24 e 17q associados a risco no CaP em um grande estudo caso-controle. Eles relataram uma associação

entre estes SNPs com CaP avançado. Contudo, não é bem estabelecida em literatura a relação entre esses locos de suscetibilidade e a agressividade tumoral (Xu *et al.*, 2008).

Além dos fatores de risco mencionados, para o desenvolvimento do câncer de próstata, alterações nos níveis de hormônios masculinos (Epstein *et al.*, 2004) e fatores ambientais tais como a dieta, tem sido relatados. A vitamina E, o licopeno e o selênio podem exercer um efeito protetor à carcinogênese, enquanto os alimentos ricos em gordura podem exercer efeito contrário (Hsing, 2001; Platz e Helzlsover, 2001; Kolonel, 2001; Chan e Giovannucci, 2001). Como cada um dos fatores dietéticos que parecem proteger contra o CaP são antioxidantes potentes, está amplamente difundido que o *stress* oxidativo pode contribuir para carcinogênese da próstata.

Recentemente, Gurel *et al.* (2008) descreveram um modelo pelo qual lesões atróficas locais, que são extremamente comuns na próstata, resultam de lesões celulares iniciadas por dietas e lesões inflamatórias. Estas lesões atróficas mostram transições morfológicas de uma neoplasia intra-epitelial de alto grau e por vezes diretamente para um "microcarcinoma". Assim, certas lesões atróficas freqüentemente encontradas em associação com a inflamação crônica podem ser "fatores de risco" para o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e adenocarcinoma da próstata. Um dos aspectos importantes desta investigação é que, como a inflamação e a dieta são conhecidas por desempenharem um papel importante no desenvolvimento de câncer, eles podem tornar-se alvos para a implantação de novas estratégias de prevenção do câncer de próstata.

Diferenças nas práticas de detecção também influenciam substancialmente a incidência do câncer de próstata permitindo o diagnóstico precoce, ou seja, antes do surgimento dos sintomas ou da detecção de anormalidades ao exame físico. Nesse sentido, o uso de marcadores moleculares como o antígeno prostático específico (PSA) tem um papel importante no diagnóstico de CaP em estágios iniciais (Nelson *et al.*, 2003). Desde a sua descoberta em 1970 (Ablin *et al.*, 1970 a;b), o teste de rotina de PSA se tornou a principal ferramenta na detecção do câncer de próstata. Concomitantemente ao uso da dosagem do PSA sérico como ferramenta diagnóstica, a incidência da doença aumentou consideravelmente ao passo que as taxas de mortalidade decresceram (McDavid *et al.*, 2004). Estima-se que aproximadamente 86% dos homens diagnosticados não morram devido à doença (Klotz, 2006). A difusão do uso do exame do PSA resultou na detecção dos casos da doença em estadios mais precoces. Entretanto, há controvérsias quanto à definição de níveis considerados

"normais" do PSA sérico. Os valores normais foram questionados pelos dados de *Prostate Cancer Prevention Trial* (Thompson *et al.*, 2004), pois em uma grande proporção de homens com nível de PSA <2,5ng/ml foi detectado câncer de próstata. Atualmente, vários investigadores tem sugerido que há uma proporção significativa de CaP que ocorrem abaixo deste nível, embora hajam controvérsias sobre o seu significado clínico (Gosselaar *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2007; Roddam *et al.*, 2007). Além disso, quando o nível de PSA está entre 4 – 10 ng/mL a especificidade do teste é baixa, sendo necessária a exclusão diagnostica de câncer por meio de biopsias em um número relativamente elevado de pacientes. A redução do valor de normalidade do PSA de 4 para 2 ng/mL poderia aumentar a taxa total de detecção do câncer e conseqüentemente os casos a serem tratados, incluindo aqueles com doença clínica insignificante. Além disso, aumentariam as indicações de biópsia, muitas das quais desnecessárias (Roddam *et al.*, 2007).

As opções de tratamento para os CaP primários detectados precocemente incluem prostatectomia radical, terapia radioativa e sobrevivência ativa (Nelson *et al.*, 2003). Ao diagnóstico, aproximadamente 30% dos homens apresentam a doença se estendendo através da glândula prostática, e alguns apresentam a doença metastática. Outros pacientes apresentam recorrência clínica após prostatectomia radical curativa e terapia radioativa. Os carcinomas de próstata avançados são geralmente tratados com terapia deprivativa de androgênio (ADT) utilizando castração cirúrgica ou médica (Nelson *et al.*, 2003). Entretanto, para a maioria dos homens, o CaP irá recorrer neste ambiente debilitado de andrógeno, como uma doença comumente chamada de progressão independente de andrógeno (AIP) (Labrie *et al.*, 1993). Não há atualmente biomarcadores que determinem com precisão quais cânceres serão mais agressivos e eventualmente irão se desenvolver em doença metastática e/ou AIP (Camoriano *et al.*, 2008).

2. Aspectos anatômicos e histopatológicos do Câncer de Próstata

A próstata é um órgão glandular e fibromuscular, localizado no interior da cavidade pélvica, abaixo da bexiga, à frente do reto, circundando a uretra (Figura 1a). A uretra atravessa-a longitudinalmente e, por esta razão, qualquer aumento desse órgão se traduz freqüentemente em obstrução urinária originando a síndrome do prostatismo.

Sob o ponto de vista anatômico, a próstata é formada por três zonas glandulares e pelo estroma fibromuscular (McNeal *et al.*, 1988; Sampson, 2007). 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 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 PIN ocorrem nesta área (McNeal, 1986; Che e Grignon, 2002). 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 arranjada em lóbulos envolvidos por um estroma, ambos contidos dentro da cápsula prostática (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 conjuntivo. 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 PSA e da fosfatase ácida que ocorre apenas nas células secretoras (Grignon *et al.*, 1988). Em ambas as camadas se verifica a expressão do receptor de andrógeno (AR), 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).



Figura 1. A) Localização anatômica da próstata. **B**) Subdivisão anatômica da próstata em três regiões glandulares: zona de transição, zona central e zona periférica.

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 grande maioria dos CaP é representada pelo adenocarcinoma acinar.

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. As lesões neoplásicas individuais em uma determinada seção de tecido de câncer de próstata são descritas como geneticamente distintas (não clonais), mesmo aquelas em íntima proximidade. Sugere-se que essas lesões podem emergir de múltiplos focos neoplásicos e evoluir independentemente, apresentando implicações significantes nos mecanismos moleculares da doença (Bostwick *et al.*, 1998; Macintosh *et al.*, 1998).

A heterogeneidade e a multifocalidade das lesões de próstata combinadas ao tamanho pequeno da glândula torna difícil a obtenção de material homogêneo e em quantidade suficiente para análise molecular. Estes fatores representam uma limitação significativa na identificação de genes associados à carcinogênese prostática, assim como os mecanismos moleculares envolvidos na iniciação e progressão deste carcinoma (Epstein e Potter, 2001).

Em geral, o desenvolvimento do CaP é lento e sem manifestações clínicas, sendo que aproximadamente 75% dos pacientes já apresentam doença local extensa ou metástase quando diagnosticadas (Foster e Ke, 1997). Em vista disso, os estudos se voltaram para o diagnóstico precoce da doença, sendo que os níveis séricos do PSA são os mais amplamente utilizados na rotina clínica.

Os fatores primários utilizados como indicadores prognósticos do CaP são estadiamento, grau histológico e PSA (Koff et al., 2005). O estadiamento se refere à extensão/tamanho do tumor primário (T) e, portanto, a capacidade de invasão e de disseminação da neoplasia. Os adenocarcinomas de próstata são classificados por um dos sistemas de estadiamento disponíveis (TNM proposto pela AJCC) (Billis, 2003). É considerada também a ausência ou presença da extensão de metástase em linfonodos regionais (N) e a ausência ou presença de metástase à distância (M) (Epstein et al., 2004). Segundo o sistema TNM, os tumores pT1 são do tipo incidental, ou seja, encontrados acidentalmente em ressecções por hiperplasia nodular de próstata ou em necropsias. Dependendo do tamanho no órgão primário, podem-se considerar os tumores pT2 (confinados na próstata), sendo subdivididos em pT2a (apresentam 50% ou menos de envolvimento de um lobo), pT2b (envolvem mais de 50% de um lobo) e pT2c (envolvem ambos os lobos). Os tumores pT3 são subdivididos em pT3a (apresentam extensão extra-prostática) e pT3b (apresentam invasão das vesículas seminais). Os tumores pT4 são aqueles fixados ou invadindo as estruturas adjacentes, além das vesículas seminais, colo da bexiga, esfíncter externo, reto, músculos elevadores do ânus e/ou parede pélvica.

Quando diagnosticados, os adenocarcinomas de próstata são graduados pelo sistema de Gleason (Gleason, 1992). Esse sistema inclui cinco padrões histológicos do tumor, indicados por escores de 1 a 5, dependendo do grau de indiferenciação crescente da neoplasia. O escore da graduação histológica de Gleason resulta da soma dos dois padrões histológicos neoplásicos mais prevalentes em determinado tumor, de modo que varia de 2 (quando existe só o padrão 1 - bem diferenciado - escore 1+1) até 10 (ou 5+5) quando todo o tumor é praticamente indiferenciado. 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 a 4 são classificados como bem diferenciados; 5, 6 e 7 (ou 3+4) como moderadamente diferenciados, e 7 (ou 4+3), 8 a 10 como pouco diferenciados. Um escore 7 de Gleason pode, além disso, ser subclassificado com [3+4] ou [4+3] como exemplificado acima e o pior prognóstico associado com [4+3] pode afetar a decisão ao tratamento (DeMarzo *et al.*, 2003).

Tem sido proposto que pacientes com escore de Gleason 7 poderiam estar associados à falha no tratamento da braquiterapia. Neste sentido, Merrick *et al.* (2007) avaliaram o impacto do escore de Gleason 7 na sobrevida de pacientes tratados por radioterapia. Os autores demonstraram que o escore de Gleason não influencia a sobrevida global nestes dois grupos de pacientes.

O valor de PSA considerado normal (até 4,0 ng/mL) até o momento tem se mostrado eficiente na detecção da doença em estágios em que a terapia tem alto potencial de cura (prostatectomia radical). Entretanto, como já mencionado anteriormente, 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 familial para esta neoplasia e tumores hormônio-independentes (DeMarzo *et al.*, 2007).

Pacientes com CaP após prostatectomia radical 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. Valores de PSA $\geq 0,2$ ng/mL estão relacionados com recorrência bioquímica indicando recorrência local da doença e predição de metástases a distância (Stephenson *et al.*, 2006).

O PSADT (PSA *doubling-time*) tem se mostrado um método eficiente para melhorar a sensibilidade do PSA em predizer 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, quanto menor o PSADT maior é a chance de recorrência tumoral (Roberts *et al.*, 2006).

Segundo Partin *et al.* (1997), a combinação dessas três variáveis, estadiamento, escore de Gleason e PSA, 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*. A tabela 1 mostra os critérios utilizados para categorização do risco de recorrência.

RISCO DE	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E
RECORRÊNCIA	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

Tabela 1. Critérios considerados na análise de risco segundo características clínicas e morfológicas.

Adaptado de NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology ^{TM:} Prostate Cancer, V2, 2007.

Outra característica com importância prognóstica é a capacidade de o tumor invadir as estruturas angiolinfáticas, a qual não é abordada pelo sistema TNM. Antunes *et al.* (2006) avaliaram a relação da invasão microvascular (MVI) com outras características patológicas e sugeriram 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 da doença comparados aos 20,2% dos pacientes sem MVI (*P*<0,001). Além disso, a MVI se mostrou uma característica prognóstica independente da recorrência bioquímica.

Os conhecimentos desses fatores, que tem papel prognóstico e preditivo, repercutem sobre os cuidados ministrados ao paciente e sobre as pesquisas na área. No entanto, os adenocarcinomas de próstata são heterogêneos em seus aspectos clínicos, morfológicos e biomoleculares. Em geral, os marcadores utilizados para prever a progressão da doença não correspondem de forma satisfatória à evolução dos pacientes e, portanto, há necessidade de identificação de marcadores novos e mais efetivos.

4. Alterações Genéticas e Epigenéticas

Alterações genéticas e epigenéticas fundamentam o rompimento das vias de sinalização celular no câncer. Os oncogenes podem se apresentar com expressão aumentada por ganho no número de cópias de DNA, amplificação gênica, translocações e mutações em ponto, e os genes supressores de tumor podem ser inativados pela perda de cromossomos, grandes deleções, deleções intragênicas e mutações em ponto. Estas constituem as principais alterações genéticas observadas no câncer.

Entretanto, está claro como o silenciamento epigenético de genes supressores de tumor, os quais podem ser considerados funcionalmente equivalentes a mutações e deleções, atua no desenvolvimento do câncer (Jones *et al.*, 2002; Herman *et al.*, 2003). Acredita-se que eventos genéticos e epigenéticos nos dois alelos de genes supressores tumorais poderiam ser responsáveis pela inativação destes genes na carcinogênese (Figura 2).



Figura 2. Esquema representativo dos mecanismos de inativação bialélica em genes supressores de tumor. Se o primeiro alelo está metilado, o segundo alelo pode ser inativado por metilação, deleção ou mutação em ponto. A sequência de eventos inativadores pode ocorrer em qualquer ordem, por exemplo, a inativação por mutação em ponto pode ser o primeiro evento seguido por metilação (Modificado de Gronbaek *et al.*, 2007).

A epigenética está relacionada a alterações na expressão dos genes que são constitutivamente herdadas e que não envolvem uma mudança na seqüência do DNA (Wu e Morris, 2001). Refere-se ainda a um conjunto de alterações que atua em associação com a seqüência do DNA na determinação da expressão gênica (Dobosy *et al.*, 2007). Assim, os 24 mecanismos epigenéticos podem ser classificados em metilação do DNA, acetilação e outras modificações covalentes das histonas que empacotam o DNA formando a cromatina (modificações nucleares herdadas), além dos RNA de interferência (RNAi) (Figura 3).



Figura 3. Esquema representativo dos diferentes tipos de alterações epigenéticas. A metilação do DNA é uma modificação covalente da citosina (C) que está localizada na posição 5' a uma guanina em um dinucleotídeo CpG. Modificações nas histonas (cromatina) incluem as modificações covalentes posteriores à tradução e das caudas N-terminais dos quatro cores de histonas (H3, H4, H2A e H2B). O mais recente mecanismo epigenético de herança envolve RNAs, o qual pode alterar a expressão gênica de maneira hereditária. (Modificado de Sawan *et al.*, 2008)

O termo "metilação do DNA" é usado para descrever a modificação pós-duplicação do DNA, no qual um nucleotídeo adquire um grupamento metil covalentemente ligado (Bird, 1986). A 5-metilcitosina é o único nucleotídeo metilado no DNA humano e, como isto produz uma modificação na informação genômica e não uma variação na seqüência do DNA, este processo é chamado epigenético (Wang e Leung, 2004). A metilação dos genes ocorre primariamente na região promotora que freqüentemente contem ilhas de CpG. Ilhas de CpG são definidas como regiões de DNA maiores que 200 pb com conteúdo de [C+G] maior do que 50% e onde a freqüência de sítios CpG é igual ou superior à esperada (Gardiner-Garden e Frommer, 1987). Entretanto, mais recentemente, Takai e Jones (2002) propuseram critérios mais estringentes para caracterizar uma ilha de CpG. Os autores sugeriram que as seqüências de DNA devem ser maiores que 500pb e apresentar um conteúdo de [C+G] igual ou superior a 55%, sendo este critério amplamente aplicado na literatura.

O processo de metilação, ainda parcialmente entendido, é caracterizado pelo excesso de metilação de seqüências ricas em CpG, presentes nas regiões promotoras de 50-60% dos genes humanos (Ushijima, 2005; Dobosy *et al.*, 2007). A metilação é catalisada por DNA-metiltransferases (DNMTs) e pode ser revertida por desmetilases ou tratamento com drogas desmetilantes como a *5-aza-C* (Goffin e Eisenhauer, 2002; Nelson *et al.*, 2007).

As principais enzimas envolvidas no estabelecimento e na manutenção do padrão de metilação são a DNMT3A e a DNMT3B, chamadas metiltransferases *de novo*, ou seja, aquelas que efetuam novas metilações em locais do DNA não metiladas, ou mesmo na hélice oposta de DNA, para iniciar a metilação. As DNMT1 são metiltransferases de manutenção, que asseguram que o padrão de metilação seja fielmente copiado em cada divisão celular (Klose *et al.*, 2006).

Em adição aos mecanismos gênicos clássicos envolvendo alterações cromossômicas e mutações em ponto, os genes podem ser funcionalmente ativados ou inativados por metilação do DNA (Perry *et al.*, 2006). As ilhas de CpG, são conservadas durante a evolução, portanto não metiladas, conduzindo a expressão gênica. A metilação destas ilhas pode resultar no silenciamento transcricional de genes por vários mecanismos: 1) inibição da ligação de fatores de transcrição sensíveis à metilação (Hark *et al.*, 2000); 2) as metil-citosinas interagem com as histonas desacetilases (HDACs), que por sua vez promovem o remodelamento da cromatina e condensação da mesma, impedindo o acesso de fatores de transcrição; e 3) a

inacessibilidade de fatores promotores de transcrição (Burgers *et al.*, 2002; Wiencke *et al.*, 2008).

As relações entre a metilação do DNA e as modificações das histonas tem sido alvo de muitos estudos. Os nucleossomas, unidade fundamental da cromatina consistindo de 146 pb de DNA genômico envolvido ao redor de um octâmero de quatro cores de histonas, estão sujeitos a diferentes modificações incluindo a acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação. A modificação das histonas pode ser mantida pela divisão celular, sendo então consideradas como verdadeiro mecanismo epigenético herdado (Strahl *et al.*, 2000; Jenuwein *et al.*, 2001). Tem-se mostrado que diferentes modificações das histonas são essenciais para o processo normal da célula. Por exemplo, a acetilação das histonas e a metilação estão intimamente ligadas à transcrição do gene, reparo e duplicação dos produtos gênicos, estão implicadas nas neoplasias humanas. Desta forma, as modificações das histonas no câncer e em outras doenças estão se tornando amplamente reconhecidas (Jones *et al.*, 2002; Feinberg *et al.*, 2004; Hake *et al.*, 2004).

RNAs não codificantes representam a mais recente classe de mecanismos epigenéticos, onde pequenos RNAs (microRNAs) podem manter a transcrição do gene de maneira hereditária (Bartel, 2004; Ambros, 2004). Os microRNAs regulam a expressão gênica em nível pós transcricional por meio do complexo (RISC) (complexo de silenciamento RNA induzido). Vários estudos recentes envolvem alterações dos microRNAs em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral e progressão metastática (Calin *et al.*, 2006). Ma *et al.* (2007) sugerem que o funcionamento de uma via regulatória inclui um fator de transcrição pleiotropico que induz a expressão de um microRNA específico, o qual suprime o alvo diretamente e, por sua vez ativa outro gene pró-metastático, podendo levar a invasão de células tumorais e metástase.

Hammond (2006) demonstrou que alguns miRNAs se ligam especificamente e bloqueiam a tradução de mRNAs de supressores de tumor e proto-oncogenes, e assim eles mesmos passam a atuar como oncogenes e supressores de tumor, respectivamente. Lu *et al.* (2005) realizaram a comparação entre os perfis de expressão dos tecidos normais e tumorais e demonstraram que uma maioria dos miRNAs não são expressos no câncer, e um mecanismo pelo qual isso ocorre é o silenciamento epigenético.
Em resumo, as associações dos eventos epigenéticos são essenciais para a regulação dos diversos processos celulares e, a interrupção do estado epigenético "normal" pode despertar eventos iniciadores de fenótipos anormais e doenças. Assim, considerando-se que o câncer pode evoluir da expressão anormal de genes e a perda da metilação do DNA está associada com a expressão gênica, Holliday (1979) sugeriu que uma falha na metilação do DNA poderia perturbar a regulação gênica, e seria um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer.

5. Metilação do DNA e silenciamento gênico

Em células tumorais foram identificados dois padrões distintos de alterações no perfil de metilação do DNA: o primeiro refere-se à hipometilação generalizada do genoma e o segundo, a hipermetilação que se apresenta restrita às ilhas de CpG (Laird, 2003). Baseados nestes dois padrões, algumas hipóteses foram propostas para relacionar esta alteração epigenética com o processo da carcinogênese: a perda da metilação poderia ativar a expressão de proto-oncogenes quiescentes, ativando uma cascata de eventos que culminaria com a transformação maligna; ou, alternativamente, a metilação aumentada em sítios previamente não metilados, como a região promotora de um gene supressor de tumor, que poderia resultar na sua inativação pela inibição da transcrição e conseqüente incapacidade de suprimir a proliferação celular (Gonzalgo e Jones, 2002; Perry *et al.*, 2006; Dobosy *et al.*, 2007). Além disso, níveis alterados de metilação, especialmente hipometilação, podem causar instabilidade genômica e, conseqüentemente levar à formação de tumores (Fazzari e Greally, 2004; Ushijima, 2005).

Para a identificação de genes que são inativados pela metilação é preciso investigar uma região genômica sabidamente responsável pelo seu silenciamento. Como a condição metilada é variável dentro de uma mesma ilha, apenas uma porção relativamente pequena (*core*) abrangendo o sítio de início da transcrição está consistentemente associada ao silenciamento gênico. Porém, quando se pretende isolar um marcador para a doença, o efeito sobre a transcrição gênica não é importante, mas sim o estabelecimento de uma estreita associação entre as modificações no padrão de metilação de ilhas de CpG específicas e o fenótipo. Desta forma, a associação entre a presença de metilação tumor específica numa dada ilha de CpG pode ser um achado prognóstico relevante, mesmo não promovendo o silenciamento gênico (Ushijima, 2005).

6. Alterações Genéticas e Epigenéticas no Câncer de Próstata

Na maioria das vezes, a metilação do DNA tem o mesmo papel crítico dos fatores genéticos relacionados à iniciação do câncer de próstata. Essa hipótese é apoiada pela observação de que a metilação medeia a inativação de vários genes, especialmente aqueles envolvidos na carcinogênese e nos mecanismos de reparo a danos do DNA que ocorrem em lesões pré-malignas da próstata. Todos estes eventos são seletivos para o aumento da taxa de crescimento e levam as alterações fenotípicas irreversíveis do carcinoma pela expansão clonal. Subseqüentemente, a inativação epigenética de genes envolvidos no controle do ciclo celular, transdução de sinal e resposta hormonal está relacionado com o câncer de próstata avançado (Perry et al., 2006; Reynolds, 2008). Aitchison et al. (2008) compararam os resultados das análises de MS-PCR (Methylation Specific-Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) e CGH-arrays (Comparative Genomic Hybridization-arrays) quanto ao padrão de metilação, expressão e o número de cópias, respectivamente, do gene SMAD4, um supressor tumoral conhecido como transdutor da via de sinalização do TGF- β , em amostras de cânceres de próstata avançados. O grupo encontrou correlação entre a metilação do promotor de SMAD4 e a perda de expressão deste gene nas mesmas amostras, reforçando a importância das mudanças epigenéticas na expressão de genes importantes para o desenvolvimento e progressão do CaP.

Vários genes com alterações no padrão de metilação foram correlacionados com as diferentes etapas de progressão do câncer de próstata (Li LC *et al.*, 2004; Li e Dahija, 2007). A hipermetilação na região promotora do gene *GSTP1* foi relatada em mais de 70% dos CaP primários, porém raramente detectada em tecidos prostáticos normais ou em tecidos prostáticos hiperplásicos benignos (Harden *et al.*, 2003; Nakayama *et al.*, 2003; Yegnasubramanian *et al.*, 2004; Lodygin *et al..*, 2005a; Meiers *et al.*, 2007). Entretanto, a metilação neste gene foi também encontrada em atrofias proliferativas inflamatórias da próstata, uma entidade limitada que tem sido associada ao desenvolvimento de CaP (Nakayama *et al.*, 2003). A hipermetilação do gene *RARB* também tem sido associada ao

processo tumorigênico prostático. Há relato de acúmulo progressivo de células neoplásicas com alelos metilados no gene *RARB* avaliadas em neoplasias prostáticas intra-epiteliais de alto grau para CaP (Jeronimo *et al.*, 2004a).

Outros genes que tem sido relacionados como envolvidos no CaP são o APC (Kang et al., 2004), MDR1 (Yegnasubramanian et al., 2004), entre outros como HIC1 (Yamanaka et al., 2003) e GPX6 (Lodygin et al., 2005a). A Figura 4 apresenta alguns genes em que foram identificados padrões de metilação anormal como GSTP1 (Singal et al., 2001), MGMT (Fu et al., 2004), RASSF1A (Liu et al., 2002), RARB (Nakayama et al., 2001), CDH1 ou E-caderina (Graff et al., 1995).

Vários estudos tem demonstrado que o índice de metilação, definido como a proporção de genes metilados em relação ao número total de genes analisados, tem correlação com os indicadores clinicopatológicos de pior prognóstico (Maruyama *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2004; Bastian *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2007). Entre os genes associados com parâmetros prognósticos no câncer de próstata estão incluídos o *LAMA3* (Sathyanarayana *et al.*, 2003), *HIN-1* (Shigematsu *et al.*, 2005), *CDH13* (Maruyama *et al.*, 2002), *Cyclin D2* (Padar *et al.*, 2003), *TIG1* (Zhang *et al.*, 2004) e *ASC* (Collard *et al.*, 2006). Para alguns genes, como *APC*, *CD44*, *CDH1*, *MDR1*, *RARB* e *RASSF1A*, as correlações observadas precisam ser confirmadas em estudos mais robustos, pois os resultados são inconsistentes (Maruyama *et al.*, 2002; Yamanaka *et al.*, 2003; Enokida *et al.*, 2004; Jeronimo *et al.*, 2004a, 2004b; Kang *et al.*, 2004).



