

## PERFIL TRANSCRIPTÓMICO E GENÉTICO DO CANCRO DA PRÓSTATA:

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* E *ERG* E DO POLIMORFISMO *NBN-8360G>C* NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA

Joana Raquel Faria da Silva



Dissertação de Mestrado em Oncologia

2010

*If we knew what it was we were doing,  
it would not be called research, would it?*

Albert Einstein

**Joana Raquel Faria da Silva**

**PERFIL TRANSCRIPTÓMICO E GENÉTICO DO CANCRO DA PRÓSTATA:**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* E *ERG* E DO POLIMORFISMO *NBN-8360G>C* NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador - Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva.

Categoria - Professor Associado Convidado com Agregação.

Afiliação - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

**Fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos  
em publicação:**

- Silva J, Fontenete S, Ribeiro R, Pina F e Medeiros R, **The Challenge of Using Urine Samples in Prostate Cancer Diagnosis: Pros and Cons**, submetido a: Revista URO, Grupo Português Génito-Urinário
  
- Silva J, Fontenete S, Ribeiro R, Pina F e Medeiros R, **Controversies in Using Urine Samples for Prostate Cancer Detection: PSA and PCA3 Expression Analysis**, submetido a: Revista URO, Grupo Português Génito-Urinário
  
- Fontenete S, Silva J, Ribeiro R, Pina F e Medeiros R, **Biomarkers Promises for Prostate Cancer Diagnosis: The Gene PCA3**, submetido a: Revista URO, Grupo Português Génito-Urinário

**Comunicação em poster:**

- Fontenete S, Silva J, Ribeiro R, Pina F e Medeiros R, **Is it possible to perform na analysis of gene expression in urine samples for prostate cancer patients without performing a prostate massage?**  
14<sup>a</sup> Reunião da Sociedade Portuguesa de Genética Humana, 18-19 de Novembro, 2010

Este trabalho foi realizado com o apoio da Fundação Calouste Gulbenkian (Oncologia/2008/Projecto nº 96736) e da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT/PTDC/SAU-FCF/71552/2006).

## Agradecimentos

À comissão coordenadora do Mestrado em Oncologia, sob a pessoa do Professor Doutor Carlos Lopes, pela oportunidade de frequentar o mesmo, permitindo-me realizar o trabalho numa área que tanto aprecio.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, orientador deste trabalho, pela confiança, incentivo e enorme paciência. Como disse uma vez Rosalynn Carter, *A leader takes people where they want to go. A great leader takes people where they don't necessarily want to go, but ought to be*. Obrigada por tudo o que me ensinou.

Ao Dr. Francisco Pina e ao Dr. Avelino Fraga, pela colaboração na parte clínica deste trabalho.

À Sílvia Fontenete, grande companheira nesta jornada, pelas constantes gargalhadas, mesmo nas alturas mais difíceis. Este trabalho não teria sido possível sem a tua ajuda, obrigada.

A todo o pessoal que constitui o Grupo de Oncologia Molecular, por continuarem a acreditar na investigação básica. Uma palavra especial à Ana Luísa Teixeira, pelo apoio incondicional nesta última etapa do trabalho, pelas revisões e re-re-revisões, obrigada pela paciência. Um agradecimento especial também à Joana Assis, por ser capaz de reparar no que mais ninguém repara e pela constante boa-disposição, obrigada pelas conversas e risadas.

## **AGRADECIMENTOS**

---

A todos os meus amigos, por toda a paciência nesta fase tão importante para mim. Por compreenderem as ausências e “mocas de sono”. Um obrigada especial ao Cláudio, pela ajuda na revisão deste trabalho e por todo o apoio que me deu.

Aos meus pais, por terem suportado todos os meus encargos, sem eles não tinha chegado até aqui. Ao meu irmão, por ser capaz de me fazer rir em qualquer altura.

Aos meus tios, por me terem ensinado a nunca parar, a lutar sempre pelo que quero, por todos os valores que me transmitiram, por nunca me terem deixado desanimar quando um dia corre mal, por tudo...

Ao Bertinho, pela grande/enorme/gigante paciência que teve durante esta fase, por todo o amor e apoio e principalmente por nunca ter duvidado que eu era capaz. Obrigada por acreditares sempre em mim.

**AMACR** –  $\alpha$ -metilacil Co-enzima A racemase

**BRCT** – *Breast cancer C-terminal*

**C** – Citosina

**cDNA** – Ácido desoxirribonucleico complementar

**Ct** – Ciclo de *thredshold*

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**dNTP's** – Desoxinucleótidos-trifosfato

**DO** – Densidade óptica

**DRE** – Exame do toque rectal

**DTT** – Ditiotreitól

**ERG** – *V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene like (avian)*

**ERSPC** – *European Randomised study of Screening for Prostate Cancer*

**FHA** – *Forkhead associated*

**G** – Guanina

**GAPDH** – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

**GOLM1** – *Golgi membrane protein 1*

**HBP** – Hiperplasia benigna da próstata

**IC** – Intervalo de confiança

**mRNA** – Ácido ribonucleico mensageiro

**NBN** – Nibrina

**OR** – *Odds Ratio*

**pb** – Pares de bases

**PCA3** – Gene 3 do cancro da próstata

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction*

**PI3K** – Fosfatidilinositol-3 cinase

**PIN** – Neoplasia intraepitelial da próstata

**PLCO** – *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial*

**PSA** – Antígeno específico da próstata

**Real-Time PCR** – *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

**RFLP** – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**RNA** – Ácido ribonucleico

**rpm** – Rotações por minuto

**SERPINB5** – *Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5*

**SNB** – Síndrome de Nijmegen Breakage

**SNP** – *Single Nucleotide Polymorphism*

**TFF3** – Gene 3 da família de factores *Trefoil*

**TRUS** – Ecografia transrectal

|                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Resumo</b> .....                                                                                                                                                   | XXI |
| <b>Abstract</b> .....                                                                                                                                                 | XXV |
| <b>1. Introdução</b> .....                                                                                                                                            | 1   |
| 1.1. Cancro: Aspectos gerais .....                                                                                                                                    | 1   |
| 1.2. Biologia Molecular do Cancro .....                                                                                                                               | 1   |
| 1.2.1. Integridade genómica e cancro .....                                                                                                                            | 4   |
| 1.2.2. Variabilidade genética e cancro .....                                                                                                                          | 4   |
| 1.3. Cancro da Próstata .....                                                                                                                                         | 5   |
| 1.3.1. Epidemiologia .....                                                                                                                                            | 5   |
| 1.3.2. Factores de Risco .....                                                                                                                                        | 7   |
| 1.3.3. Patologia e História Natural .....                                                                                                                             | 8   |
| 1.3.4. Rastreio e Detecção Precoce .....                                                                                                                              | 10  |
| 1.3.5. Diagnóstico e Tratamento .....                                                                                                                                 | 11  |
| 1.4. Biomarcadores .....                                                                                                                                              | 12  |
| 1.4.1. Detecção de biomarcadores em amostras de urina .....                                                                                                           | 14  |
| 1.4.1.1. <i>PSA</i> .....                                                                                                                                             | 15  |
| 1.4.1.2. <i>PCA3</i> .....                                                                                                                                            | 16  |
| 1.4.1.3. <i>AMACR</i> .....                                                                                                                                           | 17  |
| 1.4.1.4. <i>TFF3</i> .....                                                                                                                                            | 18  |
| 1.4.1.5. <i>SERPINB5</i> .....                                                                                                                                        | 19  |
| 1.4.1.6. <i>GOLM1</i> .....                                                                                                                                           | 20  |
| 1.4.1.7. <i>ERG</i> .....                                                                                                                                             | 21  |
| 1.4.2. Detecção da variante -8360G>C no gene da nibrina .....                                                                                                         | 22  |
| <b>2. Objectivos</b> .....                                                                                                                                            | 25  |
| 2.1. Objectivos gerais .....                                                                                                                                          | 25  |
| 2.2 Objectivos específicos .....                                                                                                                                      | 25  |
| <b>3. Material e Métodos</b> .....                                                                                                                                    | 27  |
| 3.1. Análise da expressão dos genes <i>PSA</i> , <i>PCA3</i> , <i>AMACR</i> , <i>TFF3</i> ,<br><i>SERPINB5</i> , <i>GOLM1</i> e <i>ERG</i> em amostras de urina ..... | 27  |