Figura 4. Alterações epigenéticas para os estágios iniciais do câncer de próstata, progressão e metástase. Uma série de fatores tais como alterações genéticas, idade, dietéticos e ambientais contribuem para a carcinogênese da próstata. É provável que a metilação do DNA desempenhe a mesma função crítica como os fatores genéticos no início do câncer de próstata, o que é suportado pela observação que a inativação mediada por metilação de vários genes, especialmente de genes envolvidos no metabolismo da carcinogênese e dano de reparo ao DNA como *GSTP1* e *MGMT*, ocorrem com freqüência em lesões pré-malignas da próstata, que, por sua vez, provocam alterações genéticas em células afetadas. Todos estes acontecimentos são seletivos para aumentar a taxa de crescimento e conduzir a irreversíveis alterações de fenótipo do carcinoma através da expansão clonal. Posteriormente, a inativação epigenética simultânea de genes envolvidos no controle do ciclo celular, transdução de sinal e resposta a efeitos hormonais fornece uma vantagem no crescimento, conduzindo ao câncer de próstata avançado. Porém, a perda de função de genes de vias de invasão tumoral/metástase como *APC*, *CDH1* e *CD44* faz com que células tumorais se abalem e formem sub-clones em sítios distantes (Modificado de Li LC *et al.*, 2004).

Alguns estudos mostraram que as freqüências de metilação para o gene *CDH1*, como também para os genes *PTGS2* e *RUNX3*, tem apresentado correlação com alto risco de recorrência bioquímica independentemente do escore de Gleason ou do estadio patológico (Maruyama *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2004; Yegnasubramanian *et al.*, 2004). Em adição, estudos quantitativos tem demonstrado uma relação entre níveis crescentes de metilação para certos genes (*GSTP1, APC, RARB e EDNRB*) em tumores com estadios patológicos avançados e/ou escore de Gleason (Jeronimo *et al.*, 2004b; Yegnasubramanian *et al.*, 2004). Liu *et al.* (2008) relataram uma correlação positiva entre a metilação do promotor de *MCAM*, uma molécula de adesão celular, e o estadio do tumor ou escore de Gleason em carcinomas prostáticos primários, sugerindo que a hipermetilação do promotor de *MCAM* pode ser marcador diagnóstico no câncer de próstata humano.

Patra e Bettuzzi (2007) relataram que muitas moléculas de adesão de superfície celular, de matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*) e proteínas sinalizadoras (como E-caderina, catenina, CD44, MMP-9 e caveolina-1) estão ausentes ou diminuídas como resultado da hipermetilação das ilhas de CpG no promotor destes genes em tumores menos agressivos. Porém, estas proteínas voltam a se expressar em carcinomas mais agressivos devido a perda da metilação das ilhas de CpG. Este fenômeno tem sido relatado em carcinomas de pulmão metastático, prostático e sarcomas.

Liu *et al.* (2008), por meio da análise quantitativa MSP (qMSP) e RT-PCR, relataram pela primeira vez que o gene *SSBP2* é hipermetilado em câncer de próstata e levando a alteração na expressão da proteína SSBP2. A expressão induzida de SSBP2 é capaz de inibir o crescimento celular levando à parada do ciclo celular em células tumorais prostáticas, revelando seu papel na tumorigênese do CaP.

Na busca de melhorar a sensibilidade e especificidade de marcadores moleculares alterados por metilação e com potencial de serem utilizados no diagnóstico de câncer, Hoque *et al.* (2005) examinaram a hipermetilação do promotor de nove genes distintos na urina de 52 pacientes com e sem CaP. A combinação de quatro genes (*TP16, ARF, MGMT* e *GSTP1*) foi capaz de detectar 87% dos pacientes com CaP com 100% de especificidade. Rouprêt *et al.* (2007) analisaram a hipermetilação do promotor de 10 genes distintos na urina de 95 pacientes com e sem CaP e verificaram que a combinação de quatro deles (*GSTP1, RASSF1A, RARB* e *APC*), contribui para uma melhor discriminação dos pacientes com CaP malignos dos não malignos.

Técnicas de triagem em larga escala do genoma na avaliação de metilação aberrante das ilhas de CpG tem sido usadas para identificar marcadores epigenéticos prostátaespecíficos. Chung *et al.* (2008) realizaram amplificação das ilhas de CpG metiladas (MCA) acoplado com análise representativa diferencial (RDA) (Toyota *et al.*, 1999) em linhagens celulares de CaP. O grupo isolou 34 clones correspondentes às ilhas de CpG em regiões promotoras, incluindo cinco alvos repórteres de hipermetilação em câncer. Em seguida, os autores confirmaram 17 das ilhas de CpG por outras técnicas incluindo o pirosequenciamento. Assim, após a comparação entre tumores primários e tecidos normais adjacentes foram identificados como marcadores candidatos em CaP os genes *NKX2-5, CLSTN1, SPOCK2, SLC16A12, DPYS* e *NSE1*. Estes genes apresentavam um padrão de metilação variando de 50% a 85%. Foi observada uma sensibilidade de 80% e especificidade de 95% na diferenciação entre o câncer e o tecido normal quando foram incluídos os dois genes hipermetilados *NSE1* e *SPOCK2*.

Os genes *CDH1*, *SFN* (14-3-3 σ), *RARB*, e *RASSF1* avaliados neste estudo estão alterados por hipermetilação. A Tabela 2 apresenta os processos celulares que estes genes participam.

Tabela 2. Genes hipermetilados envolvidos em processos celulares no câncer de próstata (modificado de Li e Dahija, 2007).

PROCESSOS CELULARES	GENES HIPERMETILADOS
Invasão de célula tumoral/arquitetura tumoral	APC, CAV1, CD44, CDH1 , CDH13
Resposta hormonal	AR, ESR1, ERS2, RARB , RARRES1
Controle do ciclo celular	CCND2, CDKN2A, CDKN1A, SFN
Transdução de sinal	DAB2IP, DAPK1, EDNRB, RASSF1

7. Gene CDH1 [cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)]

O gene *CDH1*, mapeado em 16q22.1, codifica a proteína E-caderina, envolvida no sistema de adesão celular caderina-catenina, responsável pela preservação da arquitetura normal dos tecidos (Kemler, 1993). As caderinas pertencem a uma família de proteínas

transmembranas com a função primária de mediar a adesão intercelular essencial para a manutenção da arquitetura tecidual normal (Gumbiner, 1996). É uma glicoproteína de 120kDa e possui três domínios, o extracelular, o transmembrânico e o domínio intracelular (Overduin *et al.*, 1995). O domínio citoplasmático das caderinas interage com proteínas como as cateninas e ancoram o citoesqueleto. Além disso, suas funções são dependentes da presença de cálcio extracelular (Takeichi, 1991).

Em carcinomas humanos, a perda da expressão da E-caderina foi correlacionada a vários fatores associados com pior prognóstico, incluindo grau do tumor, estadio e ploidia em tumores de esôfago, cólon, mama, nasofaringe, ducto biliar, estômago e próstata (Frixen *et al.*, 1991; Kallakury *et al.*, 2001; Caldeira *et al.*, 2006; Mol *et al.*, 2007; Masterson e O'Dea, 2007). Os principais mecanismos que levam à diminuição da expressão gênica de *CDH1* são as deleções envolvendo 16q22 (Cher *et al.*, 1996; Gibbs *et al.*, 2000; Suarez *et al.*, 2000; Saramaki e Visakorpi, 2007) ou a metilação anormal da sua região promotora (Graff *et al.*, 1995; Kallakury *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005).

Ikonen *et al.* (2001) e Jonsson *et al.* (2002) analisaram mutações do gene *CDH1* em linhagens germinativas de CaP e a associação destas mutações com síndromes familiais de cânceres de mama, gástrico e prostático; entretanto as mutações identificadas não se mostraram significativamente associadas com estes tipos tumorais, sugerindo que outros genes desconhecidos possam estar envolvidos. Mais recentemente, foi verificado que mutações raras individuais e polimorfismos do gene *CDH1* (-160C/A; rs16260) podem explicar uma pequena proporção dos CaP hereditários e/ou familiais (Jonsson *et al.*, 2004; Lindström *et al.*, 2005).

A metilação em graus variáveis do promotor do gene *CDH1* e a expressão reduzida da proteína foram detectadas nos tumores de próstata (Kang *et al.*, 2004; Musial *et al.*, 2007). Li *et al.* (2001) verificaram que as amostras tumorais de próstata que mostravam metilação no promotor do gene *CDH1* ocorrem em uma freqüência de 30% nas amostras de baixo grau e 70% nas amostras tumorais de alto grau. Em adição, o processo de metilação foi associado com ausência ou redução da expressão protéica da E-caderina detectado por análise de imunohistoquimica (IHQ). Estes dados são consistentes com os resultados obtidos por Kallakury *et al.* (2001), que detectaram uma prevalência de 80% de metilação de *CDH1* em amostras com CaP. Estes autores observaram também uma associação positiva entre aumento da metilação do promotor do gene *CDH1* e progressão do tumor, sugerindo que este poderia

ser um biomarcador de progressão nos cânceres de próstata. Além disso, outros autores detectaram a redução da expressão de E-caderina em subgrupos de CaP agressivos (Richmond *et al.*, 1997; Umbas *et al.*, 1994).

Resultados discordantes tem sido publicados quanto aos níveis de metilação e da expressão da proteína no CaP, bem como sua associação com pior prognóstico (Rubin *et al.*, 2001). Em carcinomas mamários, Caldeira *et al.* (2006) relataram que a hipermetilação do gene *CDH1* foi observado em 72% dos casos enquanto que os níveis reduzidos da proteína E-caderina foram observados em 85% das amostras. Embora não significativos, os níveis de expressão da proteína tendiam a diminuir com a metilação da região promotora do gene *CDH1*. Segundo os autores, a natureza dinâmica da regulação epigenética incluindo alterações no padrão de metilação do DNA, na expressão e/ou função dos fatores trans-ativadores e efeitos mediados na cromatina, podem explicar a falta de uniformidade da hipermetilação de *CDH1* e a perda da expressão da proteína E-caderina observada pela análise imunohistoquímica.

Acredita-se que a progressão metastática dos tumores epiteliais mais comuns envolve a perda transitória e heterogênea da expressão da E-caderina. Graff *et al.* (2000) utilizando um modelo *in vitro* de tumor epitelial (células de carcinoma de mama) e propuseram um modelo de hipermetilação dinâmico e heterogêneo associado ao processo tumoral e metastático. Os autores sugerem que no início do processo tumoral são geradas células com diferentes graus de metilação no gene *CDH1*. As células com maiores níveis de metilação e níveis reduzidos da expressão da proteína teriam mais chance de se dissociar do tumor primário e se alojar num órgão distal secundário. Neste órgão, a sobrevivência da célula dependeria da redução dos níveis de metilação e conseqüente restauração parcial da expressão da E-caderina, que pode ser em parte modulada e/ou selecionada pelo microambiente do tumor.

Rubin *et al.* (2001) analisaram a expressão da E-caderina em tumores benignos de próstata clinicamente localizados e CaP metastáticos em uma plataforma de *tissue microarray* (TMA) por imunohistoquímica. O estudo demonstrou um largo espectro da expressão de E-caderina no carcinoma prostático. Os CaP clinicamente localizados, tratados somente com cirurgia, apresentaram um elevado nível de expressão da E-caderina. Foi observada uma associação significativa entre a expressão diminuída da E-caderina e tumores maiores, como também, para níveis maiores de escore de Gleason, margens cirúrgicas positivas e alto nível de PSA. Nos CaP metastáticos refratários a hormônios foi encontrada expressão aumentada da

E-caderina e somente alguns casos apresentaram expressão diminuída. Estes achados são consistentes com o modelo de hipermetilação transitória do gene *CDH1*, levando a baixa regulação da E-caderina em CaP localizados e sua expressão normal ou aumentada em CaP metastáticos.

Resumidamente, estes estudos indicam que a perda da E-caderina pode promover a invasão e agressividade tumoral enquanto a re-ativação da expressão poderia facilitar a sobrevivência das células metastáticas. Embora os mecanismos envolvidos neste processo não são ainda bem conhecidos, sugere-se que a perda da E-caderina seja um dos eventos associados ao processo de transição epitélio-mesênquima (EMT), que tem sido considerado como um pré-requisito para a infiltração tumoral e metástase (Kang e Massague, 2004; Christiansen e Rajasekaran, 2006). Neste sentido, Gravdal *et al.* (2007) avaliaram a expressão de algumas moléculas de adesão celular em 104 CaP e sugeriram a importância do mecanismo de transição epitélio-mesênquima na progressão e prognóstico do câncer de próstata. Os autores relataram um aumento na expressão da N-caderina e a diminuição de E-caderina. Previamente, demonstrou-se que níveis aumentados da N-caderina solúvel estava presente no soro de pacientes com CaP (Kuefer *et al.*, 2005; Derycke *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem que este gene pode ser um marcador de evolução da EMT e progressão dos carcinomas de próstata.

Van Oort *et al.* (2007) analisaram por IHQ o padrão de expressão da E-caderina, cateninas-alpha, -beta, -gama e -delta 1, em 65 amostras de CaP. Os autores detectaram correlação entre a expressão de E-caderina e as outras moléculas. Uma correlação inversa significativa foi encontrada entre os membros imunorreativos do complexo da E-caderina e o escore de Gleason. Segundo os autores, a catenina-alfa foi um bom marcador prognóstico em pacientes com CaP.

Recentemente, Saha *et al.* (2008) analisaram por imunohistoquímica a expressão de Ecaderina e catenina-beta em hiperplasias prostáticas benignas, CaP primários e CaP metastáticos. O estudo demonstrou que a expressão elevada de E-caderina e catenina-beta estão significantemente associados ao CaP metastático e que a alta freqüência de expressão sugere seu envolvimento na adesão celular das células metastáticas.

Em resumo, são conflitantes os dados da literatura referentes aos níveis de metilação do gene *CDH1* bem como da proteína E-caderina e sua relação com a evolução clínica dos carcinomas de próstata.

Dentre os vários genes envolvidos na regulação das vias de transdução de sinais empregados no controle da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência encontra-se a família gênica *14-3-3*, com alta homologia e conservação entre as espécies, codificante das isoformas alfa, beta, delta, sigma, tau e zeta, que são expressas em todas as células eucarióticas (Fu *et al.*, 2000). As proteínas 14-3-3 participam da sinalização da adesão integrina-dependente, organização do citoesqueleto, controle do ciclo celular em resposta ao estresse genotóxico e transformação tumoral (Fu *et al.*, 2000).

Das isoformas da família 14-3-3, a sigma (σ) ou estratifina (14-3-3 σ) é a única diretamente ligada ao câncer. O gene SFN está localizado em 1p36.11 e codifica uma proteína dimérica de aproximadamente 30 kDa responsável pelo controle do *checkpoint* da fase G₂/M do ciclo celular em resposta a danos no DNA (Hermeking *et al.*, 1997; 2003; revisado em Lodygin e Hermeking, 2006). Defeitos nos *checkpoints* do ciclo celular podem resultar em mutações gênicas, alterações cromossômicas e aneuploidias, levando a modificações permanentes no genoma (Paulovich *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999; Lodygin *et al.*, 2004). Estudos funcionais confirmaram o envolvimento da proteína SFN no controle do ciclo celular. A proteína SFN, regulada pelo gene *TP53*, é ativadora de tirosina quinase-dependente e inibidora endógena da proteína quinase C (Chan *et al.*, 2000; Pellegrini *et al.*, 2001). A perda da expressão de SFN está envolvida com a formação do tumor *in vivo*, sugerindo seu papel como supressora tumoral (Hermeking, 2005; revisado em Lodyngin e Hermeking, 2006).

No mínimo três mecanismos já são conhecidos como sendo reguladores do gene *SFN*. O primeiro é a via TP53: após o dano no DNA, a expressão da proteína TP53 leva a ativação de SFN, resultando no seqüestro da ciclina-B1 no citoplasma, impedindo-a de entrar no núcleo e assim, evitando a iniciação da mitose (Taylor e Stark, 2001; revisado em Lodygin e Hermeking, 2006). A segunda via envolve a proteína EFP (*estrogen finger protein*) em órgãos influenciados pelo estrógeno, tais como a mama e a próstata. EFP se liga a SFN levando a sua degradação, o que permite a proliferação ilimitada das células tumorais (Ikeda *et al.*, 2000; Nalepa e Harper, 2002; revisado em Lodygin e Hermeking, 2006). Em terceiro, a diminuição da expressão da proteína SFN devido a hipermetilação de ilhas de CpG tem sido observada em vários cânceres humanos tais como de pulmão, vulva, cólon, fígado, mama, próstata e pele (Ferguson *et al.*, 2000; Herman e Baylin, 2003; Lodygin *et al.*, 2003; Mhawech *et al.*, 2005;

Oshiro *et al.*, 2005; revisado em Lodygin e Hermeking, 2006). Estes dados sugerem que a perda da expressão da SFN pode estar envolvida na progressão tumoral (Lodygin *et al.*, 2005b; Horie-Inoue e Inoue, 2006).

Inicialmente, achava-se que a alta freqüência de metilação na ilha de CpG do *locus SFN*, detectada em linhagens de células de CaP, era resultado de prolongadas passagens dessas células *in vitro*. Entretanto, foi observado que tumores primários de próstata apresentavam a metilação anormal, caracterizando um evento carcinoma específico (Lodygin *et al.*, 2004). A perda da expressão da isoforma SFN é causada mais freqüentemente pela hipermetilação do que por deleção ou mutação (Iwata *et al.*, 2000; Osada *et al.*, 2002; Oshiro *et al.*, 2005). Em concordância, Suzuki *et al.* (2000) relataram o restabelecimento da expressão de SFN por agentes desmetilantes do DNA (como por exemplo, 5-aza-2'-deoxicitidina) que normaliza o controle do ciclo celular. Um grande número de carcinomas invasivos, incluindo carcinomas de células basais (Lodygin *et al.*, 2003), cânceres de próstata (Lodygin *et al.*, 2004; Mhawech *et al.*, 2005), ovário (Mhawech *et al.*, 2005), mostraram uma alta freqüência de silenciamento epigenético do gene *SFN* por metilação das ilhas de CpG (revisado em Hermeking, 2003). A perda de expressão da SFN parece ocorrer em estágios iniciais do desenvolvimento do câncer (Hermeking, 2003; Lodygin *et al.*, 2004).

Sugere-se que a diminuição de expressão da proteína SFN está envolvida na tumorigênese prostática, o que foi confirmado pela diminuição de sua expressão nas linhagens prostáticas tumorais LNCaP, DU145 e PC3. No entanto, os mecanismos de regulação deste gene nestas linhagens parecem ser diferentes. Enquanto a diminuição de expressão é mediada por metilação do gene *SFN* na linhagem LNCaP, nas linhagens DU145 e PC3 o controle da expressão da proteína parece ser mediado por degradação proteossômica (Urano *et al.*, 2004). Como as linhagens LNCaP são receptor de andrógeno-positivas (AR), enquanto que as linhagens PC3 e DU145 são AR-negativas, estes dados sugerem que os mecanismos que medeiam a diminuição de expressão são diferentes de acordo com a resposta ao andrógeno (revisado em Horie-Inoue e Inoue, 2006).

Análises de MS-PCR mostraram hipermetilação do gene *SFN* em 41 amostras de CaP primários (Lodygin *et al.*, 2004). Em concordância com estes achados, foi também demonstrada alta expressão da proteína 14-3-3 σ detectada por IHQ em células do epitélio de próstata normal e de hiperplasias benignas prostáticas, enquanto células de cânceres de

próstata demonstraram baixa ou ausência de expressão (Lodygin *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2004). Mais recentemente, Reinbenwein *et al.* (2007), por meio de MS-PCR, encontraram hipermetilação do gene *SFN* no soro de pacientes com cânceres de próstata refratário a hormônios (CPRH) e esta diferença foi significativa quando comparada aos controles negativos.

Uma localização nuclear da proteína SFN foi encontrada numa proporção elevada de CaP (escore Gleason > 8), entretanto o significado deste achado ainda não foi estabelecido (Huang *et al.*, 2004).

Em resumo, o gene *SFN* tem possível papel de supressor tumoral e sua expressão é freqüentemente reduzida ou diminuída em cânceres de mama e próstata. O silenciamento epigenético por metilação de ilhas de CpG, inativação do *TP53*, e proteólise dependente de proteossomas são responsáveis pela perda da expressão de SFN. O padrão de metilação do gene *SFN* e os níveis de expressão da proteína podem ser marcadores prognósticos do câncer, e reagentes que induzem a desmetilação do gene *SFN* ou que inibem a proteólise proteossoma-dependente da proteína podem levar ao aumento dos níveis proteicos e, portanto, serem opções terapêuticas potenciais para os cânceres (para revisão, Horie-Inoue e Inoue (2006).

9. Gene RARB (retinoic acid receptor, beta)

O gene *RARB*, localizado em 3p24, codifica o receptor de ácido retinóico-beta (RAR β), um membro da superfamília de receptores hormonais tiróide-esteróide que atua como regulador transcricional. Esse receptor, encontrado no citoplasma e em compartimentos subnucleares, liga-se ao ácido retinóico (forma biológica ativa da vitamina A), que participa da sinalização celular durante a morfogênese embrionária, crescimento e diferenciação celular (Campbell *et al.*, 1998; Dragnev *et al.*, 2000). Acredita-se que esta proteína limita o crescimento de muitos tipos celulares por meio da regulação da expressão gênica (Richter *et al.*, 2002; revisado em Soprano *et al.*, 2004 e em Xu, 2007).

Diferenças entre as ações de P1 e P2, os dois conhecidos promotores do gene *RARB* (P1 inicia a transcrição das isoformas 1 e 3 e P2 inicia a transcrição das isoformas, 2 e 4), e

splicing alternativos (Zelent *et al.*, 1991; Nagpal *et al.*, 1992; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Chambon, 1996; revisado em Xu, 2007) dão origem a quatro grandes isoformas de *RARB* em ratos (*B1, B2, B3 e B4*) e três nos seres humanos (*B1, B2* e *B4*). Isoformas adicionais (por exemplo, *RARB5* e *RARB1'*) foram também identificadas em células tumorais humanas (Peng *et al.*, 2004; Petty *et al.*, 2005).

A isoforma RAR β 2 é a mais abundante e a principal indutora do ácido retinóico e, por conseguinte, o termo RAR β em literatura normalmente refere-se a isoforma RAR β 2. A RAR β 4 é gerada por splicing alternativo das mesmas transcrições primárias que geraram a RAR β 2 e é iniciada pelo códon CUG (Nagpal *et al.*, 1992). Por isso, a isoforma RAR β 4 pode atuar estruturalmente como uma forma dominante-negativa de RAR β 2 (Chen *et al.*, 2002).

A isoforma RAR β 1 é fetal e parece ser crucial para desenvolvimento em seres humanos, sendo expressa em câncer de pulmão de pequenas células (Houle *et al.*, 1994). Berard *et al.* (2003), utilizando ratos transgênicos, relataram que RAR β 1 apresentava atividade supressora de tumor que não poderia ser inteiramente compensada pela expressão aumentada de RAR β 2 e pela supressão da RAR β 4.

Pouco se sabe ainda sobre as isoformas mais recentemente descobertas, RAR β 5 e RAR β 1'. A isoforma RAR β 5 é expressa em células tumorais de mama e esta relacionada a resistência ao acido retinóico nas células tumorais de mama estrogênio-negativas (Peng *et al.*, 2004). Demonstrou-se que a isoforma RAR β 1' tem atividade antitumoral no câncer de pulmão (Petty *et al.*, 2005).

Assim, as várias isoformas RAR β tem afinidades diferentes ao ácido retinóico (pelo menos a RAR β 2 e RAR β 4) e diferentes funções biológicas (por exemplo, RAR β 2 tem funções supressoras de tumor enquanto RAR β 4 tem propriedades oncogênicas).

Há relatos de expressão de RAR β em vários tecidos. Entre estes receptores, vários estudos tem mostrado que o nível de expressão da isoforma β 2 (RAR β 2) está diminuído em tumores de pulmão, mama, esôfago e de cabeça e pescoço (Lotan *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1997; Picard *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 1999; revisado em Alvarez *et al.*, 2007). Há evidências que este gene tem papel de supressor tumoral (Sirchia *et al.*, 2002; revisado em Alvarez *et al.*, 2007 e em Xu, 2007). Além disso, já foi demonstrado que o promotor do gene *RARB2* contém uma ilha de CpG que está intensamente metilada em diferentes tumores, como mama (Yang *et al.*, 2001), cervicais (Ivanova *et al.*, 2002), bexiga (Maruyama *et al.*, 2001) e próstata (Nakayama *et al.*, 2001).

Usando MS-PCR, Nakayama et al. (2001) detectaram hipermetilação do gene RARB2 em 80% de CaP primários (11/14 amostras) e em 90% dos carcinomas refratários a tratamento (metástases em órgão secundários, 9/10); 10 amostras de próstata normal (oriunda de necrópsia) estavam hipermetilada. Estes resultados levaram os autores a sugerir que o RARB2 é um bom marcador molecular para detecção de tumores primários. Em concordância com estes achados, Maruyama et al. (2002) observaram que a freqüência de metilação do gene RARB2 era de 53% (54/101) nos CaP e 3% (1/30) nas amostras de tecido adjacente prostático não neoplásico. Yamanaka et al. (2003) encontraram alta freqüência de metilação do gene RARB2 nos CaP (78%, 85/109), baixa freqüência em tecidos não neoplásicos e em PIN (17%, 5/30 e 20%, 4/20, respectivamente) e ausência de metilação em amostras de HPB (0/36). Utilizando PCR quantitativa para avaliar os níveis de metilação, Jeronimo et al. (2004a) relataram que, embora os CaP e os PIN de alto grau apresentassem freqüências semelhantes de metilação do gene RARB2 (97,5% e 94,7%, respectivamente), os CaP eram mais freqüentemente hipermetilados. Os autores sugeriram que eventos progressivos de metilação estariam envolvidos na carcinogênese prostática, além do acúmulo de outras alterações genéticas mais comuns. Além disso, o mesmo estudo mostrou correlação entre os níveis de metilação e estadios patológicos, mas não com o escore de Gleason. De acordo com os autores este evento ocorre no início da carcinogênese e, portanto, a utilização de agentes desmetilantes associados ao uso de retinóides poderiam trazer benefícios para o tratamento e/ou quimioprevenção do CaP (Jeronimo et al., 2004a).