|                                                                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.1. Caracterização da população .....                                                                                                                              | 27        |
| 3.1.2. Procedimentos laboratoriais .....                                                                                                                              | 27        |
| 3.1.2.1. Optimização do procedimento laboratorial .....                                                                                                               | 27        |
| 3.1.2.2. Recolha das amostras .....                                                                                                                                   | 29        |
| 3.1.2.3. Extracção do RNA .....                                                                                                                                       | 30        |
| 3.1.2.4. Quantificação do RNA .....                                                                                                                                   | 30        |
| 3.1.2.5. Síntese do cDNA .....                                                                                                                                        | 31        |
| 3.1.2.6. Quantificação do cDNA .....                                                                                                                                  | 31        |
| 3.1.2.7. Análise da expressão genética por Real-Time PCR .....                                                                                                        | 32        |
| 3.1.3. Análise estatística .....                                                                                                                                      | 33        |
| 3.2. Análise da frequência do polimorfismo <i>NBN-8360G&gt;C</i> .....                                                                                                | 34        |
| 3.2.1. Caracterização da população .....                                                                                                                              | 34        |
| 3.2.2. Procedimentos laboratoriais .....                                                                                                                              | 34        |
| 3.2.2.1. Processamento das amostras .....                                                                                                                             | 34        |
| 3.2.2.2. Amplificação do fragmento do gene <i>NBN</i> .....                                                                                                           | 35        |
| 3.2.2.3. Identificação dos fragmentos de DNA por electroforese .....                                                                                                  | 35        |
| 3.2.2.4. Digestão do fragmento do gene <i>NBN</i> .....                                                                                                               | 36        |
| 3.2.2.5. Separação dos fragmentos de DNA por electroforese .....                                                                                                      | 36        |
| 3.2.3. Análise estatística .....                                                                                                                                      | 37        |
| 3.3. Análise da expressão do gene <i>NBN</i> .....                                                                                                                    | 38        |
| 3.3.1. Caracterização da população .....                                                                                                                              | 38        |
| 3.3.2. Procedimentos laboratoriais .....                                                                                                                              | 38        |
| 3.3.3. Análise estatística .....                                                                                                                                      | 38        |
| <b>4. Resultados .....</b>                                                                                                                                            | <b>39</b> |
| 4.1. Análise da expressão dos genes <i>PSA</i> , <i>PCA3</i> , <i>AMACR</i> , <i>TFF3</i> ,<br><i>SERPINB5</i> , <i>GOLM1</i> e <i>ERG</i> em amostras de urina ..... | 39        |
| 4.1.1. Optimização do procedimento laboratorial .....                                                                                                                 | 39        |
| 4.1.2. Quantificação do RNA .....                                                                                                                                     | 40        |
| 4.1.3. Quantificação do cDNA .....                                                                                                                                    | 42        |

|                                                                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.4. Análise da expressão genética por Real-Time PCR .....                                                                                               | 45        |
| 4.2. Análise da frequência do polimorfismo <i>NBN-8360G&gt;C</i> .....                                                                                     | 48        |
| 4.3. Análise da expressão do gene <i>NBN</i> .....                                                                                                         | 51        |
| <b>5. Discussão</b> .....                                                                                                                                  | <b>53</b> |
| 5.1. Expressão dos genes <i>PSA</i> , <i>PCA3</i> , <i>AMACR</i> , <i>TFF3</i> , <i>SERPINB5</i> , <i>GOLM1</i><br>e <i>ERG</i> em amostras de urina ..... | 53        |
| 5.2. Frequência do polimorfismo <i>NBN-8360G&gt;C</i> em doentes com cancro da<br>próstata .....                                                           | 59        |
| 5.3. Expressão do gene <i>NBN</i> em doentes com cancro da próstata .....                                                                                  | 61        |
| <b>6. Conclusão e Perspectivas Futuras</b> .....                                                                                                           | <b>63</b> |
| <b>7. Referências Bibliográficas</b> .....                                                                                                                 | <b>65</b> |
| <b>8. Anexos</b> .....                                                                                                                                     | <b>85</b> |