Woodson *et al.* (2004b) avaliaram a metilação do gene *RARB2* por PCR quantitativa e detectaram maior freqüência de metilação nos CaP (73%, 18/24) em comparação às amostras de PIN de alto grau (30%, 3/10). Hoque *et al.* (2005) detectaram na urina de pacientes com CaP primários uma baixa freqüência de hipermetilação do gene *RARB2* (35%, 18/52).

Kwabi-Addo *et al.* (2007) avaliaram o padrão de metilação pelo método de pirosequenciamento de diversos genes implicados no câncer de próstata, entre eles o gene *RARB2*, em 90 próstatas normais e em 12 amostras pareadas de tecido não neoplásico de pacientes com CaP. Os autores detectaram correlação positiva entre a hipermetilação e a idade no grupo de próstatas normais. Além disso, os tumores mostraram que a hipermetilação era 2,7 vezes maior quando comparada com tecidos normais de indivíduos com mais de 50 anos e 2 vezes maior na comparação com as amostras normais pareadas. Estes resultados indicaram que a hipermetilação deste gene na próstata normal aumenta com a idade e que pode preceder e predispor ao CaP.

A associação entre a metilação e fatores prognósticos no CaP foi relatada por Bastian et al. (2007), que avaliaram o padrão de metilação de treze genes, incluindo RARB, em 78 amostras de CaP e 32 de HPB. Os autores encontraram uma correlação inversa entre a hipermetilação do gene *RARB* e a probabilidade de sobrevida livre de recorrência bioquímica. Além disso, Singal et al. (2004), avaliando 81 pacientes com CaP, encontraram a hipermetilação deste gene mais freqüentemente em pacientes mais jovens (idade<55anos) ao diagnóstico, quando comparado com os pacientes em idade mais avançada (idade>70 anos). Além da idade, foi observada maior freqüência de hipermetilação nos tumores com estádio III (62,5%) comparado ao estádio II (33,3%). Recentemente, Bastian et al. (2008) estudaram o padrão de metilação do gene RARB2 no soro de 192 pacientes com CaP. A hipermetilação foi detectada apenas no soro dos pacientes com CaP metastático numa freqüência de 38,9% (n=18). Adicionalmente, Rouprêt et al. (2008) avaliaram a hipermetilação do RARB2 por qMSP nas células circulantes do sangue de pacientes com CaP obtidas de duas coletas seqüenciais, ou seja, ao diagnóstico e durante a progressão da doença. Os autores observaram que pacientes com alto risco de progressão do CaP apresentaram maiores níveis de metilação do que aqueles sem a progressão e/ou sem informação biológica (incluindo nível de PSA). Vener et al. (2008), utilizando a metodologia qMSP, analisaram o padrão de metilação dos genes GSTP1, RARB e APC na urina de 234 pacientes com CaP que apresentavam PSA \geq que 2,5 µg/mL. As amostras que exibiam metilação para GSTP1 ou RARB eram provenientes de pacientes com tumores de maiores volume à prostatectomia.

Recentemente, Mehrotra *et al.* (2008), combinaram dados histológicos de carcinomas de próstata e resultados de qMSP de 4 genes, incluindo *RARB2*, na avaliação do efeito de cancerização de campo. Para o experimento, os autores realizarem biopsias espaçadas a cada 1mm provenientes de 37 amostras de prostatectomias. A primeira biópsia foi confirmada como histologicamente positiva para o câncer e as subseqüentes como negativas. Os autores relataram um efeito de campo, definido pela presença de células epigeneticamente transformadas na avaliação dos genes *RARB2* e *RASSF1A*, sendo mais pronunciado no primeiro. Os achados foram confirmados por seqüenciamento do *RARB2* sugerindo o potencial deste gene na avaliação de margens cirúrgicas e predição de recorrência tumoral.

10. Gene RASSF1 [Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1]

O gene RASSF1, localizado na região 3p21.3, codifica uma proteína similar às proteínas efetoras RAS e a perda ou alteração da sua expressão tem sido associada com a patogênese de uma variedade de tumores, o que sugere uma função supressora tumoral (Dammann et al., 2000; revisado em van der Weyden e Admans, 2007). Foi observado que a proteína codificada RASSF1 é capaz de interagir com a proteína XPA (de reparo do DNA), além de inibir o acúmulo de ciclina D1 e, assim, induzir a interrupção do ciclo celular (Dammann et al., 2003a; Song et al., 2004; Hesson et al., 2007). Sete transcritos alternativos deste codificando isoformas distintas gene já foram descritos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink), sendo que as três isoformas principais são RASSF1A, RASSF1C e RASSF1F. A inativação transcricional deste gene foi relacionada a hipermetilação da ilha de CpG em sua região promotora, sendo que duas ilhas de CpG separadas por aproximadamente 3,5Kb foram descritas. As isoformas RASSF1A e RASSF1C apresentam quatro éxons em comum, a porção N-terminal de RASSF1A tem alta homologia com a região 1 conservada da proteína quinase C, que contém um domínio zinc finger (Newton, 1995; Donninger et al., 2007; revisado em van der Weyden e Admans, 2007).

A expressão aumentada de RASSF1A, relatada numa variedade de linhagens de células tumorais (próstata, rim, carcinomas nasofaríngeos e gliomas), parece resultar em células menos viáveis, com crescimento diminuído e que mostraram uma diminuição da independência de ancoragem ao substrato, sendo portanto, menos invasivas. A expressão aumentada ou ectópica de *RASSF1A* nestes tipos tumorais causaram redução drástica da tumorigênese tanto *in vitro* como *in vivo*, enquanto a expressão de isoformas mutantes deste gene mostrou redução da atividade supressora do crescimento tumoral (Li J *et al.*, 2004; van der Weyden e Adams, 2007).

Se a inativação do *RASSF1A* contribui para o desenvolvimento de um fenótipo transformado, então uma possível re-introdução de *RASSF1A* em células *RASSF1A*-negativas poderia prevenir ou diminuir a capacidade tumorigênica destas células transformadas. Alguns estudos demonstraram que a re-expressão deste gene em linhagens celulares tumorais *RASSF1A*-negativas resultaram na redução de formação de colônias em meio ágar e na supressão da formação de colônia independente de ancoragem (Dammann *et al.*, 2000; Burbee *et al.*, 2001; Dreijerink *et al.*, 2001; Kuzmin *et al.*, 2002). Dois grupos independentes

desenvolveram camundongos *knockout* para o gene *RASSF1A* (Tommasi *et al.*, 2005; van der Weyden *et al.*, 2005). Nos dois casos os animais exibiram maior tendência a desenvolver tumores espontâneos. Estes achados confirmam a função supressora tumoral do gene *RASSF1A* (Donninger *et al.*, 2007).

A análise funcional da isoforma RASSF1A mostrou que a proteína codificada pode estar envolvida na sinalização apoptótica, estabilização de microtúbulos e na progressão do ciclo celular (Pfeifer e Dammann, 2005; Donninger *et al.*, 2007). Song *et al.* (2004) relataram que o gene *RASSF1A* controla o progresso mitótico por se ligar e inibir o *CDC20*, entretanto, um estudo mais recente (Liu *et al.*, 2007) não encontrou nenhuma interação entre *RASSF1A* e *CDC20*.

Alterações no padrão de metilação da região promotora do gene *RASSF1A* tem sido freqüentemente detectadas em muitos tipos tumorais (Dammann *et al.*, 2003b; Pfeifer e Dammann, 2005; revisado em van der Weyden e Admans, 2007). Lee *et al.* (2001) e Dulaimi *et al.* (2004) relataram uma alta freqüência de metilação do *RASSF1A* em tumores de bexiga e correlacionaram este achado com a progressão tumoral e pior prognóstico. Outros autores observaram o mesmo achado em tumores cerebrais (Astuti *et al.*, 2001; Ramirez *et al.* 2003); em tumores de mama e pulmão (Burbee *et al.*, 2001; Dammann *et al.*, 2001; Koul *et al.*, 2002, 2004; Krassenstein *et al.*, 2004); em carcinomas pancreáticos (Dammann *et al.*, 2003a).

Nos tumores de próstata, a metilação da região promotora do gene *RASSF1A* é um evento comum. Florl *et al.* (2004) avaliaram o padrão de metilação por MS-PCR de quatro genes, entre eles *RASSF1A* e *RARB2*, e mostraram que as frequências de hipermetilação de *RASSF1A* eram de 78% nos CaP e 53% nos tecidos prostáticos não neoplásicos, sendo que os tumores mostraram mais frequentemente mais de um gene hipermetilado, enquanto que estes eventos eram mais raros nos tecidos não neoplásicos.

A associação entre a metilação e escores de Gleason foi demonstrada por Liu *et al.* (2002). Os autores detectaram maior frequência de hipermetilação nos tumores com Gleason 7-10 (25/30, 83%) comparado com os tumores com Gleason 4-6 (11/20, 55%, *P*=0,032). Maruyama *et al.* (2002), já mencionado anteriormente, relataram que o *RASSF1A* apresentou as maiores frequências de metilação associadas aos escores de Gleason alto (>7) e altos níveis de PSA pré-cirúrgico (PSA>8ng/mL). Estes dados indicaram que a inativação epigenética do *RASSF1A* se correlaciona com características clinico-patológicas de pior prognóstico. Woodson *et al.* (2004a) relataram que a metilação de *RASSF1A* está associada com o grau do

tumor, entretanto, a metilação do gene não diferiu de acordo com o estadio da doença. Além disso, não foi observada metilação nas sete amostras de HPB avaliadas.

Bastian *et al.* (2005) identificaram hipermetilação no gene *RASSF1A* por qMSP em 28,5% (4/14) das amostras de HPB e em 67,9% (36/53) dos CaP, porém não foi observada nenhuma correlação significativa deste gene com as variáveis clínico-patológicas. Adicionalmente, Woodson *et al.* (2004b) também identificaram metilação de *RASSF1A* em 3 de 10 amostras PIN de alto grau, sugerindo que o silenciamento deste gene pode ocorrer no início da progressão dos cânceres de próstata.

Em outro estudo, foram avaliados por qMSP 16 ilhas de CpG em 16 genes, entre eles *RASSF1A*, em 13 próstata normais provenientes de necrópsias, 12 tecidos não neoplásicos adjacentes ao tumor e em 73 amotras de CaP (Yegnasubramanian *et al.*, 2004). Os autores detectaram por meio do índice normalizado de metilação das 16 ilhas avaliadas, que 96% dos tumores apresentavam hipermetilação de *RASSF1A* e ausência de metilação nas amostras de tecido normal adjancente e de próstata normal. Estes autores avaliaram também as metástases microdissecadas de órgãos secundários (n=87) e verificaram que embora as frequências de metilação era maior nas metástases que nos tumores primários. O conjunto destes resultados indicaram que as alterações epigenéticas, em especial relacionadas ao gene *RASSF1A*, ocorrem inicialmente, inclusive em lesões pré-malignas, e que tendem a se acumular à medida que o tumor progride.

Henrique *et al.* (2007), usando qMSP, avaliaram 83 CaP e identificaram que maiores níveis de metilação do gene *RASSF1A* estavam associados a escores de Gleason mais altos. Além disso, a análise univariada indicou que hipermetilação deste gene estava associada com menor tempo de sobrevida livre da doença. No entanto, após análise multivariada, o *RASSF1A* não se mostrou um marcador prognóstico independente. Kawamoto *et al.* (2007) sugeriram que a redução da acetilação de histonas ou a metilação de *H3K4me2* e o aumento da metilação de *dimetil-H3-K9* tem um papel crítico na manutenção da metilação do promotor do gene *RASSF1A* silenciado em cânceres de próstata.

Recentemente, Bastian *et al.* (2008) não detectaram a hipermetilação do gene *RASSF1A* no soro dos 192 pacientes com CaP, mas encontraram aproximadamente 16,7% de hipermetilação em pacientes com CaP metastático. Em adição, Rouprêt *et al.* (2008) analisaram as células circulantes do sangue de pacientes com alto risco de progressão do CaP

e verificaram que quanto maior o nível de hipermetilação do gene *RASSF1A*, maior era o risco de progressão da doença.

11. Justificativa

A lista de genes mostrando padrões anormais de metilação no câncer está se expandindo; porém, provavelmente somente alguns destes serão promissores como marcadores de risco de desenvolvimento tumoral, podendo ser utilizados no diagnóstico precoce ou como indicativos de agressividade tumoral. Os estudos de metilação nos quatro genes apresentados neste estudo (CDH1, RASSF1, RARB e SFN) em tumores de próstata são discrepantes tanto no que se refere às freqüências observadas em diferentes populações quanto à associação descrita com características clínicas e patológicas de pior prognóstico. Assim, é justificado um maior número de estudos e em diferentes populações para identificar os genes relevantes na carcinogênese prostática. Para o nosso conhecimento, não há relatos destes genes em tumores de próstata de pacientes brasileiros. Adicionalmente aos fatores de risco associados ao desenvolvimento dos carcinomas de próstata, tem sido demonstrado que o background genético das diferentes populações influencia na incidência e gravidade dos tumores humanos. Assim, é fundamental a identificação dos fatores comuns ou biomarcadores nas diferentes populações relacionados à carcinogênese prostática. Este conhecimento poderá ser aplicado no diagnóstico e prognóstico dos pacientes com CaP e indicar alvos interessantes para novas modalidades ou abordagens terapêuticas.

Este estudo propôs a avaliação do padrão de metilação dos genes *CDH1*, *SFN*, *RARB* e *RASSF1A* por MSP em amostras de adenocarcinoma de próstata, amostras não-neoplásicas e em tecidos de próstata normais e correlacionar os achados com os parâmetros clínicoshistopatológicos. Para consubstanciar os dados preliminares do envolvimento destes genes no CaP, foi também investigada a expressão da proteína E-caderina por IHQ em cortes histológicos das mesmas amostras avaliadas quanto ao padrão de metilação do gene *CDH1*; A expressão dos transcritos *RARB* e *RASSF1A* foi avaliada por RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e comparada com os parâmetros clínico-histopatológicos. Finalmente, foi investigada, em um grupo independente de amostras, a expressão das proteínas RARβ2 e RASSF1A por IHQ em uma plataforma de *tissue microarray* (TMA). O impacto prognóstico da expressão destes genes foi analisado por regressão logística em relação à ocorrência de recorrência local ou metástases à distância, assim como em relação à sobrevida livre de recorrência.



12. Objetivos

• Avaliar o padrão de metilação dos genes *CDH1*, *SFN*, *RARB* e *RASSF1A* (por MSP) em amostras de adenocarcinomas de próstata comparadas com amostras mostrando ausência de neoplasia;

• Avaliar a expressão dos transcritos *RARB2* e *RASSF1A* (por qRT-PCR) e das respectivas proteínas (por imunohistoquímica) em amostras de adenocarcinoma de próstata;

• Comparar os resultados de metilação do gene *CDH1* com a expressão da proteína Ecaderina (por imunohistoquímica) em amostras de adenocarcinoma de próstata;

• Correlacionar os resultados da análise de metilação com os níveis de expressão protéica e/ou transcricional e compará-los com os parâmetros clínicos e histopatológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

13. Referências

- ABLIN RJ, BRONSON P, SOANES WA, WITEBSKY E. Tissue- and species-specific antigens of normal human prostatic tissue. J Immunol. 1970a Jun;104(6):1329-39.
- ABLIN RJ, SOANES WA, BRONSON P, WITEBSKY E. Precipitating antigens of the normal human prostate. J Reprod Fertil. 1970b Aug;22(3):573-4.
- AITCHISON AA, VEERAKUMARASIVAM A, VIAS M, KUMAR R, HAMDY FC, NEAL DE, et al. Promoter methylation correlates with reduced Smad4 expression in advanced prostate cancer. Prostate. 2008 May 1;68(6):661-74.
- ALBERTI I, BARBORO P, BARBESINO M, SANNA P, PISCIOTTA L, PARODI S, et al. Changes in the expression of cytokeratins and nuclear matrix proteins are correlated with the level of differentiation in human prostate cancer. J Cell Biochem. 2000 Sep 7;79(3):471-85.
- ALVAREZ S, GERMAIN P, ALVAREZ R, RODRIGUEZ-BARRIOS F, GRONEMEYER H, DE LERA AR. Structure, function and modulation of retinoic acid receptor beta, a tumor suppressor. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(7-8):1406-15.
- AMBROS V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004 Sep 16;431(7006):350-5.
- AMUNDADOTTIR LT, SULEM P, GUDMUNDSSON J, HELGASON A, BAKER A, AGNARSSON BA, et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. Nat Genet. 2006;38(6):652-8.
- 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. Int Braz J Urol. 2006 Nov-Dec;32(6):668-75; discussion 75-7.
- ASTUTI D, AGATHANGGELOU A, HONORIO S, DALLOL A, MARTINSSON T, KOGNER P, et al. RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in phaeochromocytomas and neuroblastoma tumours. Oncogene. 2001 Nov 8;20(51):7573-7.
- BARTEL DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004 Jan 23;116(2):281-97.
- BASTIAN PJ, ELLINGER J, WELLMANN A, WERNERT N, HEUKAMP LC, MULLER SC, et al. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. Clin Cancer Res. 2005 Jun 1;11(11):4097-106.
- BASTIAN PJ, ELLINGER J, HEUKAMP LC, KAHL P, MULLER SC, VON RUCKER A. Prognostic value of CpG Island hypermethylation at PTGS2, RAR-beta, EDNRB, and other gene loci in patients undergoing radical prostatectomy. European Urology, 2007 Mar: 51(3):665-674.
- BASTIAN PJ, PALAPATTU GS, YEGNASUBRAMANIAN S, ROGERS CG, LIN X, MANGOLD LA, et al. CpG island hypermethylation profile in the serum of men with clinically localized and hormone refractory metastatic prostate cancer. J Urol. 2008 Feb;179(2):529-34;

discussion 34-5.

- BERARD J, DELABRE JF, GARNEAU H, BELLEHUMEUR C, CARRIER ME. Lung tumorigenesis in transgenic mice expressing RAR-beta 1 and RAR-beta 3 antisense mRNA. Lung Cancer 2003; 41(S2):S122.
- BILLIS A. Latent carcinoma and atypical lesions of prostate. An autopsy study. Urology. 1986 Oct;28(4):324-9.
- BILLIS A. Carcinoma: graduação histológica e estadiamento. In: Billis. A., editor. Patologia Cirúrgica da Próstata. São Paulo, Campinas; 2003. p. 123-40.
- BIRD AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature. 1986 May 15-21;321(6067):209-13.
- BOSTWICK DG, SHAN A, QIAN J, DARSON M, MAIHLE NJ, JENKINS RB, et al. Independent origin of multiple foci of prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with matched foci of prostate carcinoma. Cancer. 1998 Nov 1;83(9):1995-2002.
- BRACARDA S, DE COBELLI O, GRECO C, PRAYER-GALETTI T, VALDAGNI R, GATTA G, et al. Cancer of the prostate. Crit Rev Oncol Hematol. 2005 Dec;56(3):379-96.
- BRANDES D, KIRCHHEIM D, SCOTT WW. Ultrastructure of the Human Prostate: Normal and Neoplastic. Lab Invest. 1964 Dec;13:1541-60.
- BURBEE DG, FORGACS E, ZOCHBAUER-MULLER S, SHIVAKUMAR L, FONG K, GAO B, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. J Natl Cancer Inst. 2001 May 2;93(9):691-9.
- BURGERS WA, FUKS F, KOUZARIDES T. DNA methyltransferases get connected to chromatin. Trends Genet. 2002 Jun;18(6):275-7.
- CALDEIRA JR, PRANDO EC, QUEVEDO FC, NETO FA, RAINHO CA, ROGATTO SR. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. BMC Cancer. 2006;6:48.
- CALIN GA, CROCE CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer. 2006 Nov;6(11):857-66.
- CAMORIANO M, KINNEY SR, MOSER MT, FOSTER BA, MOHLER JL, TRUMP DL, et al. Phenotype-specific CpG island methylation events in a murine model of prostate cancer. Cancer Res. 2008 Jun 1;68(11):4173-82.
- CAMPBELL MJ, PARK S, USKOKOVIC MR, DAWSON MI, KOEFFLER HP. Expression of retinoic acid receptor-beta sensitizes prostate cancer cells to growth inhibition mediated by combinations of retinoids and a 19-nor hexafluoride vitamin D3 analog. Endocrinology. 1998 Apr;139(4):1972-80.
- CANNON L, BISHOP DT, SKOLNICK M. Genetic epidemiology of prostate cancer in the Utah Mormon genealogy. Cancer Surv. 1982: 1: 47-69.
- CARTER BS, BEATY TH, STEINBERG GD, CHILDS B, WALSH PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 15;89(8):3367-71.

CHAMBON P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. FASEB J. 1996 Jul;10(9):940-54.

- CHAN TA, HERMEKING H, LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. Nature. 1999 Oct 7;401(6753):616-20.
- CHAN TA, HWANG PM, HERMEKING H, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. Genes Dev. 2000 Jul 1;14(13):1584-8.
- CHAN JM, GIOVANNUCCI EL. Vegetables, fruits, associated micronutrients, and risk of prostate cancer. Epidemiol Rev. 2001;23(1):82-6.
- CHAN JM, JOU RM, CARROLL PR. The relative impact and future burden of prostate cancer in the United States. J Urol. 2004 Nov;172(5 Pt 2):S13-6; discussion S7.
- CHE M, GRIGNON D. Pathology of prostate cancer. Cancer Metastasis Rev. 2002;21(3-4):381-95.
- CHEN LI, SOMMER KM, SWISSHELM K. Downstream codons in the retinoic acid receptor beta 2 and beta -4 mRNAs initiate translation of a protein isoform that disrupts retinoid-activated transcription. J Biol Chem. 2002 Sep 20;277(38):35411-21.
- CHER ML, BOVA GS, MOORE DH, SMALL EJ, CARROLL PR, PIN SS, et al. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. Cancer Res. 1996 Jul 1;56(13):3091-102.
- CHRISTIANSEN JJ, RAJASEKARAN AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. Cancer Res. 2006 Sep 1;66(17):8319-26.
- CHUN FK, HUTTERER GC, PERROTTE P, GALLINA A, VALIQUETTE L, BENARD F, et al. Distribution of prostate specific antigen (PSA) and percentage free PSA in a contemporary screening cohort with no evidence of prostate cancer. BJU Int. 2007 Jul;100(1):37-41.
- CHUNG W, KWABI-ADDO B, ITTMANN M, JELINEK J, SHEN L, YU Y, et al. Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling. PLoS ONE. 2008;3(4):e2079.
- COLLARD RL, HARYA NS, MONZON FA, MAIER CE, O'KEEFE DS. Methylation of the ASC gene promoter is associated with aggressive prostate cancer. Prostate. 2006 May 15;66(7):687-95.
- COSTA VL, HENRIQUE R, JERONIMO C. Epigenetic markers for molecular detection of prostate cancer. Dis Markers. 2007;23(1-2):31-41.
- DAMMANN R, LI C, YOON JH, CHIN PL, BATES S, PFEIFER GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. Nat Genet. 2000 Jul;25(3):315-9.

- DAMMANN R, YANG G, PFEIFER GP. Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. Cancer Res. 2001 Apr 1;61(7):3105-9.
- DAMMANN R, SCHAGDARSURENGIN U, LIU L, OTTO N, GIMM O, DRALLE H, et al. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. Oncogene. 2003a Jun 12;22(24):3806-12.
- DAMMANN R, SCHAGDARSURENGIN U, STRUNNIKOVA M, RASTETTER M, SEIDEL C, LIU L, et al. Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. Histol Histopathol. 2003b Apr;18(2):665-77.
- DE MARZO AM, PLATZ EA, SUTCLIFFE S, XU J, GRONBERG H, DRAKE CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. Nat Rev Cancer. 2007 Apr;7(4):256-69.
- DEMARZO AM, NELSON WG, ISAACS WB, EPSTEIN JI. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. Lancet. 2003 Mar 15;361(9361):955-64.
- DERYCKE L, DE WEVER O, STOVE V, VANHOECKE B, DELANGHE J, DEPYPERE H, et al. Soluble N-cadherin in human biological fluids. Int J Cancer. 2006 Dec 15;119(12):2895-900.
- DOBOSY JR, ROBERTS JL, FU VX, JARRARD DF. The expanding role of epigenetics in the development, diagnosis and treatment of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. J Urol. 2007 Mar;177(3):822-31.
- DONNINGER H, VOS MD, CLARK GJ. The RASSF1A tumor suppressor. J Cell Sci. 2007 Sep 15;120(Pt 18):3163-72.
- DRAGNEV KH, RIGAS JR, DMITROVSKY E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. Oncologist. 2000;5(5):361-8.
- DREIJERINK K, BRAGA E, KUZMIN I, GEIL L, DUH FM, ANGELONI D, et al. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jun 19;98(13):7504-9.
- DULAIMI E, UZZO RG, GREENBERG RE, AL-SALEEM T, CAIRNS P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. Clin Cancer Res. 2004 Mar 15;10(6):1887-93.
- ENOKIDA H, SHIINA H, IGAWA M, OGISHIMA T, KAWAKAMI T, BASSETT WW, et al. CpG hypermethylation of MDR1 gene contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer. Cancer Res. 2004 Sep 1;64(17):5956-62.
- EPSTEIN JI, POTTER SR. The pathological interpretation and significance of prostate needle biopsy findings: implications and current controversies. J Urol. 2001 Aug;166(2):402-10.
- 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, editors. World health organization classification of tumours –

Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC; 2004. p. 159-92.