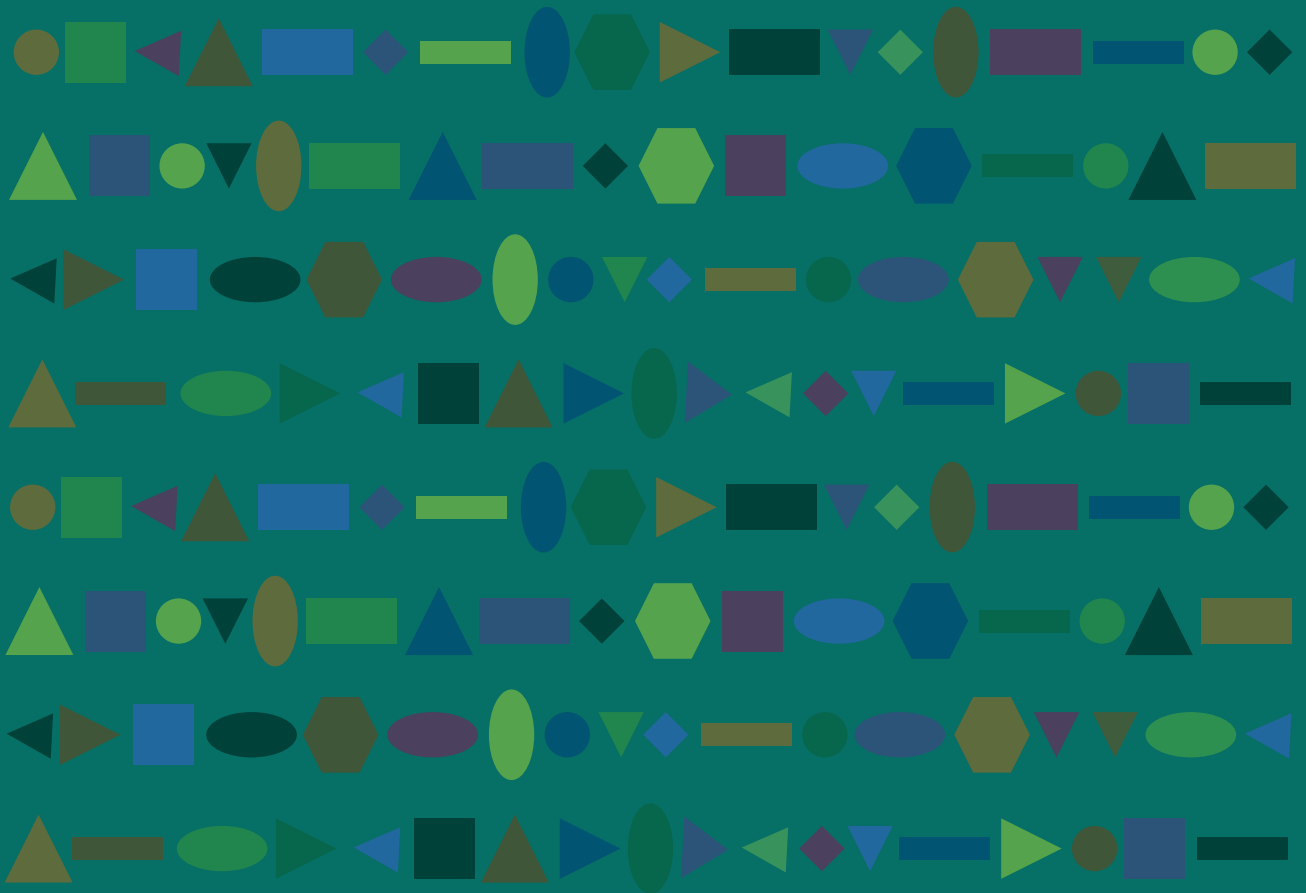
|                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Representação esquemática do processo de carcinogénese .....                                                                                                                                                                                                | 2  |
| <b>Figura 2</b> – Representação esquemática das alterações adquiridas pelas células malignas .....                                                                                                                                                                            | 3  |
| <b>Figura 3</b> – Taxa de mortalidade anual por cancro da próstata/100.000 homens .....                                                                                                                                                                                       | 6  |
| <b>Figura 4</b> – Representação esquemática das diferentes zonas que constituem a próstata .....                                                                                                                                                                              | 8  |
| <b>Figura 5</b> – Representação esquemática da passagem de secreções prostáticas para o sistema urinário .....                                                                                                                                                                | 15 |
| <b>Figura 6</b> – Representação esquemática das diferentes vias em que o <i>NBN</i> pode estar envolvido .....                                                                                                                                                                | 23 |
| <b>Figura 7</b> – Representação esquemática dos passos efectuados para a optimização do procedimento de amostras de urinas para estudos de expressão genética .....                                                                                                           | 28 |
| <b>Figura 8</b> – Gel de agarose a 1,5% (p/v), representando a banda de 290 pb que corresponde à região de <i>NBN</i> amplificada por PCR .....                                                                                                                               | 36 |
| <b>Figura 9</b> – Gel de agarose a 3% (p/v), representando os três padrões de RFLP, e respectivos genótipos do polimorfismo <i>NBN-8360G&gt;C</i> .....                                                                                                                       | 37 |
| <b>Figura 10</b> – Gráfico representativo da percentagem de amostras em estudo em que foi possível detectar-se expressão dos genes <i>PSA</i> , <i>PCA3</i> , <i>GOLM1</i> , <i>AMACR</i> , <i>SERPINB5</i> , <i>TFF3</i> e <i>ERG</i> .....                                  | 46 |
| <b>Figura 11</b> – Gráfico representativo da comparação dos valores de Ct obtidos por Real-Time PCR para o gene <i>PSA</i> , e normalizados com o gene de referência <i>GAPDH</i> , nos indivíduos com patologia benigna <i>versus</i> indivíduos com doença oncológica ..... | 47 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 12</b> – Gráfico representativo da comparação dos valores de Ct obtidos por Real-Time PCR para o gene <i>AMACR</i> , e normalizados com o gene de referência <i>GAPDH</i> , nos indivíduos com patologia benigna <i>versus</i> indivíduos com doença oncológica ..... | 47 |
| <b>Figura 13</b> – Gráfico representativo da comparação dos valores de Ct obtidos por Real-Time PCR para o gene <i>TFF3</i> , e normalizados com o gene de referência <i>GAPDH</i> , nos indivíduos com patologia benigna <i>versus</i> indivíduos com doença oncológica .....  | 48 |
| <b>Figura 14</b> – Gráfico representativo da comparação dos valores de Ct obtidos por Real-Time PCR para o gene <i>NBN</i> , e normalizados com o gene de referência <i>GAPDH</i> .....                                                                                         | 52 |