- FAZZARI MJ, GREALLY JM. Epigenomics: beyond CpG islands. Nat Rev Genet. 2004 Jun;5(6):446-55.
- FEINBERG AP, TYCKO B. The history of cancer epigenetics. Nat Rev Cancer. 2004 Feb;4(2):143-53.
- FERGUSON AT, EVRON E, UMBRICHT CB, PANDITA TK, CHAN TA, HERMEKING H, et al. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May 23;97(11):6049-54.
- FLORL AR, STEINHOFF C, MULLER M, SEIFERT HH, HADER C, ENGERS R, et al. Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. Br J Cancer. 2004 Aug 31;91(5):985-94.
- FOSTER CS, KEY. Stem cells in prostatic epithelia. Int J Exp Pathol. 1997 Oct;78(5):311-29.
- FOULKES WD. Inherited susceptibility to common cancers. N Engl J Med. 2008 Nov 13;359(20):2143-53.
- FRIXEN UH, BEHRENS J, SACHS M, EBERLE G, VOSS B, WARDA A, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. J Cell Biol. 1991 Apr;113(1):173-85.
- FU H, SUBRAMANIAN RR, MASTERS SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000;40:617-47.
- FU VX, SCHWARZE SR, KENOWSKI ML, LEBLANC S, SVAREN J, JARRARD DF. A loss of insulin-like growth factor-2 imprinting is modulated by CCCTC-binding factor downregulation at senescence in human epithelial cells. J Biol Chem. 2004 Dec 10;279(50):52218-26.
- GARDINER-GARDEN M, FROMMER M. CpG islands in vertebrate genomes. J Mol Biol. 1987 Jul 20;196(2):261-82.
- GHADIRIAN P, HOWE GR, HISLOP TG, MAISONNEUVE P. Family history of prostate cancer: a multi-center case-control study in Canada. Int J Cancer. 1997 Mar 17;70(6):679-81.
- GIBBS M, STANFORD JL, JARVIK GP, JANER M, BADZIOCH M, PETERS MA, et al. A genomic scan of families with prostate cancer identifies multiple regions of interest. Am J Hum Genet. 2000 Jul;67(1):100-9.
- GLEASON DF. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: Tannenbaum M, editor. Urologic Pathology: The prostate. Philadelfia: Lea & Febiger; 1977.
- GLEASON DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. Hum Pathol. 1992 Mar;23(3):273-9.
- GOFFIN J, EISENHAUER E. DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. Ann Oncol. 2002 Nov;13(11):1699-716.

GONZALGO ML, JONES PA. Quantitative methylation analysis using methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Methods. 2002 Jun;27(2):128-33.

L

- GOSSELAAR C, ROOBOL MJ, SCHRODER FH. Prevalence and characteristics of screen-detected prostate carcinomas at low prostate-specific antigen levels: aggressive or insignificant? BJU Int. 2005 Feb;95(2):231-7.
- GRAFF JR, HERMAN JG, LAPIDUS RG, CHOPRA H, XU R, JARRARD DF, et al. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. Cancer Res. 1995 Nov 15;55(22):5195-9.
- GRAFF JR, GABRIELSON E, FUJII H, BAYLIN SB, HERMAN JG. Methylation patterns of the Ecadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of Ecadherin expression during metastatic progression. J Biol Chem. 2000 Jan 28;275(4):2727-32.
- GRAVDAL K, HALVORSEN OJ, HAUKAAS SA, AKSLEN LA. A switch from E-cadherin to Ncadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. Clin Cancer Res. 2007 Dec 1;13(23):7003-11.
- GRIGNON DJ, RO JY, ORDONEZ NG, AYALA AG, CLEARY KR. Basal cell hyperplasia, adenoid basal cell tumor, and adenoid cystic carcinoma of the prostate gland: an immunohistochemical study. Hum Pathol. 1988 Dec;19(12):1425-33.
- GRONBAEK K, HOTHER C, JONES PA. Epigenetic changes in cancer. APMIS. 2007 Oct;115(10):1039-59.
- GRONBERG H, DAMBER L, DAMBER JE. Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. Cancer. 1996 Jan 1;77(1):138-43.
- GUDMUNDSSON J, SULEM P, MANOLESCU A, AMUNDADOTTIR LT, GUDBJARTSSON D, HELGASON A, et al. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. Nat Genet. 2007; 39(5):631-7.
- GUMBINER BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell. 1996 Feb 9;84(3):345-57.
- GUREL B, IWATA T, KOH CM, YEGNASUBRAMANIAN S, NELSON WG E DE MARZO AM. Molecular alterations in Prostate cancer as diagnostic, prognostic, and therapeutic targets. Adv Anat Pathol 2008;(15):319–331.
- HAAS GP, SAKR WA. Epidemiology of prostate cancer. CA Cancer J Clin. 1997 Sep-Oct;47(5):273-87.
- HAKE SB, XIAO A, ALLIS CD. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. Br J Cancer. 2004 Feb 23;90(4):761-9.
- HAMMOND SM. MicroRNAs as oncogenes. Curr Opin Genet Dev 2006;16:4-9.

HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70.

- HARDEN SV, GUO Z, EPSTEIN JI, SIDRANSKY D. Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. J Urol. 2003 Mar;169(3):1138-42.
- HARK AT, SCHOENHERR CJ, KATZ DJ, INGRAM RS, LEVORSE JM, TILGHMAN SM. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. Nature. 2000 May 25;405(6785):486-9.
- HENRIQUE R, RIBEIRO FR, FONSECA D, HOQUE MO, CARVALHO AL, COSTA VL, et al. High promoter methylation levels of APC predict poor prognosis in sextant biopsies from prostate cancer patients. Clin Cancer Res. 2007 Oct 15;13(20):6122-9.
- HERMAN JG, BAYLIN SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med. 2003 Nov 20;349(21):2042-54.
- HERMEKING H, LENGAUER C, POLYAK K, HE TC, ZHANG L, THIAGALINGAM S, et al. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. Mol Cell. 1997 Dec;1(1):3-11.
- HERMEKING H. The 14-3-3 cancer connection. Nat Rev Cancer. 2003 Dec;3(12):931-43.
- HERMEKING H. Extracellular 14-3-3sigma protein: a potential mediator of epithelialmesenchymal interactions. J Invest Dermatol. 2005 Jan;124(1):ix-x.
- HESSON LB, COOPER WN, LATIF F. The role of RASSF1A methylation in cancer. Dis Markers. 2007;23(1-2):73-87.
- HOLLIDAY R. A new theory of carcinogenesis. Br J Cancer. 1979 Oct;40(4):513-22.
- HOQUE MO, TOPALOGLU O, BEGUM S, HENRIQUE R, ROSENBAUM E, VAN CRIEKINGE W, et al. Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects. J Clin Oncol. 2005 Sep 20;23(27):6569-75.
- HORIE-INOUE K, INOUE S. Epigenetic and proteolytic inactivation of 14-3-3sigma in breast and prostate cancers. Semin Cancer Biol. 2006 Jun;16(3):235-9.
- HOULE B, PELLETIER M, WU J, GOODYER C, BRADLEY WE. Fetal isoform of human retinoic acid receptor beta expressed in small cell lung cancer lines. Cancer Res. 1994 Jan 15;54(2):365-9.
- HSING AW, TSAO L, DEVESA SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. Int J Cancer. 2000 Jan 1;85(1):60-7.
- HSING AW. Hormones and prostate cancer: what's next? Epidemiol Rev. 2001;(23):42-58.
- HUANG D, LIU X, PLYMATE SR, IDOWU M, GRIMES M, BEST AM, et al. Proteomic identification of 14-3-3 sigma as a common component of the androgen receptor and the epidermal growth factor receptor signaling pathways of the human prostate epithelial cell line M12. Oncogene. 2004 Sep 9;23(41):6881-9.
- IKEDA K, ORIMO A, HIGASHI Y, MURAMATSU M, INOUE S. Efp as a primary estrogenresponsive gene in human breast cancer. FEBS Lett. 2000 Apr 21;472(1):9-13.

- IKONEN T, MATIKAINEN M, MONONEN N, HYYTINEN ER, HELIN HJ, TOMMOLA S, et al. Association of E-cadherin germ-line alterations with prostate cancer. Clin Cancer Res. 2001 Nov;7(11):3465-71.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Tipos de câncer. Próstata. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2007. Acesso em: 15 de novembro de 2007. Disponível em: http://www.inca.gov.br.
- IVANOVA T, PETRENKO A, GRITSKO T, VINOKOUROVA S, ESHILEV E, KOBZEVA V, et al. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta 2 gene in cervical cancer. BMC Cancer. 2002 Mar 21;2:4.
- IWATA N, YAMAMOTO H, SASAKI S, ITOH F, SUZUKI H, KIKUCHI T, et al. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. Oncogene. 2000 Nov 2;19(46):5298-302.
- JEMAL A, MURRAY T, SAMUELS A, GHAFOOR A, WARD E, THUN MJ. Cancer statistics, 2003. CA Cancer J Clin. 2003 Jan-Feb;53(1):5-26.
- JENUWEIN T, ALLIS CD. Translating the histone code. Science. 2001 Aug 10;293(5532):1074-80.
- JERONIMO C, HENRIQUE R, HOQUE MO, RIBEIRO FR, OLIVEIRA J, FONSECA D, et al. Quantitative RARbeta2 hypermethylation: a promising prostate cancer marker. Clin Cancer Res. 2004a Jun 15;10(12 Pt 1):4010-4.
- JERONIMO C, HENRIQUE R, HOQUE MO, MAMBO E, RIBEIRO FR, VARZIM G, et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. Clin Cancer Res. 2004b Dec 15;10(24):8472-8.
- JONES PA, BAYLIN SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet. 2002 Jun;3(6):415-28.
- JONSSON BA, BERGH A, STATTIN P, EMMANUELSSON M, GRONBERG H. Germline mutations in E-cadherin do not explain association of hereditary prostate cancer, gastric cancer and breast cancer. Int J Cancer. 2002 Apr 20;98(6):838-43.
- JONSSON BA, ADAMI HO, HAGGLUND M, BERGH A, GORANSSON I, STATTIN P, et al. -160C/A polymorphism in the E-cadherin gene promoter and risk of hereditary, familial and sporadic prostate cancer. Int J Cancer. 2004 Apr 10;109(3):348-52.
- KALLAKURY BV, SHEEHAN CE, WINN-DEEN E, OLIVER J, FISHER HA, KAUFMAN RP, JR., et al. Decreased expression of catenins (alpha and beta), p120 CTN, and E-cadherin cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas. Cancer. 2001 Dec 1;92(11):2786-95.
- KANG GH, LEE S, LEE HJ, HWANG KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. J Pathol. 2004 Feb;202(2):233-40.
- KANG Y, MASSAGUE J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and

metastasis. Cell. 2004 Aug 6;118(3):277-9.

KAWAMOTO K, OKINO ST, PLACE RF, URAKAMI S, HIRATA H, KIKUNO N, et al. Epigenetic modifications of RASSF1A gene through chromatin remodeling in prostate cancer. Clin Cancer Res. 2007 May 1;13(9):2541-8.

L

- KEMLER R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. Trends Genet. 1993 Sep;9(9):317-21.
- KLOSE RJ, BIRD AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends Biochem Sci. 2006 Feb;31(2):89-97.
- KLOTZ L. Active surveillance with selective delayed intervention for favorable risk prostate cancer. Urol Oncol. 2006 Jan-Feb;24(1):46-50.
- KOFF WJ, POMPEO ACL, DAMIÃO R, CARRERETTE FB, editors. Diretrizes em urooncologia. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Urologia; 2005. 261p.
- KOLONEL LN. Fat, meat, and prostate cancer. Epidemiol Rev.2001;23:72-81.
- KOUL S, HOULDSWORTH J, MANSUKHANI MM, DONADIO A, MCKIERNAN JM, REUTER VE, et al. Characteristic promoter hypermethylation signatures in male germ cell tumors. Mol Cancer. 2002 Nov 28;1:8.
- KOUL S, MCKIERNAN JM, NARAYAN G, HOULDSWORTH J, BACIK J, DOBRZYNSKI DL, et al. Role of promoter hypermethylation in Cisplatin treatment response of male germ cell tumors. Mol Cancer. 2004 May 18;3:16.
- KRASSENSTEIN R, SAUTER E, DULAIMI E, BATTAGLI C, EHYA H, KLEIN-SZANTO A, et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation. Clin Cancer Res. 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):28-32.
- KUEFER R, HOFER MD, ZORN CS, ENGEL O, VOLKMER BG, JUAREZ-BRITO MA, et al. Assessment of a fragment of e-cadherin as a serum biomarker with predictive value for prostate cancer. Br J Cancer. 2005 Jun 6;92(11):2018-23.
- KUZMIN I, GILLESPIE JW, PROTOPOPOV A, GEIL L, DREIJERINK K, YANG Y, et al. The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells. Cancer Res. 2002 Jun 15;62(12):3498-502.
- KWABI-ADDO B, CHUNG W, SHEN L, ITTMANN M, WHEELER T, JELINEK J, et al. Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. Clin Cancer Res. 2007 Jul 1;13(13):3796-802.
- LABRIE F, BELANGER A, DUPONT A, LUU-THE V, SIMARD J, LABRIE C. Science behind total androgen blockade: from gene to combination therapy. Clin Invest Med. 1993 Dec;16(6):475-92.
- LAIRD PW. The power and the promise of DNA methylation markers. Nat Rev Cancer. 2003 Apr;3(4):253-66.
- LEE MG, KIM HY, BYUN DS, LEE SJ, LEE CH, KIM JI, et al. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma. Cancer Res. 2001 Sep 15;61(18):6688-92.

LI J, WANG F, PROTOPOPOV A, MALYUKOVA A, KASHUBA V, MINNA JD, et al. Inactivation of RASSF1C during in vivo tumor growth identifies it as a tumor suppressor gene. Oncogene. 2004 Aug 5;23(35):5941-9.

L

- LI LC, ZHAO H, NAKAJIMA K, OH BR, RIBEIRO FILHO LA, CARROLL P, et al. Methylation of the E-cadherin gene promoter correlates with progression of prostate cancer. J Urol. 2001 Aug;166(2):705-9.
- Li LC, Okino ST, Dahiya R. DNA methylation in prostate cancer. Biochim Biophys Acta. 2004 Sep 20;1704(2):87-102.
- LI LC, CARROLL PR, DAHIYA R. Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. J Natl Cancer Inst. 2005 Jan 19;97(2):103-15.
- LI LC, DAHIJA R. Epigenetics of prostate cancer. Front Biosci. 2007;12:3377-97.
- LINDSTROM S, WIKLUND F, JONSSON BA, ADAMI HO, BALTER K, BROOKES AJ, et al. Comprehensive genetic evaluation of common E-cadherin sequence variants and prostate cancer risk: strong confirmation of functional promoter SNP. Hum Genet. 2005 Dec;118(3-4):339-47.
- LINTON KD, HAMDY FC. Early diagnosis and surgical management of prostate cancer. Cancer Treat Rev. 2003 Jun;29(3):151-60.
- LIU JW, NAGPAL JK, JERONIMO C, LEE JE, HENRIQUE R, KIM MS, et al. Hypermethylation of MCAM gene is associated with advanced tumor stage in prostate cancer. Prostate. 2008 Mar 1;68(4):418-26.
- LIU L, YOON JH, DAMMANN R, PFEIFER GP. Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. Oncogene. 2002 Oct 3;21(44):6835-40.
- LIU L, BAIER K, DAMMANN R, PFEIFER GP. The tumor suppressor RASSF1A does not interact with Cdc20, an activator of the anaphase-promoting complex. Cell Cycle. 2007 Jul 1;6(13):1663-5.
- LODYGIN D, YAZDI AS, SANDER CA, HERZINGER T, HERMEKING H. Analysis of 14-3-3sigma expression in hyperproliferative skin diseases reveals selective loss associated with CpG-methylation in basal cell carcinoma. Oncogene. 2003 Aug 21;22(35):5519-24.
- LODYGIN D, DIEBOLD J, HERMEKING H. Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3sigma expression. Oncogene. 2004 Dec 2;23(56):9034-41.
- LODYGIN D, EPANCHINTSEV A, MENSSEN A, DIEBOLD J, HERMEKING H. Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. Cancer Res. 2005a May 15;65(10):4218-27.
- LODYGIN D, HERMEKING H. The role of epigenetic inactivation of 14-3-3sigma in human cancer. Cell Res. 2005b Apr;15(4):237-46.
- LODYGIN D, HERMEKING H. Epigenetic silencing of 14-3-3sigma in cancer. Semin Cancer Biol. 2006 Jun;16(3):214-24.
- LOTAN R, XU XC, LIPPMAN SM, RO JY, LEE JS, LEE JJ, et al. Suppression of retinoic acid 58

receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. N Engl J Med. 1995 May 25;332(21):1405-10.

- LU J, GETZ G, MISKA EA, ALVAREZ-SAAVEDRA E, LAMB J, PECK D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005;435: 834–8.
- MA L, TERUYA-FELDSTEIN J, WEINBERG RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. Nature. 2007 Oct 11;449(7163):682-8.
- MACINTOSH CA, STOWER M, REID N, MAITLAND NJ. Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypic heterogeneity. Cancer Res. 1998 Jan 1;58(1):23-8.
- MANGELSDORF DJ, THUMMEL C, BEATO M, HERRLICH P, SCHUTZ G, UMESONO K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell. 1995 Dec 15;83(6):835-9.
- MARUYAMA R, TOYOOKA S, TOYOOKA KO, HARADA K, VIRMANI AK, ZOCHBAUER-MULLER S, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. Cancer Res. 2001 Dec 15;61(24):8659-63.
- MARUYAMA R, TOYOOKA S, TOYOOKA KO, VIRMANI AK, ZOCHBAUER-MULLER S, FARINAS AJ, et al. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. Clin Cancer Res. 2002 Feb;8(2):514-9.
- MASTERSON J, O'DEA S. Posttranslational truncation of E-cadherin and significance for tumour progression. Cells Tissues Organs. 2007;185(1-3):175-9.
- MATIKAINE MP, PUKKALA E, SCHLEUTKER J, TAMMELA TL, KOIVISTO P, SANKILA R, et al. Relatives of prostate cancer patients have an increased risk of prostate and stomach cancers: a population-based, cancer registry study in Finland. Cancer Causes Control. 2001 Apr;12(3):223-30.
- MCDAVID K, LEE J, FULTON JP, TONITA J, THOMPSON TD. Prostate cancer incidence and mortality rates and trends in the United States and Canada. Public Health Rep. 2004 Mar-Apr;119(2):174-86.
- MCNEAL JE, BOSTWICK DG, KINDRACHUK RA, REDWINE EA, FREIHA FS, STAMEY TA. Patterns of progression in prostate cancer. Lancet. 1986 Jan 11;1(8472):60-3.
- MCNEAL JE, REDWINE EA, FREIHA FS, STAMEY TA. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. Am J Surg Pathol. 1988 Dec;12(12):897-906.
- MEHROTRA J, VARDE S, WANG H, CHIU H, VARGO J, GRAY K, et al. Quantitative, spatial resolution of the epigenetic field effect in prostate cancer. Prostate. 2008 Feb 1;68(2):152-60.
- MEIERS I, SHANKS JH, BOSTWICK DG. Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. Pathology. 2007 Jun;39(3):299-304.
- MERRICK GS, GALBREATH RW, BUTLER WM, WALLER KE, ALLEN ZA, LIEF J, et al. Primary Gleason pattern does not impact survival after permanent interstitial brachytherapy for

Gleason score 7 prostate cancer. Cancer. 2007 Jul 15;110(2):289-96.

MHAWECH P, BENZ A, CERATO C, GRELOZ V, ASSALY M, DESMOND JC, et al. Downregulation of 14-3-3sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation. Mod Pathol. 2005 Mar;18(3):340-8.

- MILLER BA, KOLONEL LN, BERNSTEIN L, YOUNG, JR. JL, SWANSON GM, WEST D, KEY CR, LIFF JM, GLOVER CS, ALEXANDER GA, et al. (eds). Racial/Ethnic Patterns of Cancer in the United States 1988-1992, National Cancer Institute. NIH Pub. No. 96-4104. Bethesda, MD, 1996.
- MOL AJ, GELDOF AA, MEIJER GA, VAN DER POEL HG, VAN MOORSELAAR RJ. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. J Cancer Res Clin Oncol. 2007 Oct;133(10):687-95.
- MUSIAL J, SPORNY S, NOWICKI A. Prognostic significance of E-cadherin and ezrin immunohistochemical expression in prostate cancer. Pol J Pathol. 2007;58(4):235-43.
- NAGPAL S, ZELENT A, CHAMBON P. RAR-beta 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR-beta 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 1;89(7):2718-22.
- NAKAYAMA M, BENNETT CJ, HICKS JL, EPSTEIN JI, PLATZ EA, NELSON WG, et al. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. Am J Pathol. 2003 Sep;163(3):923-33.
- NAKAYAMA T, WATANABE M, YAMANAKA M, HIROKAWA Y, SUZUKI H, ITO H, et al. The role of epigenetic modifications in retinoic acid receptor beta2 gene expression in human prostate cancers. Lab Invest. 2001 Jul;81(7):1049-57.
- NALEPA G, HARPER JW. Efp: a ring of independence? Nat Med. 2002 Jul;8(7):661-2.
- NELSON WG, DE MARZO AM, ISAACS WB. Prostate cancer. N Engl J Med. 2003 Jul 24;349(4):366-81.
- NELSON WG, YEGNASUBRAMANIAN S, AGOSTON AT, BASTIAN PJ, LEE BH, NAKAYAMA M, et al. Abnormal DNA methylation, epigenetics, and prostate cancer. Front Biosci. 2007;12:4254-66.
- NEWTON AC. Protein kinase C. Seeing two domains. Curr Biol. 1995 Sep 1;5(9):973-6.
- OSADA H, TATEMATSU Y, YATABE Y, NAKAGAWA T, KONISHI H, HARANO T, et al. Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3sigma in human lung cancers. Oncogene. 2002 Apr 4;21(15):2418-24.
- OSHIRO MM, FUTSCHER BW, LISBERG A, WOZNIAK RJ, KLIMECKI WT, DOMANN FE, et al. Epigenetic regulation of the cell type-specific gene 14-3-3sigma. Neoplasia. 2005 Sep;7(9):799-808.

OVERDUIN M, HARVEY TS, BAGBY S, TONG KI, YAU P, TAKEICHI M, et al. Solution structure

of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. Science. 1995 Jan 20;267(5196):386-9.

- PADAR A, SATHYANARAYANA UG, SUZUKI M, MARUYAMA R, HSIEH JT, FRENKEL EP, et al. Inactivation of cyclin D2 gene in prostate cancers by aberrant promoter methylation. Clin Cancer Res. 2003 Oct 15;9(13):4730-4.
- PARKIN DM, WHELAN SL, FERLAY J, RAYMOND L and YOUNG J, editors. Cancer Incidence in Five Continents. IARC Scientific Publications Vol VII. International Agency for Research Cancer: Lyon, France, 1997.
- 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. A multi-institutional update. JAMA. 1997 May 14;277(18):1445-51.
- PATRA SK, BETTUZZI S. Epigenetic DNA-methylation regulation of genes coding for lipid raft-associated components: a role for raft proteins in cell transformation and cancer progression (review). Oncol Rep. 2007 Jun;17(6):1279-90.
- PAULOVICH AG, TOCZYSKI DP, HARTWELL LH. When checkpoints fail. Cell. 1997 Feb 7;88(3):315-21.
- PELLEGRINI G, DELLAMBRA E, GOLISANO O, MARTINELLI E, FANTOZZI I, BONDANZA S, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 13;98(6):3156-61.
- PENG X, MARUO T, CAO Y, PUNJ V, MEHTA R, DAS GUPTA TK, et al. A novel RARbeta isoform directed by a distinct promoter P3 and mediated by retinoic acid in breast cancer cells. Cancer Res. 2004 Dec 15;64(24):8911-8.
- PERRY AS, FOLEY R, WOODSON K, LAWLER M. The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer. Endocr Relat Cancer. 2006 Jun;13(2):357-77.
- PETTY WJ, LI N, BIDDLE A, BOUNDS R, NITKIN C, MA Y, et al. A novel retinoic acid receptor beta isoform and retinoid resistance in lung carcinogenesis. J Natl Cancer Inst. 2005 Nov 16;97(22):1645-51.
- PFEIFER GP, DAMMANN R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. Biochemistry (Mosc). 2005 May;70(5):576-83.
- PICARD E, SEGUIN C, MONHOVEN N, ROCHETTE-EGLY C, SIAT J, BORRELLY J, et al. Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer. J Natl Cancer Inst. 1999 Jun 16;91(12):1059-66.
- PLATZ EA, HELZLSOUER KJ. Selenium, zinc, and prostate cancer. Epidemiol Rev. 2001;(23):93–101.
- QIU H, ZHANG W, EL-NAGGAR AK, LIPPMAN SM, LIN P, LOTAN R, et al. Loss of retinoic acid receptor-beta expression is an early event during esophageal carcinogenesis. Am J
Pathol. 1999 Nov;155(5):1519-23.