|                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro I</b> – Comportamento do <i>PSA</i> em homens assintomáticos com resultados normais de DRE .....                                                                                                                              | 16 |
| <b>Quadro II</b> – Identificação dos <i>assays</i> (TaqMan® <i>Applied Biosystems</i> ) utilizados para medir a expressão dos genes em estudo .....                                                                                     | 32 |
| <b>Quadro III</b> – Resultados obtidos por espectrofotometria referentes à concentração de RNA (ng/μL) e ao rácio de absorvâncias $A_{260/280}$ , para amostras processadas de diferentes formas .....                                  | 39 |
| <b>Quadro IV</b> – Resultados obtidos por espectrofotometria referentes à concentração de RNA (ng/μL) e aos rácios de absorvâncias $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ para amostras de doentes que não realizaram massagem prostática .....  | 41 |
| <b>Quadro V</b> – Resultados obtidos por espectrofotometria referentes à concentração de RNA (ng/μL) e aos rácios de absorvâncias $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ para amostras de doentes que realizaram massagem prostática .....       | 42 |
| <b>Quadro VI</b> – Resultados obtidos por espectrofotometria referentes à concentração de cDNA (ng/μL) e aos rácios de absorvâncias $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ para amostras de doentes que não realizaram massagem prostática ..... | 43 |
| <b>Quadro VII</b> – Resultados obtidos por espectrofotometria referentes à concentração de cDNA (ng/μL) e aos rácios de absorvâncias $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ para amostras de doentes que realizaram massagem prostática .....    | 44 |
| <b>Quadro VIII</b> – Resultados obtidos por Real-Time PCR para o gene de referência <i>GAPDH</i> , para todas as amostras em estudo .....                                                                                               | 45 |
| <b>Quadro IX</b> – Valores médios correspondentes à idade e concentração de <i>PSA</i> (ng/mL), de acordo com os genótipos do polimorfismo <i>NBN-8360G&gt;C</i> .....                                                                  | 49 |
| <b>Quadro X</b> – Frequências genotípicas de <i>NBN-8360G&gt;C</i> nos grupos de cancro da próstata com doença avançada e doença localizada .....                                                                                       | 49 |