- RAMIREZ JL, TARON M, BALANA C, SARRIES C, MENDEZ P, DE AGUIRRE I, et al. Serum DNA as a tool for cancer patient management. Rocz Akad Med Bialymst. 2003;48:34-41.
- REIBENWEIN J, PILS D, HORAK P, TOMICEK B, GOLDNER G, WOREL N, et al. Promoter hypermethylation of GSTP1, AR, and 14-3-3sigma in serum of prostate cancer patients and its clinical relevance. Prostate. 2007 Mar 1;67(4):427-32.
- REYNOLDS MA. Molecular alterations in prostate cancer. Cancer Lett. 2008 Nov 18;271(1):13-24.
- RICHMOND PJ, KARAYIANNAKIS AJ, NAGAFUCHI A, KAISARY AV, PIGNATELLI M. Aberrant Ecadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. Cancer Res. 1997 Aug 1;57(15):3189-93.
- RICHTER F, JOYCE A, FROMOWITZ F, WANG S, WATSON J, WATSON R, et al. Immunohistochemical localization of the retinoic Acid receptors in human prostate. J Androl. 2002 Nov-Dec;23(6):830-8.
- ROBERTS RO, BERGSTRALH EJ, FARMER SA, JACOBSON DJ, HEBBRING SJ, CUNNINGHAM JM, et al. Polymorphisms in genes involved in sex hormone metabolism may increase risk of benign prostatic hyperplasia. Prostate. 2006 Mar 1;66(4):392-404.
- RODDAM AW, HAMDY FC, ALLEN NE, PRICE CP. The impact of reducing the prostate-specific antigen threshold and including isoform reflex tests on the performance characteristics of a prostate-cancer detection programme. BJU Int. 2007 Sep;100(3):514-7.
- ROUPRET M, HUPERTAN V, YATES DR, CATTO JW, REHMAN I, MEUTH M, et al. Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage. Clin Cancer Res. 2007 Mar 15;13(6):1720-5.
- ROUPRET M, HUPERTAN V, CATTO JW, YATES DR, REHMAN I, PROCTOR LM, et al. Promoter hypermethylation in circulating blood cells identifies prostate cancer progression. Int J Cancer. 2008 Feb 15;122(4):952-6.
- RUBIN MA, MUCCI NR, FIGURSKI J, FECKO A, PIENTA KJ, DAY ML. E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. Hum Pathol. 2001 Jul;32(7):690-7.
- SAHA B, ARASE A, IMAM SS, TSAO-WEI D, NARITOKU WY, GROSHEN S, et al. Overexpression of E-cadherin and beta-catenin proteins in metastatic prostate cancer cells in bone. Prostate. 2008 Jan 1;68(1):78-84.
- SAKR WA, GRIGNON DJ, CRISSMAN JD, HEILBRUN LK, CASSIN BJ, PONTES JJ, et al. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. In Vivo. 1994 May-Jun;8(3):439-43.

SAMPSON N, UNTERGASSER G, PLAS E, BERGER P. The ageing male reproductive tract. J

Pathol. 2007 Jan;211(2):206-18.

- SARAMAKI O, VISAKORPI T. Chromosomal aberrations in prostate cancer. Front Biosci. 2007;12:3287-301.
- SATHYANARAYANA UG, PADAR A, SUZUKI M, MARUYAMA R, SHIGEMATSU H, HSIEH JT, et al. Aberrant promoter methylation of laminin-5-encoding genes in prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. Clin Cancer Res. 2003 Dec 15;9(17):6395-400.
- SAWAN C, VAISSIERE T, MURR R, HERCEG Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. Mutat Res. 2008 Jul 3;642(1-2):1-13.
- SHIGEMATSU H, SUZUKI M, TAKAHASHI T, MIYAJIMA K, TOYOOKA S, SHIVAPURKAR N, et al. Aberrant methylation of HIN-1 (high in normal-1) is a frequent event in many human malignancies. Int J Cancer. 2005 Feb 10;113(4):600-4.
- SINGAL R, VAN WERT J, BASHAMBU M. Cytosine methylation represses glutathione Stransferase P1 (GSTP1) gene expression in human prostate cancer cells. Cancer Res. 2001 Jun 15;61(12):4820-6.
- SINGAL R, FERDINAND L, REIS IM, SCHLESSELMAN JJ. Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease. Oncol Rep. 2004 Sep;12(3):631-7.
- SIRCHIA SM, REN M, PILI R, SIRONI E, SOMENZI G, GHIDONI R, et al. Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. Cancer Res. 2002 May 1;62(9):2455-61.
- SONG MS, SONG SJ, AYAD NG, CHANG JS, LEE JH, HONG HK, et al. The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. Nat Cell Biol. 2004 Feb;6(2):129-37.
- SOOS G, TSAKIRIS I, SZANTO J, TURZO C, HAAS PG, DEZSO B. The prevalence of prostate carcinoma and its precursor in Hungary: an autopsy study. Eur Urol. 2005 Nov;48(5):739-44.
- SOPRANO DR, QIN P, SOPRANO KJ. Retinoic acid receptors and cancers. Annu Rev Nutr. 2004;24:201-21.
- STANFORD JL, STEPHENSON RA, COYLE LM, CERHAN J, CORREA R, ELEY JW, et al. Prostate Cancer Trends 1973-1995, SEER Program, National Cancer Institute. Bethesda, MD, 1999.
- STANFORD JL, OSTRANDER EA. Familial prostate cancer. Epidemiol Rev. 2001;23(1):19-23.
- STEPHENSON AJ, KATTAN MW, EASTHAM JA, DOTAN ZA, BIANCO FJ, JR., LILJA H, et al. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. J Clin Oncol. 2006 Aug 20;24(24):3973-8.
- STRAHL BD, ALLIS CD. The language of covalent histone modifications. Nature. 2000 Jan 6;403(6765):41-5.

- SUAREZ BK, LIN J, BURMESTER JK, BROMAN KW, WEBER JL, BANERJEE TK, et al. A genome screen of multiplex sibships with prostate cancer. Am J Hum Genet. 2000 Mar;66(3):933-44.
- SUZUKI H, ITOH F, TOYOTA M, KIKUCHI T, KAKIUCHI H, IMAI K. Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. Cancer Res. 2000 Aug 15;60(16):4353-7.
- TAKAI D, JONES PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19;99(6):3740-5.
- TAKEICHI M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science. 1991 Mar 22;251(5000):1451-5.
- TAYLOR WR, STARK GR. Regulation of the G2/M transition by p53. Oncogene. 2001 Apr 5;20(15):1803-15.
- THOMPSON IM, PAULER DK, GOODMAN PJ, TANGEN CM, LUCIA MS, PARNES HL, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. N Engl J Med. 2004 May 27;350(22):2239-46.
- TOMMASI S, DAMMANN R, ZHANG Z, WANG Y, LIU L, TSARK WM, et al. Tumor susceptibility of Rassf1a knockout mice. Cancer Res. 2005 Jan 1;65(1):92-8.
- TOYOTA M, HO C, AHUJA N, JAIR KW, LI Q, OHE-TOYOTA M, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. Cancer Res. 1999 May 15;59(10):2307-12.
- UMBAS R, ISAACS WB, BRINGUIER PP, SCHAAFSMA HE, KARTHAUS HF, OOSTERHOF GO, et al. Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. Cancer Res. 1994 Jul 15;54(14):3929-33.
- URANO T, TAKAHASHI S, SUZUKI T, FUJIMURA T, FUJITA M, KUMAGAI J, et al. 14-3-3sigma is down-regulated in human prostate cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jul 2;319(3):795-800.
- USHIJIMA T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. Nat Rev Cancer. 2005 Mar;5(3):223-31.
- VAN DER WEYDEN L, TACHIBANA KK, GONZALEZ MA, ADAMS DJ, NG BL, PETTY R, et al. The RASSF1A isoform of RASSF1 promotes microtubule stability and suppresses tumorigenesis. Mol Cell Biol. 2005 Sep;25(18):8356-67.
- VAN DER WEYDEN L, ADAMS DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. Biochim Biophys Acta. 2007 Sep;1776(1):58-85.
- VAN OORT IM, TOMITA K, VAN BOKHOVEN A, BUSSEMAKERS MJ, KIEMENEY LA, KARTHAUS HF, et al. The prognostic value of E-cadherin and the cadherin-associated molecules alpha-, beta-, gamma-catenin and p120ctn in prostate cancer specific survival: a long-term follow-up study. Prostate. 2007 Sep 15;67(13):1432-8.

VENER T, DERECHO C, BADEN J, WANG H, RAJPUROHIT Y, SKELTON J, et al. Development of a

multiplexed urine assay for prostate cancer diagnosis. Clin Chem. 2008 May;54(5):874-82.

- WANG X, TRYNDYAK V, APOSTOLOV EO, YIN X, SHAH SV, POGRIBNY IP, et al. Sensitivity of human prostate cancer cells to chemotherapeutic drugs depends on EndoG expression regulated by promoter methylation. Cancer Lett. 2008 Oct 18;270(1):132-43.
- WIENCKE JK, ZHENG S, MORRISON Z, YEH RF. Differentially expressed genes are marked by histone 3 lysine 9 trimethylation in human cancer cells. Oncogene. 2008 Apr 10;27(17):2412-21.
- WOODSON K, HANSON J, TANGREA J. A survey of gene-specific methylation in human prostate cancer among black and white men. Cancer Lett. 2004a Mar 18;205(2):181-8.
- WOODSON K, GILLESPIE J, HANSON J, EMMERT-BUCK M, PHILLIPS JM, LINEHAN WM, et al. Heterogeneous gene methylation patterns among pre-invasive and cancerous lesions of the prostate: a histopathologic study of whole mount prostate specimens. Prostate. 2004b Jun 15;60(1):25-31.
- WU C, MORRIS JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. Science. 2001 Aug 10;293(5532):1103-5.
- XU J, ISAACS SD, SUN J, LI G, WILEY KE, ZHU Y, ET AL. Association of prostate cancer risk variants with clinicopathologic characteristics of the disease. Clin Cancer Res. 2008;14(18):5819-24.
- XU XC, SNEIGE N, LIU X, NANDAGIRI R, LEE JJ, LUKMANJI F, et al. Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor beta messenger RNA level during breast carcinogenesis. Cancer Res. 1997 Nov 15;57(22):4992-6.
- XU XC. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer. Cancer Lett. 2007 Aug 8;253(1):14-24.
- YAMANAKA M, WATANABE M, YAMADA Y, TAKAGI A, MURATA T, TAKAHASHI H, et al. Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate. Int J Cancer. 2003 Sep 1;106(3):382-7.
- YANG Q, MORI I, SHAN L, NAKAMURA M, NAKAMURA Y, UTSUNOMIYA H, et al. Biallelic inactivation of retinoic acid receptor beta2 gene by epigenetic change in breast cancer. Am J Pathol. 2001 Jan;158(1):299-303.
- YEGNASUBRAMANIAN S, KOWALSKI J, GONZALGO ML, ZAHURAK M, PIANTADOSI S, WALSH PC, et al. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. Cancer Res. 2004 Mar 15;64(6):1975-86.
- ZEEGERS MP, JELLEMA A, OSTRER H. Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis. Cancer. 2003 Apr 15;97(8):1894-903.
- ZELENT A, MENDELSOHN C, KASTNER P, KRUST A, GARNIER JM, RUFFENACH F, et al. Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated

by usage of two promoters and alternative splicing. EMBO J. 1991 Jan;10(1):71-81.

- ZHANG J, LIU L, PFEIFER GP. Methylation of the retinoid response gene TIG1 in prostate cancer correlates with methylation of the retinoic acid receptor beta gene. Oncogene. 2004 Mar 18;23(12):2241-9.
- ZHENG SL, SUN J, WIKLUND F, SMITH S, STATTIN P, LI G, et al. Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. N Engl J Med. 2008;358(9):910-9.





RARB IS A BIOMARKER OF POOR PROGNOSIS IN PROSTATE CARCINOMAS

Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves^{a,b*}, Sandra Aparecida Drigo^{b*}, Cláudia Aparecida Rainho^c, João Lauro Viana de Camargo^a, Francisco Paulo da Fonseca^d, Fernando Augusto Soares^e, José Carlos Souza Trindade Filho^f, Maria Aparecida Custódio Domingues^a, Silvia Regina Rogatto^{b**}

^a Department of Pathology, Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

^b NeoGene Laboratory, Department of Urology, Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, and AC Camargo Cancer Treatment and Research Center, Sao Paulo, Brazil

^c Department of Genetics, Biosciences Institute, Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

^d Department of Pelvic Surgery, AC Camargo Cancer Treatment and Research Center, Sao Paulo, Brazil,

^e Department of Pathology, AC Camargo Cancer Treatment and Research Center, Sao Paulo, Brazil

^f Department of Urology, Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

*Both authors contributed equally to this work.

**Corresponding author:
Silvia Regina Rogatto, PhD
NeoGene Laboratory, Fundação Antonio Prudente, Hospital AC Camargo
Rua Professor Antonio Prudente, 211, Liberdade, São Paulo, Brazil
CEP: 01509-010
Phone: 55 11 21895163
Fax: 55 11 21895163
e-mail: rogatto@fmb.unesp.br and silvia.rogatto@hcancer.org.br

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Running title: RARB and prognosis in prostate carcinomas

Keywords (1 to 5): prostate cancer, *SFN*, *RARB*, *RASSF1A*, biochemical recurrence. *Journal of* Urology (IF: 4.053)

ABSTRACT

Purpose: Epigenetic alterations play critical roles in regulation of several genes and cellular functions and their deregulation may disrupt the cellular control leading to tumor development. The current study aimed to evaluate *SFN*, *RARB*, and *RASSF1A* hypermethylation frequencies in prostate carcinoma (PCa) and to correlate these alterations with down-regulations at transcriptional and protein levels.

Methods: Methylation pattern of *SFN*, *RARB*, and *RASSF1A* were determined by methylation-specific PCR in 68 PCa samples and 27 non-neoplastic prostate tissues. Gene expression was evaluated by quantitative RT-PCR in 73 PCa, 15 adjacent non-neoplastic prostate tissues (AdjP) and two normal prostate (N). Protein expression was evaluated by immunohistochemistry in 141 PCa, 40 AdjP and two N tissues. The findings were correlated with clinicopathological parameters and biochemical recurrence-free survival (BRFS).

Results: *RARB* and *RASSF1A* genes were hypermethylated in PCa (P < 0.0001 and P = 0.0017, respectively), but no difference was detected for *SFN*. *RASSF1A* mRNA and protein levels were similar in PCa and AdjP samples. Down-expression of *RAR* β in transcript (P=0.001) and protein (P=0.0007) levels were detected in tumors. Lower mRNA levels were correlated with *RARB* hypermethylation. Nuclear and cytoplasmic RAR β protein expression was detected in tumor tissues. Multivariate analysis demonstrated that cytoplasmic RAR β immunostaining was independently associated with decreased BRFS (P=0.019, HR=1.891).

Conclusions: *RARB* hypermethylation seems to be one of the mechanisms involved in RAR β down-expression in PCa. Cytoplasmic RAR β protein is an independent predictor of poor prognosis that may be considered a new biomarker in prostate cancer providing, therefore, relevant information for patient management.

INTRODUCTION

Epigenetic alterations are modifications that influence phenotype without altering the genotype and have been described as important mechanisms involved in carcinogenesis. The most studied epigenetic modification is the cytosine methylation of DNA within the CpG island (CGi). CGi is preferentially found in the gene promoter region and displays tissue restricted profile. ¹ Cancer development is accompanied by methylation changes, with global hypomethylation and also hypermethylation at specific promoters. Hypermethylation of tumor suppressor genes has been described as one of the mechanisms involved in gene silencing, ^{1, 2} and has already been detected in pre-malignant lesions, suggesting that epigenetic alterations may occur in early stages of neoplasia development. ³ Besides the tumor suppressor genes, hypermethylation of genes involved in the cell cycle, DNA repair, apoptosis, cell adhesion and angiogenesis have been detected in tumors. ³ It has been proposed that gene methylation profile can be used as biomarkers in oncology, since hypermethylation of specific genes is rarely found in healthy individuals compared with cancer patients, although it has been demonstrated that methylation increases with aging and environmental exposition. ^{3,4}

Molecular studies in specific genes (oncogenes and tumor suppressor genes) have revealed potential markers in prostate carcinomas; nevertheless, these changes were not sufficient to explain the development and progression of the disease. ⁵ In prostate cancer, many hypermethylated genes have been described and indicated as potential prostate cancer diagnosis markers, including *RARB*, *RASSF1A* and *SFN*. ^{2, 5, 6} The *RARB* (*retinoic acid receptor beta*) gene encodes a member of nuclear hormone receptor that binds retinoic acid. Retinoic acid regulates several essential biological processes that include cell growth, differentiation and apoptosis, and also can suppress carcinogenesis in different tissues. ⁷ *RASSF1A* (*Ras-association domain family IA*) gene is a tumor suppressor associated with regulation of the cell cycle, apoptosis and genetic instability. ⁸ *SFN* (*stratifin*) is a putative tumor suppressor gene involved in cell cycle regulation and apoptosis following DNA damage. ⁹ High frequencies of promoter methylation of *RARB*, ¹⁰ *RASSF1A*, ^{11, 12} and *SFN* ¹³ were detected in prostate tumors. Furthermore, hypermethylation of *RARB* ^{10, 14} and *RASSF1A* ^{11, 12, 14} were associated with poor prognosis in PCa patients.

To our knowledge, there is a paucity of studies addressing the association between hypermethylation of *RARB*, ¹⁵ *RASSF1A* and *SFN* genes ⁹ and transcript or protein expression levels in prostate carcinomas and their association with clinical outcome. In this context, the current study aimed to determine if the presence of promoter DNA hypermethylation could

alter mRNA and protein expression levels in prostate cancer. For this proposal, we firstly detected the prevalence of hypermethylation of *RARB*, *RASSF1A* and *SFN* genes in prostate carcinomas and then selected the informative candidate genes to evaluate the correlation of methylation patterns with transcript levels. To validate these data, protein analysis was conducted in prostate samples from an independent cohort of PCa patients and the findings were associated with clinicopathological parameters and with disease recurrence.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The study included 250 prostate cancer patients followed prospectively at the Clinical Hospital, Medical School, São Paulo State University (2001 to 2007) and at the AC Camargo Cancer Hospital (1993 to 2002). All the patients were advised of the procedures and provided written informed consent. The Human Research Ethics Committee approved this study (CONEP # 304/2000).

Methylation analysis was evaluated in 68 PCa samples and 27 histopathologically confirmed non-neoplastic prostate (NNP) tissues. The NNP samples were obtained from patients that undergoing ultrasound-guided needle biopsies due to abnormal PSA levels and/or suspected PCa after digital rectal exams. These individuals not show any evidence of prostate lesions during the follow-up period (median=63 months, Table 1).

Fresh PCa samples (n=73) and adjacent non-neoplastic prostate (AdjP) tissues (n=15) from PCa patients were evaluated for transcript expression analysis. Two normal prostate tissues (with histopathologically confirmed absence of PCa, intra-epithelial neoplasia, benign prostate hyperplasia-BPH, or prostatitis) from necropsies were considered as controls. These individuals were 40 and 49 years of age, respectively. A subset of these samples was evaluated by methylation pattern and transcript expression (30 PCa, 10 AdjN, and two normal prostate tissues). One hundred forty one PCa and 40 AdjP formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue specimens were evaluated by immunohistochemistry assays.

All samples evaluated were from untreated patients. Radical retropubic prostatectomy (RRP) was the primary treatment in 215 patients. Twenty-nine PCa patients received hormone therapy before RRP. In these cases, biopsy samples were taken before neoadjuvant treatment. Six cases did not undergoing PPR due to advanced age or metastasis at diagnosis; the biopsy samples collected from these patients were evaluated in methylation analysis. Table 1 summarizes the clinicopathological features of patients and controls.

Methylation Analysis

Genomic DNA was obtained by sodium dodecyl sulfate/proteinase K digestion, followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. The Methylation Specific- Polymerase Chain Reaction (MSP) was performed using genomic DNA (2 μ g) treated with sodium bisulfite as previously described. ¹⁶ For each gene, specific primers for methylated and unmethylated sequences, CpGs island locations and PCR conditions were described elsewhere. ¹⁷

Gene Expression analysis by Real-Time RT-PCR

Hematoxylin-eosin (HE) stained slides were used as a guide to histological evaluation and to select the representative tumor areas for microdissection. Total RNA was extracted from pulverized fresh frozen tissue using an RNeasy mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The RNA extraction and cDNA synthesis were performed as previously described (Rosa et al, 2008). Primers for RARB and RASSF1A and HPRT (reference gene) were designed using Primer Expression software (Applied Biosystems, Foster City, CA) and sequences were: for RARB (F)5'-TCTGTGGAGACCGCCAGG-3' and (R)5'-GGGTCGTCTTTTTCTGATATAAATTTTT-3'; for RASSF1A (F)5'-TGGATGATGAGCAGCCCC-3' and (R)5'-TCCCAGTTCACCTCCCCAG-3'; and for HPRT (F)5'-TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG-3' and (R)5'-GGCCTCCCATCTCCTTCATC-3'. Assays were run in duplicate on an ABI Prism® 7000 in a total volume of 10µl containing 5µl Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 µl cDNA (1:5) and 200nM of each primer set. The reactions were incubated in a 96-well optical plate at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 60 s. Gene relative quantification (RQ) was calculated by $\Delta\Delta Ct$ method.¹⁸ The transcript levels were considered up-regulated ($RQ \ge 2.0$) or down-regulated (RO < 0.5).

Protein Analysis

For immunohistochemistry analysis, FFPE samples were displayed into a tissue microarray (TMA). The TMA construction was described in details in Yoshimoto et al (2008). ¹⁹ Anti-RAR- β MS-1342-P1 monoclonal antibody diluted 1:400 (Lab Vision, Fremont, CA, USA) and anti-RASSF1A monoclonal antibody diluted 1:20 (ab23950; Abcam, Cambridge, UK) were used to IHC reactions. The sections were washed in PBS, incubated for 30 min with secondary biotinylated antibody, followed by 30 min incubation with streptavidin

peroxidase complex (LSAB, DAKO, Carpinteria, CA, USA). The immunostaining was performed by incubating slides with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and counterstained with hematoxylin. Normal colon was used as positive control in each assay. Two normal prostate specimens were also included as controls. For RAR β protein analysis, the final scores were negative and positive according to the absence or presence of nuclear or cytoplasmic immunostaining. The final scores for RASSF1A were weak and moderate expression according to cytoplasmic immunostaining intensity. The IHC scoring was blinded to the outcome and clinical aspects of each tumor specimen.

Data Analysis

Chi-square or Fisher exact test were applied to determine the strength of association between the categorical variables. Comparisons of transcript levels in different groups were done by Mann-Whitney test. Biochemical recurrence-free survival (BRFS) probabilities according to proteins expression were calculated based on the Kaplan-Meier method. The end-point was calculated by the time from RRP until the biochemical recurrence (defined as the data of the first PSA>0.2 ng/mL confirmed in two consecutive tests). Clinical stage IV patients were excluded from the analyses. Multivariate analysis was performed using Cox proportional hazards in a model that included all variables presenting *P*-value<0.20 on the univariate analysis. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism3 (San Diego, CA, USA) and SPSS version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) for Windows.

RESULTS

Hypermethylation of *RARB* and *RASSF1A* genes were significantly associated with PCa compared with age-matched NNP tissues (P<0.0001 and P=0.0017, respectively), but no difference was found for *SFN* gene (Table 2). *SFN*, *RARB* and *RASSF1A* hypermethylation in PCa was age-independent and no association with family history of cancer and other clinicopathological parameters were observed (data not shown). Nonetheless, it was detected that 79% of PCa cases showed hypermethylation for both genes, *RARB* and *RASSF1A*. The three genes evaluated presented concurrent hypermethylation in 53% of the cases (21 out of 39 samples). The significant association found in DNA methylation involving *RARB* and *RASSF1* genes was the criteria to select these genes for further analysis (qRT-PCR and IHC).

The transcript expression analysis revealed *RARB* down-expression in PCa samples (P=0.001, Fig 1A). In 30 PCa and 10 AdjP cases, paired methylation and mRNA analysis was evaluated. *RARB* gene hypermethylation was detected in 30 out of 30 PCa and in 5 out of 10 AdjP samples. Seventy percent (21/30) of PCa samples showed concurrent hypermethylation and mRNA down-expression. In 7 out of 9 PCa that presented *RARB* hypermethylation, it was observed lower mRNA levels. In AdjP samples, 40% (2/5) showed hypermethylation and transcript down-expression, and in one case with *RARB* gene hypermethylation it was detected lower expression level (RQ=0.65).

The RAR β protein analysis showed predominantly nuclear immunostaining in prostate tissues; however, in a subset of AdjP and tumor samples was observed cytoplasmic immunostaining (Fig 1 B-F). In agreement with mRNA results, down-regulation of nuclear RAR β immunostaining was observed in tumor samples (*P*=0.0007, Table 3). Cytoplasmic RAR β immunostaining was more frequently detected in PCa (21%) compared with AdjP (9%), although with no statistical significance (Table 3). Among the PCa cases with cytoplasmic RAR β (n=28), only six samples (21%) showed concomitant nuclear RAR β immunostaining (Fig 1E). Interestingly, cytoplasmic RAR β protein expression was found in one case showing vascular invasion by tumor cells (Fig 1F).

RASSF1A gene expression analysis revealed no significant differences in the comparison between PCa and AdjP tissues (Fig 1G). Paired methylation and gene expression analyses in 30 PCa and 10 AdjP revealed no correlation between *RASSF1A* hypermethylation and mRNA down-expression. Among the 28 hypermethylated PCa, only one sample (4%) showed lower transcript levels. In addition, 9 out of 10 AdjP samples were hypermethylated and none of them showed mRNA down-expression. The RASSF1A protein analysis exhibited cytoplasmic immunostaining (Fig H-J). Heterogeneous protein expression pattern was observed in normal prostate samples. Weak immunostaining was predominantly detected in normal prostate tissues (60% of the tissue), with moderate expression in some areas (Fig 1H). Similarly to mRNA results, no difference in RASSF1A protein levels was detected between PCa and AdjP samples (Table 3). Prostate tumors showed predominantly weak protein expression levels (Fig 1 I-J).

The RAR β and RASSF1A mRNA and protein levels were evaluated according to the clinicopathological features in PCa cases. Lower transcript levels of *RARB* were marginally associated with higher preoperative PSA values (PSA>4.0 ng/mL *versus* PSA \leq 4.0ng/ml; n = 69, *P* =0.043, data not shown), but it was not confirmed by protein analysis. Positive tumors

for cytoplasmic RAR β was statistically associated with biochemical recurrence in PCa cases (*P*=0.037). In this study, 75 patients presented biochemical recurrence, 27% of them showed positive cytoplasmic RAR β tumors compared with 73% with negative cytoplasmic immunostaining. In PCa patients without biochemical recurrence during the follow-up period (n=58), 12% and 88% were positive and negative for cytoplasmic RAR β , respectively. None association was detected for RAR β and RASSF1A expression levels and any other clinicopathological variables evaluated.

Survival analysis was conducted to determine the prognostic value of tumor cytoplasmic RAR β expression in a cohort of 128 patients (Table 4). In agreement with our previous results, the biochemical recurrence was not influenced by nuclear RAR β expression (Fig 2A and Table 4). However, patients with positive cytoplasmic RAR β tumors exhibited a statistically higher probability of biochemical-recurrence (*P*=0.002, Fig 2B and Table 4). The 5-year biochemical-recurrence probabilities were 29% and 58% for positive and negative cytoplasmic tumors, respectively. Five-year BRFS was also influenced by the following parameters: preoperative PSA level, pathological staging, Gleason score, surgical margins, seminal vesicle invasion and neoadjuvant treatment (Table 4).

Multivariate analysis was performed to determine whether the presence of cytoplasmic RAR β was an independent factor in predicting biochemical-recurrence. The positive cytoplasmic RAR β , preoperative PSA level and seminal vesicule invasion were found as independent prognostic factors for BRFS (Table 5). Patients with positive cytoplasmic RAR β tumors showed higher risk for biochemical-recurrence than patients with negative tumors (HR=1.891; CI_{95%}=1.112- 3.216; *P*=0.019). Interestingly, five patients died due to prostate cancer and only one case was negative for cytoplasmic RAR β .

DISCUSSION

Hypermethylation of *SFN*, *RARB*, and *RASSF1A* genes have been proposed as potential biomarkers in prostate carcinomas.^{2, 5, 6} However, there is paucity of studies addressing if these epigenetic alterations are correlated with transcriptional and protein expression levels and with clinicopathological parameters in prostate tumors.

In this study, in agreement with previous reports, high frequencies of *RARB*, *RASSF1A* and *SFN* genes hypermethylation were detected in prostate tumors. ^{12, 13} DNA hypermethylation in PCa cases was an age-independent event. This finding in association with high frequency of cases showing at least two genes hypermethylated suggests the occurrence

of the deregulation of the methyltransferase activity during tumor progression. ²⁰ Disruption of the maintenance mechanism of methylation could lead to a genomic wide effect with several CGis showing abnormal methylation patterns; however, this event is considered nonrandom in tumor cells, as suggested by abnormal tumor specific methylation profiles. ¹⁶

Statistically significant differences in methylation patterns between PCa and agematched NNP tissues obtained from men who experienced prostate biopsies for PCa screening were observed only for the RARB and RASSF1A genes. High hypermethylation frequencies of both genes (52 and 57%, respectively) were detected in NNP samples. Kwabi-Addo et al (2007)²¹ also detected hypermethylation of these genes in pathologically normal human prostate as a function of age, but higher frequencies in PCa samples were observed in comparison with matched benign prostate tissues. The authors found that the average of RARB gene methylation seen in cancer samples was at least 2.7-fold higher when compared with the normal prostate tissues. Similarly, for the RASSF1A gene, the average methylation level in prostate cancer tissues was at least 2-fold higher compared with that in normal prostate tissues. In the present study, it was detected 1.7 and 1.5-fold higher PCa hypermethylation in RARB and RASSF1, respectively, in comparison with NPP cases. RASSF1A hypermethylation has already been detected in adjacent non-neoplastic prostatic tissues from PCa²² and in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) patients, ²³ whereas the methylation levels detected were dependent on the CpG site interrogated and the methodology employed to assess DNA methylation. Although it has been evaluated a small number of adjacent non-neoplastic prostate tissues, these results suggest that RASSF1A methylation is also altered in histopathologically normal prostate tissues from PCa patients.

In the subgroup of 30 PCa samples simultaneously evaluated by MSP and qRT-PCR, *RASSF1A* hypermethylation was not associated with mRNA expression. In matched cases (30 PCa and 10AdjP) evaluated by methylation pattern and transcript expression, only one PCa sample showed concordant *RASSF1A* hypermethylation and lower level of mRNA; 28 PCa cases hypermethylated presented normal transcript expression. Moreover, although the hypermethylation has been detected in 88% of the tumors, only 5 out of 73 (7%) PCa samples showed transcripts down-expression (RQ \leq 0.5) compared with the controls (two normal prostates tissues).These discrepant data may be explained by the fact that tiny amounts of cells showing DNA hypermethylation are promptly detected in a background of heterogeneous cancer cells. Alternatively, there are evidences that methylation of a relative small 'core' region covering the transcription start site is associated with gene silencing, while methylation outside of the core region, but still within a promoter CGi, does not necessarily lead to transcriptional inactivation. ⁴ However, in the present study, the primers sequences selected for MSP approach was specifically designed to interrogate the CpG dinucleotides into the core region and thus should correlate with the gene expression status. This hypothesis is supported by the RASSF1A protein expression pattern predominantly classified as week or moderate in PCa samples (n=141) as well as in AdjP tissues (n=40). In summary, these data suggest that aberrant methylation patterns might reflect a pre-malignant characteristic, supporting the hypothesis that epigenetic alterations in cancer may preexist in morphologically normal cells.

In contrast, RARB hypermethylation was associated with transcription repression in prostate samples as demonstrated by lower levels of mRNA detected in matchedhypermethylated samples. In addition, significant mRNA down-expression was detected in PCa compared with AdjP samples. Lower RARB mRNA levels were detected in 58% (41 out of 71) PCa samples compared with normal controls. The protein analysis confirmed the significant down-regulation of nuclear RAR β in tumor samples. In agreement with our findings, down-regulation of RAR β in transcript ²⁴ and protein levels ²⁵ were previously described in prostate tumors, but in these studies the RARB methylation profiles were not simultaneously investigated. To our knowledge, only one study evaluated the RARB methylation and mRNA expression by qualitative RT-PCR in PCa tissues.¹⁵ Besides the small number of patients evaluated and low sensitivity of the RT-PCR method used to detect the transcript, the authors found an association between hypermethylation and mRNA downexpression in five out of eight PCa samples analyzed. Taken all together, our data highly indicate that the CpG island examined here (positions 111; 113; 117; 122; 231; 236; 249 of interrogated CpGs in relation to transcription start site) is located in the CGi 'core' region and is essential to the gene transcription regulation in prostate tissues. Nevertheless, our data do not exclude other mechanisms involved in RARB gene silencing, such as decreased levels of co-activators, the presence of co-repressors or histone deacetylation. ⁷ In conclusion, we demonstrated that the RARB hypermethylation is a biomarker in prostate cancer directly related with gene silencing and this information can contribute to the prostate cancer biology knowledge.

Surprisingly, cytoplasmic RAR β staining was observed in a subset of tumor samples (21%) and AdjP (9%) tissues, but not in normal prostate tissues. Cytoplasmic RAR β immunostaining was previously described in epithelial cells from BPH samples but not in

normal glands. ²⁵ Different RAR^β protein isoforms have been described in different tumor cell types. In special, high levels of RAR^{β4} isoform was previously detected in human breast tumor cells with nuclear and cytoplasmic localization. ²⁶ RAR β 2 is the most abundant and the major RAR (retinoic acid receptor) inducible isoform.⁷ There are some evidences that RAR β 4 is the product of alternative splicing from the *RARB2* transcripts and is initiated by the CUG codon.²⁷ Retinoic acid receptors (RARs) present six distinct domains (A–F) that contain functional units of the transcription factor. ^{26, 27} The RAR_β2 and RAR_β4 isoforms differ only in the N-terminal A region of the protein. The RARB4 mRNA lacks 357 nucleosides that are present in the RARB2 mRNA.²⁷ It has been suggested that, in contrast of tumor suppression activity of RAR^β2, RAR^β4 may be an oncogene by acting as dominantnegative form of RARβ2.²⁸ Xu et al (2005)²⁹ showed that *RARB2* mRNA was reduced in esophageal cancer cases compared with normal samples. The RARB4 mRNA levels were detected in normal samples, but were marginally increased in tumors. Moreover, the negative correlation of RARB2 and RARB4 transcript levels were observed in tumor samples. Khuri et al, (2000)³⁰ showed an unexpected worse outcome in a subset of non-small-cell lung cancer patients presenting high levels of *RARB* assessed by *in situ* mRNA hybridization. The authors suggested that one possible explanation for their findings was the detection of RARB4 mRNA isoform in a subset of tumor samples.

In the present study, cytoplasmic RAR β , but not nuclear staining, was statistically associated with disease recurrence in prostate cancer patients. In addition, patients with positive tumors for cytoplasmic RAR β showed statistically higher probability of biochemical-recurrence as demonstrated in survival analysis. Further multivariate analysis pointed out cytoplasmic RAR β , besides the high levels of PSA and seminal vesicle invasion (two well established markers for worse prognosis), as an independent prognostic marker associated with disease recurrence. As the RAR β 2 and RAR β 4 isoforms differ only in the N-terminal portion, it is reasonable to suggest that the monoclonal antibody used in IHC reactions recognizes a common epitope from the two proteins. Therefore, it suggests that cytoplasmic RAR β protein detected in prostate tumors may actually refer to RAR β 4 isoform.

Another isoform named RAR β 5 that lacks the A, B and part of C- domains of RAR β 2 was also described. ³¹ The mRNA of *RARB5* isoform was detected in normal, pre-malign and malign breast cancer cell lines, but the protein assessed by Western blot was mostly expressed in ER-negative breast cell lines. ³¹ In addition, there is a report of *RARB5* mRNA expression in prostate cell lines (PC-3 and LNCaP). ³² It has been suggested that RAR β 5 isoform can

compete with other retinoic acid receptors, such as RAR β 2, and then modulate the gene transcription and signaling mediated by RARs. In addition, up-regulation of RAR β 5 expression may occur in the early stages of carcinogenesis, as demonstrated in mammary carcinogenesis, and may correlate with suppression of RAR β 2 expression.³²

Cumulative evidences have suggested that the RAR β 4 isoform, located in cytoplasmic and nuclear compartments, either may be an oncogene or may have oncogenic effects. ⁷ The current knowledge about the RAR β isoforms indicates that the present results are better explained by the presence of RAR β 4 isoform.

CONCLUSIONS

This study demonstrated the *RARB* promoter hypermethylation was associated with gene silencing in prostate carcinomas. Unexpectedly, it was detected cytoplasmic RAR β protein expression in tumor samples associated with worse outcome, which in light of the current knowledge can be the RAR β 4 isoform. Further studies might to contribute to better understand the complex role of retinoic acid pathway in prostate carcinogenesis and ultimately may have clinical relevance in selecting patients that may benefit from treatment with retinoids in clinical trials.

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

- PCa Prostate Carcinoma
- NNP Non-neoplastic prostate tissue
- AdjP Adjacent non-neoplastic prostate tissue
- RRP Radical retropubic prostatectomy
- PSA prostate specific antigen
- MSP Methylation Specific- Polymerase Chain Reaction
- qRT-PCR quantitative Real-Time reverse transcription- polymerase chain reaction
- mRNA RNA messenger
- TMA Tissue microarray
- IHC immunohistochemistry
- BRFS Biochemical recurrence-free survival
- RAR Retinoic acid receptor
- HPRT Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase
- PC-3 prostate cancer cell line
- LNCaP Human prostate adenocarcinoma cell line

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil. The authors would like to thank Greicy Helen Ribeiro Gambarani and Shadia Muhammad Ihlaseh, for their expert technical assistance.

REFERENCES

- 1. Illingworth, R. S., Bird, A. P.: CpG islands 'A rough guide'. FEBS Lett, 2009
- Cooper, C. S., Foster, C. S.: Concepts of epigenetics in prostate cancer development. Br J Cancer, 100: 240, 2009
- 3. Lopez, J., Percharde, M., Coley, H. M., Webb, A., Crook, T.: The context and potential of epigenetics in oncology. Br J Cancer, 100: 571, 2009
- 4. Ushijima, T.: Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. Nat Rev Cancer, 5: 223, 2005
- 5. Dobosy, J. R., Roberts, J. L., Fu, V. X., Jarrard, D. F.: The expanding role of epigenetics in the development, diagnosis and treatment of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. J Urol, 177: 822, 2007
- 6. Perry, A. S., Foley, R., Woodson, K., Lawler, M.: The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer. Endocr Relat Cancer, 13: 357, 2006
- 7. Xu, X. C.: Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer. Cancer Lett, 253: 14, 2007
- Donninger, H., Vos, M. D., Clark, G. J.: The RASSF1A tumor suppressor. J Cell Sci, 120: 3163, 2007
- 9. Horie-Inoue, K., Inoue, S.: Epigenetic and proteolytic inactivation of 14-3-3sigma in breast and prostate cancers. Semin Cancer Biol, 16: 235, 2006
- 10. Jeronimo, C., Henrique, R., Hoque, M. O., Ribeiro, F. R., Oliveira, J., Fonseca, D. et al.: Quantitative RARbeta2 hypermethylation: a promising prostate cancer marker. Clin Cancer Res, 10: 4010, 2004
- Jeronimo, C., Henrique, R., Hoque, M. O., Mambo, E., Ribeiro, F. R., Varzim, G. et al.: A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. Clin Cancer Res, 10: 8472, 2004
- 12. Cho, N. Y., Kim, B. H., Choi, M., Yoo, E. J., Moon, K. C., Cho, Y. M. et al.: Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. J Pathol, 211: 269, 2007
- 13. Lodygin, D., Diebold, J., Hermeking, H.: Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3sigma expression. Oncogene, 23: 9034, 2004

- 14. Maruyama, R., Toyooka, S., Toyooka, K. O., Virmani, A. K., Zochbauer-Muller, S., Farinas, A. J. et al.: Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. Clin Cancer Res, 8: 514, 2002
- 15. Nakayama, T., Watanabe, M., Yamanaka, M., Hirokawa, Y., Suzuki, H., Ito, H. et al.: The role of epigenetic modifications in retinoic acid receptor beta2 gene expression in human prostate cancers. Lab Invest, 81: 1049, 2001
- Caldeira, J. R., Prando, E. C., Quevedo, F. C., Neto, F. A., Rainho, C. A., Rogatto, S. R.: CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. BMC Cancer, 6: 48, 2006
- Negraes, P. D., Favaro, F. P., Camargo, J. L., Oliveira, M. L., Goldberg, J., Rainho, C. A. et al.: DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. BMC Cancer, 8: 238, 2008
- 18. Livak, K. J., Schmittgen, T. D.: Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25: 402, 2001
- Yoshimoto, M., Joshua, A. M., Cunha, I. W., Coudry, R. A., Fonseca, F. P., Ludkovski, O. et al.: Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. Mod Pathol, 21: 1451, 2008
- 20. De Marzo, A. M., Marchi, V. L., Yang, E. S., Veeraswamy, R., Lin, X., Nelson, W. G.: Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. Cancer Res, 59: 3855, 1999
- Kwabi-Addo, B., Chung, W., Shen, L., Ittmann, M., Wheeler, T., Jelinek, J. et al.: Agerelated DNA methylation changes in normal human prostate tissues. Clin Cancer Res, 13: 3796, 2007
- 22. Mehrotra, J., Varde, S., Wang, H., Chiu, H., Vargo, J., Gray, K. et al.: Quantitative, spatial resolution of the epigenetic field effect in prostate cancer. Prostate, 68: 152, 2008
- 23. Aitchison, A., Warren, A., Neal, D., Rabbitts, P.: RASSF1A promoter methylation is frequently detected in both pre-malignant and non-malignant microdissected prostatic epithelial tissues. Prostate, 67: 638, 2007
- 24. Lotan, Y., Xu, X. C., Shalev, M., Lotan, R., Williams, R., Wheeler, T. M. et al.: Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal and malignant prostates. J Clin Oncol, 18: 116, 2000
- 25. Richter, F., Joyce, A., Fromowitz, F., Wang, S., Watson, J., Watson, R. et al.: Immunohistochemical localization of the retinoic Acid receptors in human prostate. J Androl, 23: 830, 2002
- 26. Sommer, K. M., Chen, L. I., Treuting, P. M., Smith, L. T., Swisshelm, K.: Elevated retinoic acid receptor beta(4) protein in human breast tumor cells with nuclear and cytoplasmic localization. Proc Natl Acad Sci U S A, 96: 8651, 1999

- 27. Nagpal, S., Zelent, A., Chambon, P.: RAR-beta 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR-beta 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon. Proc Natl Acad Sci U S A, 89: 2718, 1992
- 28. Chen, L. I., Sommer, K. M., Swisshelm, K.: Downstream codons in the retinoic acid receptor beta -2 and beta -4 mRNAs initiate translation of a protein isoform that disrupts retinoid-activated transcription. J Biol Chem, 277: 35411, 2002
- 29. Xu, X. C., Lee, J. J., Wu, T. T., Hoque, A., Ajani, J. A., Lippman, S. M.: Increased retinoic acid receptor-beta4 correlates in vivo with reduced retinoic acid receptor-beta2 in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 14: 826, 2005
- Khuri, F. R., Lotan, R., Kemp, B. L., Lippman, S. M., Wu, H., Feng, L. et al.: Retinoic acid receptor-beta as a prognostic indicator in stage I non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 18: 2798, 2000
- 31. Peng, X., Maruo, T., Cao, Y., Punj, V., Mehta, R., Das Gupta, T. K. et al.: A novel RARbeta isoform directed by a distinct promoter P3 and mediated by retinoic acid in breast cancer cells. Cancer Res, 64: 8911, 2004
- 32. Christov, K.: The novel RARbeta isoform (beta5) is a potential target of retinoids in breast cancer. Curr Cancer Drug Targets, 9: 142, 2009

	DNA Methylatic	on Analysis - MSP	Gene Expressi	on - qRT-PCR	Protein Expre	ession - IHC
Variable	PCa (n=68) ¹	NNP (n=27)	PCa (n=73) ¹	AdjP (n=15) ²	PCa (n=141)	AdjP (n=40)
Age (years) Median (range)	65 (50 - 84)	66 (47-85)	62 (43 - 79)	65 (52 - 75)	63 (41 -75)	63 (44 - 75)
Follow-up (months) Median (range)	41 (4 - 81)	63 (11 – 81)	31 (1 - 93)	13 (1- 46)	87 (27- 161)	118 (21 - 162)
<i>PSA</i> (<i>ng/mL</i>) ³ Median (range)	8.1 (0.2 - 987)	5.30 (0.58-18.59)	7.5 (1.8 – 37.95)	8.1 (3.97 - 28.64)	9.2 (1.20-310)	9.8 (2.1 – 36.4)
Gleason score						
2 - 4	3	ı	·	I	5	ı
5 -7	55	ı	99	ı	129	ı
8 - 10	10	I	7	I	L	I
Pathological staging						
Ι	ı	ı		I	·	·
II	32	·	34		67	
III	25	I	34	I	99	ı
IV	4	ı	5		8	
ND (biopsies)	L	ı	ı	ı	I	ı
Lymph node metastasis Absent	58	I	72	ı	136	ı

Table 1. Clinicopathological features of the prostate carcinoma (PCa) patients, non-neoplastic prostate tissue (NNP) and adjacent non-neoplastic

- 5 -	•		- 8 -	- 58 -	- 75 -	•		- 141 -	- 0 -
1	·		5	26	42			73	0
	•		-			- 1		- L	
Present 2	ND (biopsies) 8	Recurrence risk ⁴	Low 5	Moderate 2.	High 3.	ND (biopsies) 7	Metastasis at diagnosis	Absent 6	Present 1

¹ In 30 PCa cases, methylation and q-RTPCR analysis were done in matched samples.

^{2.} In 10 cases of Adj group, methylation and q-RTPCR analysis were done in matched samples.

³ The PSA values in PCa and AdjP groups refer to the last preoperative and last results, respectively.

⁴ According to NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology TM: Prostate Cancer, Version 2. 2007 ND - not determined.

	Meth	ylation				
Genes	Positive (%)	Negative (%)	P value*	OR (CI _{95%})		
SFN			0.75	0.67 (0.18 - 2.51)		
PCa (n=39)	31 (79)	8 (21)				
NNP (n=27)	23 (85)	4 (15)				
RARB			< 0.0001	8.09 (2.72 – 24.00)		
PCa (n=68)	61 (90)	7 (10)				
NNP (n=27)	14 (52)	13 (48)				
RASSF1A			0.0017	5.53 (1.77 - 17.24)		
PCa (n=67)	59 (88)	8 (12)				
NNP (n=21)	12 (57)	9 (43)				

Table 2. SFN, RARB and RASSF1A methylation patterns in prostate carcinoma (PCa) and non-neoplastic prostate (NNP) tissues.

* Fisher exact test; OR – odds ratio; CI $_{95\%}$ - confidence interval of 95%.

Positive Negative Positive Negative PCa 46 (34) 88 (66) 0.0007 28 (21) 106 (79) 0.118	Samples	n (nuclear) %)	P value ¹	RARβ (cy ¹ n ('	toplasmic) %)	P value ²	RASS n (5	;F1A %)	<i>P</i> value ²
PCa 46 (34) 88 (66) 0.0007 28 (21) 106 (79) 0.118		Positive	Negative		Positive	Negative		Moderate	Weak	
	PCa	46 (34)	88 (66)	0.0007	28 (21)	106 (79)	0.118	4 (3)	137 (97)	0.577
AdjP 22 (67) 11(33) 3 (9) 30 (91)	AdjP	22 (67)	11(33)		3 (9)	30 (91)		0	40 (100)	

¹ Chi-square test; ² Fisher exact test

Variable	Ν	5 years BRFS (%)	<i>P</i> value ¹
$RAR\beta$ (cytoplasmic)			0.002
Negative	100	58	
Positive	28	29	
RARβ (nuclear)			0.363
Negative	84	43	
Positive	44	59	
Age (years)			0.757
<55	101	50	
≥55	27	56	
Preoperative PSA (ng/mL)			<0.001
<20.0	108	59	
≥20.0	17	6	
Pathological staging			0.059
П	67	62	
III	61	39	
Gleason score			0.006
<7(3+4)	113	55	
≥7(4+3)	15	27	
Recurrence risk ²			0.059
Low/moderate	67	62	
High	61	39	
Angiolymphatic invasion			0.224
Negative	104	52	0.221
Positive	24	46	
Capsular invasion			0.075
Negative	60	61	
Positive	68	42	
Margins			0.007
Negative	91	60	
Positive	37	29	
Seminal vesicle invasion			<0.001
Negative	118	55	100001
Positive	10	10	
Neoadjuvant treatment			~0.001
Negative	107	57	N0.001
Positive	21	24	

 Table 4. Univariate analysis of biochemical recurrence-free survival (BRFS) in prostate cancer patients.

¹ Log-rank test. ² According to NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology TM: Prostate Cancer, Version 2. 2007

Table 5.	Multivariate	analysis	for	biochemical	recurrence-free	survival	in	prostate	cancer
patients (n	= 128)								

Variable	P value ¹	HR (CI _{95%})
Cytoplasmic RAR β (positive <i>versus</i> negative)	0.019	1.891 (1.112- 3.216)
Preoperative PSA (≥20ng/ml versus <20ng/ml)	<0.001	3.877 (2.077- 7.236)
Seminal vesicle invasion (positive versus negative)	0.005	3.126 (1.398- 6.988)

¹ Cox regression model adjusted for neoadjuvant treatment; HR – hazard ratio; $CI_{95\%}$ – confidence interval of 95%.

LEGENDS

Figure 1. RAR β (**A-F**) and RASSF1A (**G-J**) transcript and protein expression in prostate carcinomas (PCa) and in adjacent non-neoplastic prostate (AdjP) tissues. The mRNA relative quantification values for *RARB* (**A**) and *RASSF1A* (**G**) genes are shown in log scale. RAR β IHC results: nuclear immunostaining in normal prostate tissue (**B**); negative PCa sample (**C**); positive cytoplasmic PCa sample (**D**); concurrent cytoplasmic and nuclear positive staining in PCa tissue (**E**); vascular invasion by tumor cells showing cytoplasmic RAR β protein expression (**F**). RASSF1A IHC results: heterogeneous protein expression in normal prostate tissue showing areas with weak and moderate cytoplasmic immunostaining (**H**); weak (**I**) and moderate (**J**) protein expression in PCa tissues.

Figure 2. Biochemical recurrence-free survival (BRFS) curves according to (**A**) nuclear (P=0.363) and (**B**) cytoplasmic (P=0.002) RAR β immunostaining in prostate cancer samples. *P* values were determined by *Log-rank* test.







Follow-up (months)



CDH1 METHYLATION PATTERN AND HETEROGENEOUS E-CADHERIN EXPRESSION IN PROSTATE CANCER

Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves^{a,b}, Sandra Aparecida Drigo^b, Cláudia Aparecida Rainho^c, Fabíola Encinas Rosa^b, João Lauro Viana de Camargo^a, Francisco Paulo de Fonseca^d, Fernando Augusto Soares^e, José Carlos Souza Trindade Filho^f, Maria Aparecida Custódio Domingues^a, Silvia Regina Rogatto^{b*}

^a Department of Pathology, Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

^b NeoGene Laboratory, Department of Urology, Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, and AC Camargo Cancer Treatment and Research Center, Sao Paulo, Brazil

^c Department of Genetics, Biosciences Institute, Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

^d Department of Pelvic Surgery, AC Camargo Cancer Treatment and Research Center, Sao Paulo, Brazil,

^e Department of Pathology, AC Camargo Cancer Treatment and Research Center, Sao Paulo, Brazil

^f Department of Urology, Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

*Corresponding author: Silvia Regina Rogatto, PhD NeoGene Laboratory, Fundação Antonio Prudente, Hospital AC Camargo Rua Professor Antonio Prudente, 211, Liberdade, São Paulo, Brazil CEP: 01509-010 Phone: 55 11 21895163 Fax: 55 11 21895163 e-mail: rogatto@fmb.unesp.br and silvia.rogatto@hcancer.org.br

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Running title: *CDH1* methylation and E-cadherin expression in prostate cancer.Keywords: *CDH1*, methylation, prostate cancer, E-cadherin expression.*BMC Cancer (IF: 2.71)*

ABSTRACT

Background: DNA methylation is one of the epigenetic mechanisms that can underlie the disruption of cellular signaling pathways in prostate cancer (PCa). The *CDH1* gene, encodes the protein E-cadherin, involved in the cell adhesion and responsible for the preservation of normal tissue architecture. In human carcinomas, including prostate cancer, the hypermethylation and loss of expression of E-cadherin has been correlated with worse prognosis parameters. The aim of this study was to investigate if the *CDH1* methylation status could predict the presence of cancer in prostate biopsies by comparing PCa and non-neoplastic prostate (NNP) tissues from cancer-free patients. In addition, the associations of methylation pattern and protein expression and comparison with clinicopathological features were also evaluated.

Methods: DNA methylation pattern was assessed by Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MSP), and protein expression by immunohistochemistry (IHC) in a series of 39 PCa and 27 non-neoplastic prostate tissues (NNP) and in 147 samples (121 PCa and 26 adjacent non-neoplastic prostate tissues -AdjP) in a tissue microarray platform. The data were correlated with clinicopathological features.

Results: There was no significant differences between the *CDH1* promoter hypermethylation in PCa (56%) and age-matched NNP (56%) samples. Furthermore, none association was found between hypermethylation and protein expression in matched PCa and NNP samples. Absence of association between methylation status of the CpG dinucleotides interrogated by the MSP approach and protein expression was confirmed in further MSP analysis in distinct tumor cells isolated by laser microdissection capture (LMC) according to protein expression patterns. Heterogeneous protein expression patterns were detected in a subset of tumor samples (7 out of 33), in which weak and moderate expression was concomitantly detected in different tumoral areas. In six out of these seven cases it was detected high Gleason score and three of them presented worse outcome (biochemical recurrence). Protein analysis in a large number of patients (TMA) showed no association with any prognostic clinicopathological parameter.

Conclusion: The absence of association between the methylation and protein expression detected in this study suggests that the *CDH1* promoter hypermethylation is not an exclusive mechanism for E-cadherin silencing. Heterogeneous protein expression patterns were detected in a subset of samples probably due the epigenetic plasticity that occurs during the carcinogenesis process.

BACKGROUND

Prostate cancer (PCa) is one of the leading causes of morbidity and mortalilty from cancer among men in Western countries [1, 2]. The molecular mechanisms underlying its development and progression remain poorly understood. It has become evident that both genetic and epigenetic changes play a role in the development and progression of human prostate cancer [3, 4].

Epigenetic modifications, defined as heritable changes in gene expression that are not attributable to changes in the primary DNA sequence, conventionally includes DNA methylation, post-translational histone modifications (as acetylation, methylation, phosphorilation) as well post-transcriptional control by small RNAs [4]. The most studied epigenetic modification is the cytosine methylation of DNA within the CpG island. DNA hypermethylation has been consistently associated with many tumor types since dense methylation in CpG dinucleotídes located at promoter regions can lead to the silencing of critical genes involved in several cellular pathways, such as hormonal responses, tumor-cell invasion, cell cycle control and DNA damage repair [4].

In prostate cancer, inappropriate epigenetic silencing of specific genes can contribute to tumor initiation, progression, invasion, and metastasis [3, 4, 5, 6]. It has been shown that hypermethylated genes can be associated with higher pathological grade and clinical stage and androgen independence [4, 7].

E-cadherin, one of the major intercellular epithelial cell adhesion protein, mediates the epithelial cell-cell interactions through calcium-dependent hemophilic interaction of its extracellular domain [8]. Moreover, E-cadherin maintains the epithelial cellular adhesion and integrity [9]. There is cumulative evidence that E-cadherin down-regulation correlates with a strong invasive potential, resulting in poor prognosis in human carcinomas [10, 11, 12]. In addition, it has been suggested that *CDH1* (*cadherin 1, type 1, E-cadherin, epithelial*) is a tumor suppressor gene showing negative regulation during the course of cellular invasion [13].

Several mechanisms have been suggested for the repression of E-cadherin function during carcinogenesis that include promoter methylation, mutations, transcriptional repression by snail and slug, ubiquitination, and protein degradation [14, 15, 16, 17, 18]. Allelic loss has also been reported as a mechanism contributing to reduction or loss of E-cadherin expression in prostate carcinomas [19, 20]. However, the epigenetic silencing of *CHD1* gene has been
found to be the most common event related to E-cadherin down-regulation in epithelial carcinomas, including prostate cancer [21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28].

In prostate carcinomas, the hypermethylation frequencies of the *CDH1* gene have been reported as elevated [24, 25] as well as in low frequencies [26, 27]. DNA hypermethylation and E-cadherin protein down-expression has been associated with adverse clinicopathological features, such as tumor size, pathological stage, and PSA levels [25, 26, 27, 29, 30, 31].

Taken into account that hypermethylation is an important mechanism involved in gene silencing and the dynamic nature of these epigenetic alterations which promote tumoral heterogeneity, we first evaluated the methylation status and protein expression level of *CDH1* gene in prostate carcinomas and non-neoplastic prostate tissues. Further, protein analysis was conducted in prostate samples from a large and independent cohort of PCa patients and the findings were associated with clinicopathological parameters and with disease recurrence.

METHODS

Patients

The study included 160 prostate carcinomas and 53 non-neoplastic prostate samples obtained from patients followed prospectively at the Clinical Hospital, Medical School, Sao Paulo State University (2001 to 2007), Botucatu, Sao Paulo, and at the AC Camargo Cancer Hospital (1993 to 2002), Sao Paulo, Brazil. All patients were advised of the procedures and provided written informed consent. The Human Research Ethics Committee approved this study (CONEP # 304/2000).

Sixty-six men (Group I) were assembled consecutively because of abnormal PSA values and/or suspected PCa after digital rectal exams. Systematic ultrasound-guided needle biopsies obtaining 3-10 cores (median of 6 cores) were done by using an 18-gauge, spring-loaded biopsy device. After histopathological evaluation, the subjects were divided into two groups according to the presence of PCa (n=39) or absence of neoplasia (Non-Neoplastic Prostate, NNP, n=27) (Table 1). There were no evidences of prostate malignancies in NNP patients during the follow-up period (median=63 months, Table 1). Methylation analysis was conducted in all PCa and NNP samples. Matched formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) prostate tissues blocks from 28 PCa and 20 NNP cases were obtained for protein analysis.

An independent cohort of PCa patients was evaluated for protein expression (Group II). FFPE tissue blocks retrieved from the archives of the Department of Pathology of AC Camargo

Hospital (Sao Paulo, Brazil) from 121 PCa patients and 26 adjacent non-neoplastic tissues (AdjP) from PCa patients were arranged in a tissue microarray (TMA). Two normal (N) prostate tissues (histopathologically confirmed with absence of PCa, intra-epithelial neoplasia, benign prostate hyperplasia, or prostatitis) from necropsies were also obtained. The ages were 40 and 49 years old for N1 and N2 patients, respectively (Table 1).

All samples evaluated were from untreated patients. Radical retropubic prostatectomy (RRP) was the primary treatment in 154 patients. Six cases did not undergoing RRP due to advanced age or metastasis at diagnosis; the biopsy samples collected from these patients were evaluated by MSP (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction). Four out of six patients were treated with radiotherapy and/or hormone blocked. Twenty-one PCa patients received radiotherapy and/or hormone therapy before RRP. In these cases, biopsies samples evaluated were taken before neoadjuvant treatment. Tumor histological grading was performed according to Gleason scores [32] and stage according to TNM [33, 34]. Recurrence risk (low, moderate and high) was estimated for PCa patients according to NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology TM: Prostate Cancer.

DNA extraction

The genomic DNA from prostate tissues was obtained by standard sodium dodecyl sulfate/proteinase K digestion, followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. DNA samples were quantified using the NanoDrop® *ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1* (Labtrade, Wilmington, USA).

Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MSP) Analysis

Genomic DNA (2 μ g) were treated with sodium bisulfite using an established protocol. The methylation pattern within the CpG island of the *CDH1* gene (sequence -126 bp to +144 bp relative to transcription start, GenBank accession number D49685) was determined using a nested-PCR approach. Specific primers for methylated and unmethylated sequences of *CDH1* gene and PCR conditions were previously described [35].

To determine the specificity of the MSP primers for methylated and unmethylated amplicons, DNA from lymphocytes of healthy volunteers treated with *SssI* methyltransferase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was used as positive controls for methylated alleles. The reaction was performed in a total volume of 50µl containing 10µg of genomic DNA, 10U of *SssI* methylase, 160mM of S-adenosyl-metionina, 50mM of NaCl, 10mM of Tris-HCl, 10mM of MgCl₂, 1mM of DTT pH 7.9, during 18 hours at 37°C. Whole genome amplification of the same DNA samples obtained from lymphocytes was used as unmethylated allele control, as described by Umetani et al. (2005) [36]. Methylated and unmethylated controls were then subjected to bisulfite modification and MSP analysis.

Immunohistochemistry (IHC) analysis

Archival FFPE prostate tissues obtained from RRP (PCa and adjacent non-neoplastic samples) were retrieved from the AC Camargo Cancer Hospital. The PCa cohort and AdjP specimens were sampled using a 0.6-mm diameter tissue core distributed on tissue microarray slide. Adjacent hematoxylin and eosin (H&E) stained section was reviewed by two pathologists to determine the presence and extent of morphologically representative areas of the original tumors in each tissue core. Reassessment of Gleason grading in a contiguous H&E stained tissue microarray section assured the presence of prostate adenocarcinoma and the fidelity of the intended tissue microarray core. Core biopsies were extracted from the defined areas using a Tissue Microarrayer (Beecher Instruments®, Silver Springs, USA). Tissue cores from each specimen were punched and arrayed on a recipient paraffin block. Each core was spaced 0.2mm apart. After cutting sections from the recipient block and transferring these with adhesive tape to coated slides for subsequent UV crosslinkage (Instrumedics Inc®, Hackensack, NJ), the slides were dipped in a layer of paraffin to prevent oxidation and stored in a freezer at -20°C. For conventional slides, FFPE tissue blocks from 33 PCa, 20 NNP and two normal prostate samples were freshly cut (3µm) and the sections were mounted on slides with organosilane (3-aminopropyl triethoxy-silane) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA).

Conventional and TMA sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in graded ethanol solutions. Briefly, the sections were deparaffinized, rehydrated in graded ethanol solutions. Thereafter, sections were treated with endogenous peroxidase quenching (0.3% H2O2 for 15min) and blocked for avidin/biotin (DAKO Biotin Blocking System® Dako Corporation, Carpinteria, CA) and protein (DAKO Protein Block Serum-Free® Dako Corporation), 20min each prior to primary antibody incubation. Incubation with the primary antibody diluted in PBS (phosphate-buffered saline) was conducted overnight at 4oC for anti E-cadherin (Dako, Carpinteria, CA; dilution 1:400). The sections were washed and incubated with secondary antibody (Post Primary Block-Novocastra), for 30min followed by the polymer detection

system (NovoLink Polymer- Novocastra) for 30min at room temperature. Reactions were developed with a solution containing 0.6mg/ml of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma, St Louis, MO) and 0.01% H_2O_2 and then counter-stained with Mayer's hematoxylin, dehydrated and mounted with a glass coverslip. Positive (breast tissue) and negative controls were included in all reactions. Two normal prostate specimens were also included as controls. Tumors were classified in four-step scale (scores 0 to 3) based on intensity of staining and the membrane pattern, as follows: score 3: high intensity (4+) and continuous staining of membrane; score 2: high to moderate intensity (3+) and focal or discontinuous membrane staining; score 0: low intensity (1+) and focal or discontinuous membrane staining; score 0: low intensity (1+) and focal or discontinuous membrane staining. The analysis was done by one observer (MACD) and the samples were blindly scored with respect to outcome and clinical patient data.

MSP analysis on Laser Capture Microdissected (LCM) cells

Seven cases that presented heterogeneous E-cadherin staining patterns were chosen to LCM procedure according to the E-cadherin scores and further MSP analysis. In one case, the tissue block was exhausted. Two cases with different E-cadherin protein expression scores in tumor cells and adjacent non-neoplastic tissue was also included.

Specific tumor areas and adjacent non-tumoral tissue according to E-cadherin immunostaining were laser capture microdissected using the PixCell® II Laser Capture Microdissection (LCM) System (Arcturus Engineering, Mountain View, CA). In order to obtain a pure and homogeneous sample preparation of each area, serial sections with 5-10 µm were performed from archival paraffin embedded tissue and were mounted on microscope slides. According to E-cadherin status, regions were identified and marked under light microscopy. Using this section as a template, the remaining slides were laser-capture microdissected (LCM), as described above. Approximately 9,000 cells for each marked area were captured and further processed to DNA extraction and MSP analysis as described previously.

Data Analysis

Chi-square or Fisher exact test were applied to determine the strength of association between the categorical variables with 5% of significance. Clinical stage IV patients or patients with

distant metastasis at diagnosis were excluded from the analyses related with recurrence risk or biochemical-recurrence. For E-cadherin IHC analysis, the dichotomous variables were defined prior to any analysis based on the weak (scores 0 and 1) or moderate/high (scores 2-3) expression levels. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism3 (San Diego, CA, USA) and SPSS version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) for Windows.

RESULTS

This study was conducted in two parts. Firstly, to determine if the methylation of the promoter region of the *CDH1* gene could predict the presence of cancer at prostate biopsies. The presence of methylated alleles was compared between PCa and non-neoplastic prostate (NNP) tissues obtained from men paired by age (group I). The median age of the PCa and NNP patients was 67 and 66 years old, respectively (Table 1). No significant differences were observed for *CDH1* promoter methylation status in PCa and NNP samples. The *CDH1* promoter hypermethylation were detected in 22 out of 39 (56%) PCa samples and in 15 out of 27 (56%) NNP tissues (P=0.95). The normal prostate samples showed unmethylated *CDH1* status for N1 and methylated for N2 sample (data not shown).

The E-cadherin protein expression was assessed in 35 PCa and 20 NNP samples (Group I). Twenty eight out of 35 PCa cases showed homogeneous immunostaining patterns. The comparison between these tumor (n=28) and NNP samples (n=20) showed statistically higher levels of E-cadherin expression in PCa samples (P<0.001, Table 2, Group I). Exclusively in PCa samples was observed markedly increased E-cadherin immunostaing (score 3) and in high frequency (93%). Reduced (score 0-1) protein expression was detected in all NNP tissues and in 7% of PCa samples evaluated. The two normal prostate samples (N1 and N2) showed reduced E-cadherin expression (score 1, Figure 1). Adjacent non-neoplastic prostate tissues were also evaluated for protein expression in three cases (cases 1, 2 and 7), and in all of them it was observed score 0 for E-cadherin expression. No significant association was observed between protein expression and methylation status in PCa and NNP tissue samples (Figure 2).

Distinct protein expression scores were detected in two tumor areas in seven out of 35 tumor samples (Table 3, Figure 1E). These cells from different areas showing distinct immunostaining patterns were microdissected and evaluated by DNA methylation status. In two cases (cases 2 and 4), it was observed immunostaining scores 3 and 1 and methylation status was negative and positive, respectively. Case 5 showed score 3 and score 0 in different

areas, and negative *CDH1* methylation status. Table 3 shows the details of comparison between IHC and DNA methylation status.

Due to this intra-tumoral heterogeneity of E-cadherin staining and the discrepancies between protein expression and DNA methylation, a subgroup of tumors and adjacent non-neoplastic prostate tissues were laser-capture microdissected according to the E-cadherin expression scores. These cells were then analyzed for MSP in order to investigate if the absence of correlation was due to contamination of DNA sampled with stromal cells or due to hypermethylation mosaicism. The Figure 3 shows an illustrative case with tumoral areas presenting distinct protein expression levels and adjacent non-neoplastic tissue before and after the microdissection.

CDH1 gene methylation status evaluated in LCM samples was not associated with E-cadherin protein expression (Table 4). All cases microdissected that presented score 3 immunostaining areas showed methylated *CDH1* gene. However, two microdissected adjacent non-neoplastic tissues showed concordant results with protein expression score 0 and *CDH1* gene methylation. In addition, cases 2, 5 and 6 showed different methylation status in the prostate specimens sampled before and after the microdissection. In these cases, absence of methylation was primarily observed in the prostate tissue samples (before LCM); but, *CDH1* gene methylation was observed in all of LCM tissues from these cases (all of them presenting protein expression score 3). Interestingly, case 5 showed methylated alleles in two different tumor areas with different IHC scores (area 1: score 3 and area 2: score 0).

Among the PCa group, clinical and pathological characteristics, such as age, family history of cancer, PSA levels, Gleason score, pathological stage, lymph nodes metastasis, risk of recurrence, surgical margins, extra-prostatic extension, vesicular invasion, lymphovascular invasion, seminal vesicle invasion, and biochemical recurrence were compared with *CDH1* methylation status and E-cadherin protein expression (Group I). No statistically significant association was observed between *CDH1* hypermethylation and protein expression and all these parameters in Group I cases (data not shown). It was also observed that nine out of 39 PCa patients showed biochemical recurrence (BC) after radical prostatectomy, and in three of them (cases 1, 2 and 7), the tumors presented heterogeneous E-cadherin protein expression (Table 3). In addition, six out of seven cases (86%) with heterogeneous pattern showed high Gleason scores [\geq 7 (4+3)] compared with nine out of 28 (32%) tumors with homogeneous pattern samples (*P*= 0.0274, Fisher exact test, data not shown). Possibly due to small number of cases, it was not possible to detect significant association between protein expression

patterns and other clinical and pathological parameters (data not shown). With the aim to test this hypothesis, E-cadherin protein expression was evaluated in an independent group of patients (Group II) in TMA slide composed by 121 PCa and 26 adjacent non-neoplastic prostate tissues. None significant difference in protein expression was observed between PCa and AdjP tissues (Table 2, Group II). However, it was detected differences in protein expression patterns in Group II and Group I cases. First, PCa samples with lower E-cadherin expression (score 0-1) were more frequently detected in Group II than in PCa samples from Group I (31% and 7%, respectively). Also, the E-cadherin protein expression in AdjP tissues was similar to PCa samples (group II), but was different from the NNP tissues evaluated in Group I. In 54% of AdjP tissues were observed high protein levels (score 2-3), but none NNP sample showed this protein expression pattern. Importantly, normal prostate tissue samples were included as controls in both group of samples (I and II), and it was observed similar protein expression patterns. The normal prostate tissues showed weak expression of Ecadherin (score 1, Figure 1A). The E-cadherin protein expression patterns in PCa samples from group II showed no association with clinical and histopathological parameters evaluated (Table 5).

DISCUSSION

E-cadherin, the protein codified by *CDH1* gene, is involved in cadherin-catenin cell adhesion system, responsible for maintaining the normal architecture of tissues [37]. Some mechanisms have been implicated in E-cadherin inactivation in cancer cells, including the transcriptional silencing by CpG-island-promoter hypermethylation. Decreased E-cadherin expression is involved in loss of cellular adhesion leading to tumor invasion and mestastasis [38].

In the present study, based on a nested MSP approach, equal frequencies of *CDH1* gene hypermethylation were detected in PCa and NNP samples (56%). Normal prostate samples obtained from 40- and 49-year-old men after necropsy, presented an unmethylated and methylated *CDH1* pattern, respectively. Varying frequencies of *CDH1* gene promoter methylation have been detected in prostate tumors [reviewed in 39]. In agreement with the findings described in this study, lack of association of *CDH1* hypermethylation between prostate cancer and non-neoplastic tissues have been published [30, 40, 41, 42, 43]. These findings indicate that *CDH1*methylation is not a specific event in prostate tumor phenotype [43]. Hypermethylation in normal tissue as detected in the present study are in agreement with results previously reported by Bornman et al. (2001) [44]. The authors detected a similar

pattern for *CDH1* hypermethylation in normal bladder tissue from patients older than 70 years.

Conversely, other studies showed that *CDH1* hypermethylation was correlated with prostate carcinomas compared with non-malignant prostate samples [24, 26, 45]. Conflicting data regarding the *CDH1* methylation patterns in prostate tumors can be explained in part by the different CpG sequences evaluated, with preferential methylation at some CpG sites and not at others, and also due to different methodologies applied, considering the choice of primers and PCR conditions [45, reviewed in 46]. The nested MSP used in the present study is a high-sensitivity method that is able to detect methylated DNA molecules in less than 5% of total DNA [47] or one methylated allele in the presence of 1000-2000 unmethylated alleles [48]. Theoretically, tiny amounts of DNA from epigenetically altered cells can be detected in a background of hundreds of normal cells. The fact that epigenetic changes are found so early in tumorigenesis, and even in normal tissues before tumors arise, indicates that these changes could be used to monitoring the risk to cancer development. It has been proposed an epigenetic progenitor model for cancer origin, in part based on the fact that global epigenetic changes must precede the earliest genetic alterations since they are always found, even in benign neoplasm.

Some groups have reported the association of higher *CDH1* methylation frequencies in prostate tumors with more aggressive characteristics, such as tumor grade [25, 27], and high levels of PSA [26, 30]. In the present study, no association was found between *CDH1* methylation status and clinicopathological parameters. Accordingly, other studies found absence of correlation between *CDH1* hypermethylation and age, tumor grade, stage or Gleason score [24, 43, 45].

Interestingly, when E-cadherin protein expression was assessed, a significant difference was detected between tumor and non-neoplastic tissues from cancer-free patients; with higher expression detected in PCa (*P*<0.0001). However, in TMA analysis none difference was detected between tumor tissues and adjacent non-neoplastic prostate tissues from PCa patients. Moreover, E-cadherin protein expression patterns were different between AdjP and NNP tissues. These data suggest that E-cadherin protein expression can be altered in pre-malignant tissues, supporting the hypothesis that morphologically normal cells in the context of tumoral tissue may present altered gene regulation. Heterogeneous E-cadherin expression pattern have been previously reported [24, 29, 50]. In agreement with our data, Rubin et al. (2001) [29] analyzed benign prostate tumors and clinically localized metastatic hormone

refractory PCa by immunohistochemistry in a TMA platform. The authors found a high (82%) frequency of E-cadherin intensity staining, (defined as 70% or greater membranous staining) in prostate carcinoma. However, several studies have associated negative E-cadherin immunostaining with prostate tumors, and have reported reduced E-cadherin expression in high grade, Gleason score, pathological stage, and overall survival [24, 25, 50, 51, 52, 53]. In the current study, no statistically significant correlation was observed between protein expression and clinicopathological data. According to Rubin et al (2001) [29], heterogeneous staining probably represents a common artifact seen in immunostaining of standard slides. The authors observed aberrant E-cadherin protein expression in the range of 10% to 20% for both clinically localized and advanced prostate cancer, and concluded that differences in E-cadherin protein expression in prostate cancer may be attributable to tissues used for evaluation (frozen versus formalin fixed), types of cases used, and patient treatment.

In this study, heterogeneous staining patterns of E-cadherin were observed in 20% of the PCa samples from Group I. Umbas et al. (1992) [54] evaluated prostate tumors by IHC and detected three staining patterns: uniformly positive; uniformly negative; and heterogeneous staining composed by a mixed population of E-cadherin positive and negative cells. The authors noted that for the most differentiated cancers (Gleason scores 4-5), E-cadherin was strongly and uniformly positive. However, in less well differentiated to poorly differentiated tumors (Gleason scores 6-10), they observed a trend of increasing percentage of tumors with heterogeneous or absent staining for E-cadherin. The authors concluded that these data indicate that a mixed or heterogeneously composed tumor may have increased invasive potential. Similar results were found in the current study. Heterogeneous pattern was associated with poorly differentiated tumors (Gleason scores 8 and 9) in comparison with homogeneous pattern samples found in poorly differentiated tumors (P=0.0041, Chi Square test, data not shown). Nevertheless, in TMA analysis, none association was detected between Gleason score and E-cadherin protein expression. A plausible explanation for these data is that the heterogeneity of E-cadherin expression cannot be assessed in small cores of tumor tissues. Although the valuable contribution of TMA in large-scale protein expression analysis, for certain proteins that exhibit heterogeneous expression patterns different approaches should be employed.

CDH1 gene hypermethylation and protein expression were not correlated in tumor samples and in NNP tissues. Hypotheses to explain discordant results between both methodologies include the effect of normal cells that may have influenced the amplification and the

intratumoral heterogeneity or variation in tumor content when it was fixed and processed for histological examination. In addition, the sensitivity of MSP technique to detect gene silencing is higher when compared to the ability of immunohistochemistry to show significant loss of protein expression. This could explain the presence of *CDH1* hypermethylation in tumor with strongly positive expression of E-cadherin. Even in the subgroup of carcinomas and adjacent non-neoplastic prostate tissues that were laser microdissected and analyzed once more by MSP, the results were still discrepant. Conflicting results regarding correlation of CDH1 hypermethylation and decreased E-cadherin protein expression have been published. Li et al. (2001) [25] showed higher frequency of CDH1 methylation associated with absence or reduced E-cadherin immunostaining. Kallakury et al. (2001) [24] showed loss of Ecadherin immunostaining in five out eight cases (68%) with CDH1 methylation; however it was not statistically significant. Graziano et al. (2004) [55] compared methylation and protein expression of *CDH1* gene and observed genotype–phenotype discordance in 8.5% of cases. They explained their results based on the fact that hypermethylation can occur in a CDH1 allele carrying an inactivating somatic mutation, while the function of the remaining CDH1 allele is preserved; in this case, E-cadherin protein expression is maintained despite a positive methylation analysis. On the other hand, if somatic mutations inactivate both CDH1 alleles, and/or alternative molecular mechanisms knock out CDH1, loss of E-cadherin expression can be found even in unmethylated tumors. Several studies have shown that the expression of Ecadherin can be controlled by mechanisms other than methylation, such as loss of alleles, gene mutation, and changes in the structure of chromatin and alterations of specific transcription pathways regulating the expression of this gene [56, 57].

Aberrant DNA methylation has been considered a frequent and early event in prostate carcinogenesis. The dynamic nature of epigenetic regulation, leading to intra-tumoral heterogeneity of gene-specific DNA methylation patterns, varying from allele to allele and shifting in relation to the tumoral microenvironment, could explain the lack of concordance between *CDH1* methylation status and immunohistochemical scores of E-cadherin expression. Furthermore, a subset of samples with a heterogeneous protein expression pattern also demonstrated higher Gleason scores, giving an additional evidence of a more aggressive behavior. In summary, the DNA methylation analysis of different tumoral areas coupled with protein expression suggests that methylation associated with loss of E-cadherin expression in human prostate cancer is heterogeneous, and probably unstable, but reflects the dynamic phenotypic changes that drives the carcinogenesis process.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

SRR, SAD, and CAR conceived of the study, participated in its design, performed the statistical analysis, and helped to draft the manuscript. FCMCA carried out the molecular genetic studies, and drafted the manuscript.FPF and JCSTF participated in defining the casuistic used and helped to draft the manuscript. JLVC, FAS, and MACD carried out the immunohistochemistry analysis. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil. The authors would like to thank Greicy Helen Ribeiro Gambarani and Shadia Muhammad Ihlaseh for their expert technical assistance.

REFERENCES

- 1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ: Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 2007, 57(1):43-66.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Incidência de Câncer no Brasil 2007 [http://www.inca.gov.br]. Rio de Janeiro: INCA.
- 3. Dobosy JR, Roberts JL, Fu VX, Jarrard DF: The expanding role of epigenetics in the development, diagnosis and treatment of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. J Urol 2007, 177(3):822-831.
- 4. Cooper CS, Foster CS: Concepts of epigenetics in prostate cancer development. Br J Cancer 2009, 100(2):240-245.
- 5. Manoharan M, Ramachandran K, Soloway MS, Singal R: Epigenetic targets in the diagnosis and treatment of prostate cancer. *Int Braz J Urol* 2007, **33**(1):11-18.
- 6. Reynolds MA: Molecular alterations in prostate cancer. *Cancer Lett* 2008, **271**(1):13-24.
- Perry AS, Foley R, Woodson K, Lawler M: The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006, 13(2):357-377.
- 8. Takeichi M: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991, **251**(5000):1451-1455.
- Damsky CH, Richa J, Solter D, Knudsen K, Buck CA: Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* 1983, 34(2):455-466.
- 10. Frixen UH, Nagamine Y: Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion. *Cancer Res* 1993, **53**(15):3618-3623.
- Pierceall WE, Woodard AS, Morrow JS, Rimm D, Fearon ER: Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines. Oncogene 1995, 11(7):1319-1326.
- 12. Day ML, Zhao X, Vallorosi CJ, Putzi M, Powell CT, Lin C, Day KC: E-cadherin mediates aggregation-dependent survival of prostate and mammary epithelial cells through the retinoblastoma cell cycle control pathway. J Biol Chem 1999, 274(14):9656-9664.
- 13. Hirohashi S, Kanai Y: Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003, **94**(7):575-581.
- 14. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A: The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000, **2**(2):84-89.
- 15. Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, Sommer T, Birchmeier W: Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 2002, 4(3):222-231.
- 16. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER: The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002, **62**(6):1613-1618.
- 17. Saito T, Oda Y, Kawaguchi K, Sugimachi K, Yamamoto H, Tateishi N, Tanaka K, Matsuda S, Iwamoto Y, Ladanyi M *et al*: E-cadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanisms of E-cadherin inactivation in synovial sarcoma. *Oncogene* 2004, 23(53):8629-8638.

- 18. Takeno S, Noguchi T, Fumoto S, Kimura Y, Shibata T, Kawahara K: E-cadherin expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation, Snail overexpression, and clinicopathologic implications. Am J Clin Pathol 2004, 122(1):78-84.
- 19. Carter BS, Ewing CM, Ward WS, Treiger BF, Aalders TW, Schalken JA, Epstein JI, Isaacs WB: Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(22):8751-8755.
- 20. Bussemakers MJ, Giroldi LA, van Bokhoven A, Schalken JA: Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cancer cell lines: characterization of the human E-cadherin gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 203(2):1284-1290.
- 21. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB: E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 1995, 55(22):5195-5199.
- 22. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG: Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. J Biol Chem 2000, 275(4):2727-2732.
- 23. Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S: Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(16):7416-7419.
- 24. Kallakury BV, Sheehan CE, Winn-Deen E, Oliver J, Fisher HA, Kaufman RP, Jr., Ross JS: Decreased expression of catenins (alpha and beta), p120 CTN, and E-cadherin cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas. *Cancer* 2001, 92(11):2786-2795.
- 25. Li LC, Zhao H, Nakajima K, Oh BR, Ribeiro Filho LA, Carroll P, Dahiya R: Methylation of the E-cadherin gene promoter correlates with progression of prostate cancer. *J Urol* 2001, 166(2):705-709.
- 26. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS: Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 2004, **202**(2):233-240.
- 27. Woodson K, Gillespie J, Hanson J, Emmert-Buck M, Phillips JM, Linehan WM, Tangrea JA: Heterogeneous gene methylation patterns among pre-invasive and cancerous lesions of the prostate: a histopathologic study of whole mount prostate specimens. *Prostate* 2004, **60**(1):25-31.
- 28. Saha B, Arase A, Imam SS, Tsao-Wei D, Naritoku WY, Groshen S, Jones LW, Imam SA: Overexpression of E-cadherin and beta-catenin proteins in metastatic prostate cancer cells in bone. *Prostate* 2008, **68**(1):78-84.
- 29. Rubin MA, Mucci NR, Figurski J, Fecko A, Pienta KJ, Day ML: E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. *Hum Pathol* 2001, **32**(7):690-697.
- 30. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Minna JD, McConnell J, Frenkel EP, Gazdar AF: Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2002, **8**(2):514-519.
- Musial J, Sporny S, Nowicki A: Prognostic significance of E-cadherin and ezrin immunohistochemical expression in prostate cancer. Pol J Pathol 2007, 58(4):235-243.

- 32. Gleason DF: Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 1992, 23(3):273-279.
- 33. Billis A. Carcinoma: graduação histológica e estadiamento. In: Billis. A., editor. Patologia Cirúrgica da Próstata. São Paulo, Campinas; 2003:123-40.
- 34. Epstein JI, Algaba F, Allsbrook Jr WC, Bastacky S, Boccon-Gibod L, De Marzo AM, Egevad, L., Furusto, M., Hamper, U.M., Helpap, B., Humphrey, P.A., Iczkowski, K.A., Lopez-Beltran, A., Montironi, R., Rubin, M.A., Sakr, W.A., Samaratunga, H. & Parkin, D.M. Tumours of the prostate: Acinar adenocarcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. World health organization classification of tumours Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC; 2004:159-92.
- 35. Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA, Rogatto SR: CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC Cancer* 2006, **6**:48.
- 36. Umetani N, de Maat MF, Mori T, Takeuchi H, Hoon DS: Synthesis of universal unmethylated control DNA by nested whole genome amplification with phi29 DNA polymerase. Biochem Biophys Res Commun 2005, 329(1):219-223.
- 37. Kemler R: From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 1993, **9**(9):317-321.
- 38. Li LC, Okino ST, Dahiya R: DNA methylation in prostate cancer. *Biochim Biophys* Acta 2004, **1704**(2):87-102.
- 39. Schulz WA, Hatina J: Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *J Cell Mol Med* 2006, **10**(1):100-125.
- 40. Florl AR, Steinhoff C, Muller M, Seifert HH, Hader C, Engers R, Ackermann R, Schulz WA: Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. Br J Cancer 2004, 91(5):985-994.
- 41. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs WB, Nelson WG: Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. Cancer Res 2004, 64(6):1975-1986.
- 42. Bastian PJ, Ellinger J, Heukamp LC, Kahl P, Muller SC, von Rucker A: **Prognostic value** of CpG island hypermethylation at PTGS2, RAR-beta, EDNRB, and other gene loci in patients undergoing radical prostatectomy. *Eur Urol* 2007, **51**(3):665-674; discussion 674.
- 43. Cho NY, Kim BH, Choi M, Yoo EJ, Moon KC, Cho YM, Kim D, Kang GH: Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. J Pathol 2007, 211(3):269-277.
- 44. Bornman DM, Mathew S, Alsruhe J, Herman JG, Gabrielson E: Methylation of the Ecadherin gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals. *Am J Pathol* 2001, **159**(3):831-835.
- 45. Singal R, Ferdinand L, Reis IM, Schlesselman JJ: Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease. Oncol Rep 2004, 12(3):631-637.
- 46. Li LC, Carroll PR, Dahiya R: Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. J Natl Cancer Inst 2005, 97(2):103-115.
- 47. Corn PG, Smith BD, Ruckdeschel ES, Douglas D, Baylin SB, Herman JG: E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia. *Clin Cancer Res* 2000, 6(11):4243-4248.

- 48. Toyooka KO, Toyooka S, Maitra A, Feng Q, Kiviat NC, Smith A, Minna JD, Ashfaq R, Gazdar AF: Establishment and validation of real-time polymerase chain reaction method for CDH1 promoter methylation. *Am J Pathol* 2002, **161**(2):629-634.
- 49. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S: The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006, 7(1):21-33.
- 50. Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC: Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. Urol Oncol 2005, 23(6):402-406.
- 51. Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, Schaafsma HE, Karthaus HF, Oosterhof GO, Debruyne FM, Schalken JA: Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1994, 54(14):3929-3933.
- 52. Pan Y, Matsuyama H, Wang N, Yoshihiro S, Haggarth L, Li C, Tribukait B, Ekman P, Bergerheim US: Chromosome 16q24 deletion and decreased E-cadherin expression: possible association with metastatic potential in prostate cancer. *Prostate* 1998, 36(1):31-38.
- 53. De Marzo AM, Knudsen B, Chan-Tack K, Epstein JI: E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. *Urology* 1999, **53**(4):707-713.
- 54. Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE, Debruyne FM, Isaacs WB: **Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer**. *Cancer Res* 1992, **52**(18):5104-5109.
- 55. Graziano F, Arduini F, Ruzzo A, Mandolesi A, Bearzi I, Silva R, Muretto P, Testa E, Mari D, Magnani M *et al*: Combined analysis of E-cadherin gene (CDH1) promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in patients with gastric cancer: implications for treatment with demethylating drugs. *Ann Oncol* 2004, 15(3):489-492.
- 56. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A: The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000, **2**(2):84-89.
- 57. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A 1996, 93(18):9821-9826.

Table 1. Clinicopathological features of the prostate carcinoma (PCa) and non-neoplastic prostate (NNP) patients from Group I evaluated by DNA methylation and protein expression (IHC) analyses; and PCa and adjacent non-neoplastic prostate tissues (AdjP) from Group II evaluated by protein expression.

Clinical variable	Gro DNA methyla anal	oup I ation and IHC lysis*	Group II IHC analysis			
	PCa	NNP	PCa	AdjP		
	n=39	n=27	n=121	n =26		
Age (years)						
Median (range)	67 (52 - 84)	66 (47-85)	63 (41 -75)	63 (50 - 72)		
Follow-up (months)						
Median (range)	57 (4 - 81)	63 (11 – 95)	87 (21- 159.5)	121 (13.8 – 161.7)		
PSA (ng/mL)**						
Median (range)	7.29 (0.2 – 987.2)	5.30 (0.58- 18.59)	9.2 (1.20 - 310.0)	10.6 (4.4 – 36.4)		
Gleason score						
2 - 4	3	-	7	-		
5 -7	26	-	106	-		
8 - 10	10	-	8	-		
Pathological staging						
Ι	-	-	-	-		
II	20	-	55	-		
III	10	-	60	-		
IV	2	-	6	-		
Unknown	7	-	-	-		
Lymph node						
metastasis						
Present	2	-	3	-		
Absent	30	-	118	-		
Unknown	7	-	-	-		
Metastasis in						
diagnosis	_		^			
Present	1	-	0	-		
Absent	38	-	121	-		

* DNA methylation and protein expression analysis in matched samples were done in 33 PCa and 20 NNP patients. ** The PSA values refer to the last preoperative test from PCa patients and the last PSA test for NNP group.

Group Analysis	Ν	E-cad IHC sco	P *	
		0 - 1	2-3	
Group I				
PCa	28	2 (7)	26 (93)	<0.0001
NNP	20	20 (100)	0	
Group II				
PCa	121	37 (31)	84 (69)	0.168
AdjP	26	12 (46)	14 (54)	

Table 2. E-cadherin protein expression detected by immunohistochemistry (IHC) in patients

 and controls from Group I and Group II.

Group I - prostate carcinoma (PCa) and non-neoplastic prostate (NNP) samples. Group II – Pca and adjacent non-neoplastic prostate (AdjP) samples in TMA * Fisher exact test Table 3. Prostate carcinomas (Group I) with heterogeneous E-cadherin protein expression detected by immunohistochemistry (IHC): CDHI gene methylation status; IHC scores in distinct tumor areas and adjacent non-neoplastic tissues (AdjP); and comparison with clinicopathological parameters.

	BCR free-survival	(months)	13	27	ı	58	70	52	19
ical Data	BCR		Yes	Yes	ı	No	No	No	Yes
opatholog	Stage		II	III	IV	Π	III	Π	Π
Clinice	Gleason	score	7 (3+4)	8 (4+4)	9 (4+5)	8 (4+4)	7 (4+3)	8 (4+4)	9 (4+5)
	PSA	(ng/mL)	10.5	12.1	39.3	12.5	7.3	6.8	15.0
HC score	AdiP tissue		0	0	NA	NA	NA	NA	0
Cadherin II	r tissue	area 2	2	1	1	1	0	2	2
E.	Tumo	area 1	3	3	2	3	3	3	3
СDНI	methylation status	2	+	I	ı	+	ı	I	+
Cases		1	2	С	4	5	9	7	

(+): methylated; (-): unmethylated; NA: not available in the tumor tissue block; BCR: biochemical recurrence.

	CDH1 methylation	Tum	or area 1	Tume	or area 2	Adjacent n ti	ion-neoplastic ssue
ases	status in tunnor ussues before LCM	IHC score	<i>CDH1</i> status in LCM tissue	IHC score	<i>CDH1</i> status in LCM tissue	IHC score	<i>CDH1</i> status LCM tissue
2	I	3	+	1	ND	0	+
4	+	3	+	1	ND	NA	NA
5		3	+	0	+	NA	NA
9	,	3	+	7	ND	NA	NA
7	+	б	+	2	ND	0	+

Table 4. CDH1 methylation status in evaluated in cells obtained by laser-capture microdissection (LCM) according to their respective Ecadherin expression in prostate carcinomas (PCa) and adjacent non-neoplastic tissues (Group I).

tumor tissue block.

CDH1 methylation results obtained from tumor tissues before and after laser-capture microdissection (LCM) in distinct tumor areas (1 and 2) according to their IHC scores. CDHI methylation results from microdissected adjacent non-neoplastic tissues and the respective IHC score are also showed.

Discordant methylation results between tumor samples before and after laser microdissection (LCM) are highlighted in grey.

	E-ca		
Variables	IHC so	cores (%)	P
	0-1	2-3	
PSA (ng/mL)*			0.45
≤ 4.0	4 (3)	5 (4)	
> 4.0	33 (27)	77 (64)	
ND	-	2 (2)	
Gleason score			0.63
< 7 (3+4)	23 (19)	56 (46)	
≥7 (4+3)	14 (12)	28 (23)	
Pathological staging			0.18
II	15 (12)	40 (33)	
III	21 (17)	39 (33)	
IV	1 (1)	5 (4)	
Lymph node metastasis			1.00
Negative	36 (29)	80 (66)	
Positive	1 (1)	2 (2)	
ND	-	2 (2)	
Recurrence risk			0.47
High	22 (18)	44 (36)	
Low/moderate	15 (13)	40 (33)	
ND			
Margins			0.83
Negative	25 (20)	59 (49)	
Positive	12 (10)	25 (21)	
ND		~ /	
Capsular invasion			0.16
Negative	20 (17)	33 (27)	
Positive	17 (14)	51 (42)	
Angiolymphatic invasion			0.86
Negative	30 (25)	67 (55)	
Positive	7 (6)	17 (14)	
Seminal Vesicle invasion			0.17

Table 5. E-cadherin protein expression pattern and the clinicopathological characteristics in prostate carcinoma (PCa) patients (n=121) from Group II.

0.17

32 (27)	79 (65)	
5 (4)	5 (4)	
		0.67
17 (15)	34 (29)	
19 (17)	45 (39)	
	32 (27) 5 (4) 17 (15) 19 (17)	32 (27) 79 (65) 5 (4) 5 (4) 17 (15) 34 (29) 19 (17) 45 (39)

* The PSA values refer to the last preoperative results.

Legends

Figure 1. E-cadherin immunostaining detected in prostate tissues. (**A**) Normal prostate sample with score 1 detected in epithelial cells; (**B**) adjacent non-neoplastic prostate (Adj) tissue with score 1; (**C**) prostate carcinoma (PCa) presenting score 2; (**D**) PCa sample with score 3; and (**E**) tumor tissue with heterogeneous protein expression pattern. Detailed distinct tumor areas, with score 3 (up picture) and score 2 (box followed by bigger arrow).

Figure 2. Distribution of *CDH1* gene methylation according to E-cadherin protein expression in (**A**) prostate carcinoma and (**B**) non-neoplasic prostate tissues (Group I).

Figure 3. Laser-capture microdissection (LCM) was performed in prostate samples according to the E-cadherin protein expression detected by immunohistochemistry (IHC). Illustrative case (case 2) presenting adjacent non-neoplastic tissue with IHC score 0 (**A**) and tumor areas with (**B**) weak reactivity (score 1) and (**C**) strong staining (score 3). A1 - B1 - C1: photomicrography of histological sections before microdissection; A2 - B2 - C2: after microdissection; A3 - B3 - C3: microdissected cells in the CaPSure that were further analyzed for *CDH1* methylation by MS- PCR





മ





CONCLUSÕES FINAIS

Conclusões

• A hipermetilação dos genes *RARB* e *RASSF1A*, mas não de *SFN* e *CDH1*, se mostrou significativamente associada aos carcinomas de próstata (CaP) comparados aos tecidos prostáticos não neoplásicos (PNN), sugerindo que estes genes podem ser considerados como potenciais marcadores no câncer de próstata.

• Os resultados de amostras pareadas para análise de metilação dos genes *RARB* e *RASSF1A* e de seus transcritos demonstrou que a hipermetilação de *RARB*, mas não de *RASSF1A*, está associada ao silenciamento gênico, com conseqüente diminuição de expressão dos seus transcritos. Estes resultados foram validados pela análise protéica num grupo independente de amostras que confirmou a diminuição de RARβ nuclear nos tumores em relação aos controles. A marcação citplasmática num subgrupo de pacientes, considerada como um marcador prognóstico nos tumores prostáticos, foi associada com maior risco de recorrência da doença. É possível que esta marcação citoplasmática se refira a isoforma RARβ4, que ao contrário de RARβ2 (um supressor tumoral), parece agir como um oncogene.

• A análise pareada entre casos avaliados por metilação do gene *CDH1* e expressão protéica nas amostras de CAP e PNN não mostrou qualquer associação, mesmo após análise de alelos metilados em células isoladas por microdissecção a laser. Estes dados sugerem que a metilação do gene *CDH1* não é o único ou mais importante mecanismo de silenciamento do gene.





Artigo I. Campus- Botucatu/ Faculdade de Medicina

Departamento de Urologia Rubião Júnior, s/n - CEP 18618-000 - FONE (014) 3811-6436

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O NeoGene Laboratório - Departamento de Urologia/UNESP- Botucatu-SP e o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu-SP (pesquisadores e médicos) desenvolvem pesquisas para obter um maior conhecimento dos tumores de próstata. Pedimos autorização do paciente na participação do projeto "Alterações Epigenéticas em Adenocarcinomas de Próstata". Por meio desta pesquisa é possível conhecer melhor a doença e, desta forma, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento.

Estas pesquisas exigem materiais a fresco, proveniente das lesões estudadas obtidas no momento da cirurgia, para que seja possível a análise destas células em laboratório, assim como uma amostra de 5mL de sangue.

Após a obtenção do material, por meio de cirurgia, o material será processado, sendo que um dos fragmentos será utilizado para diagnóstico histopatológico e outro para a pesquisa, que poderá ser armazenado em freezer -70° C para continuidade de projeto proposto.

A obtenção deste fragmento não implicará em riscos adicionais à sua saúde ou na extensão do procedimento cirúrgico. O fragmento de tecido será utilizado no laboratório por códigos de números, preservando assim a identidade dos pacientes. A inclusão dos resultados em publicação científica será feita de forma a preservar o anonimato do paciente.

O projeto de pesquisa proposto será previamente apresentado para avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu-SP.

Concordando com o uso deste fragmento do modo descrito acima, é necessário esclarecer que o paciente não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros, entretanto, você terá sigilo, garantia e direito de acesso sobre os eventuais resultados desta pesquisa. Esclarecemos que não havendo concordância para a coleta, esta decisão não influenciará, de modo algum, no tratamento. Caso seja necessária a utilização do material do paciente em pesquisas futuras, pediremos novamente o termo de consentimento.

No caso de autorização, o documento será feito em duas vias, uma para o paciente e outra para o pesquisador.

Nome do pacie	ente ou representante l	egal		Assinatura	
Número de Registro (Médico responsável:_	RG) no Hospital:				
	Botucatu,	de		_ de 200	
Pesquisador responsável	: Silvia Regina Rogatt Fone: (14) 38116436 (14) 38157854 rogatto@fmb.unesp.b	oPós graduand 6 4 9r	la: Flávia Cileno Fone: (14) 38	e Alves 116436 (14) 38 fcalves@fmb.unes	3145030 sp.br

Universidade Entadud Paulista unes Faculdade de Medicina de Botucatu

fectalmaters

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP. 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 08 de novembro de 2.004

OF 546 2004-CEP MACAH ase

Hustrissima Senhora Prof." Dr" Silvia Regina Rogatto Departamento de Urologia Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Dr# Silvia,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Protocolo de Pesquisa initialado "Assinatura genética de carcinomas de próstata e suas metástoses", de antoria de Rodrigo Mattos dos Santos, orientado por Vossa Senhoria, receben do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 08 de novembro de 2.004.

O CEP esclarece que mesmo se tratando de Genética Humana, o projeto não tem necessidade de envio a CONEP, pois cumpre as normas da Resolução 340 de 08-07/2004.

OBS: Situação do Projeto: APROVADO

Atenciosamente,

Alberto Santos Copelhuppi Secretário do CEP



PARECER CONSUBSTÂNCIADO

Assunto: "Assinatura genética de carcinoma de próstata e suas metástases"- Autor: Rodrigo Mattos dos Santos - aprovado pelo CEP em 08/11/2004, sem necessidade de envio à CONEP pois cumpre a Resolução 340/2004.

Sub projeto "Alterações epigenéticas em adenocarcinomas de próstata" – Autora: Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves – (Tese de Doutorado).

Orientador: Prof^a Dr^a Silvia Regina Rogatto

Outros Participantes da Equipe: Profs. Drs. José Carlos Souza Trindade – João Lauroi Vianna de Camargo – Claúdia Aparecida Rainho - José Carlos Souza Trindade Filho – Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira e Maria Aparecida Custódio Domingues.

Departamento: Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Parecer do Relator CEP: A pesquisadora respondeu os quesitos levantados no Parecer Inicial informando também da impossibilidade de obter novos TCLEs. Sugerimos aprovação.

Parecer do Coordenador do CEP: A solicitação foi analisada e aprovada em reunião do CEP de 01/1/2007. O Projeto: Assinatura genética de carcinoma de próstata e suas metástase possui subprojeto: "Alterações epigenéticas em adenocarcinomas de próstata" que será conduzido por Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves, sobre orientação da Prof^a Dr^a Silvia Regina Rogatto,

Comitê de Ética em Pesquisa, aos 01 de outubro de 2.007

Haria f Chruda Henry Prof[®] Dr[®] Maria Aparecida Coelho de Arruda Henry Coordenadora do CEP