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro XI</b> – Frequências genotípicas de <i>NBN-8360G&gt;C</i> no grupo de doentes com cancro da próstata, de acordo com o grau histológico de Gleason .....                | 50 |
| <b>Quadro XII</b> – Resultados obtidos por Real-Time PCR para o gene de referência <i>GAPDH</i> e para o gene alvo <i>NBN</i> , para todas as amostras incluídas neste estudo .. | 51 |
| <b>Quadro XIII</b> – Condições de pré-amplificação segundo o número de ciclos desejado.....                                                                                      | 86 |

# RESUMO



O cancro da próstata constitui um grave problema de saúde pública, sendo uma das neoplasias mais frequentes no mundo. Tendo em conta a elevada heterogeneidade que esta doença apresenta, torna-se relevante o estudo das vias moleculares envolvidas no seu desenvolvimento/progressão, bem como a identificação de genes chave envolvidos nas diferentes etapas da história da doença.

A aplicação do *PSA* como biomarcador permitiu grandes avanços na detecção de cancro da próstata, sendo actualmente utilizado no programa de rastreio da doença. No entanto, ainda existem alguns problemas relacionados com a sua utilização, nomeadamente no que diz respeito aos valores de sensibilidade e especificidade. Como tal, torna-se importante a descoberta de novos biomarcadores que ajudem no diagnóstico e prognóstico do cancro da próstata, de forma a evitar o seu desenvolvimento/progressão para doença metastática, possibilitando também o desenho de novas terapias mais efectivas e individualizadas. A utilização de urinas enquanto amostras biológicas para estudos de expressão genética apresenta diversas vantagens, nomeadamente a sua fácil obtenção em elevadas quantidades, não apresentando qualquer tipo de invasividade para o doente.

O desenvolvimento/progressão de cancro da próstata pode também ser influenciado pela ocorrência de variantes genéticas funcionais em genes-chave envolvidos no mecanismo de carcinogénese prostática. A ocorrência destas variantes, com impacto na biodisponibilidade/actividade da respectiva proteína, poderão introduzir alterações no microambiente celular e tumoral que se poderão reflectir no risco de desenvolvimento desta doença e na sua progressão, respectivamente. A ocorrência destas variantes em genes envolvidos em processos de conservação da integridade genómica pode comprometer a função deste sistema, podendo deste modo influenciar o risco de desenvolvimento e de progressão de cancro da próstata em indivíduos portadores destas variantes.

Deste modo, o presente estudo constitui uma abordagem multivariada, tendo como objectivo identificar possíveis novos biomarcadores para doença prostática, expressos em amostras de urina, e avaliar a influência da variabilidade genética do indivíduo no risco de desenvolvimento/progressão de cancro da próstata.

Para o estudo dos transcritos dos genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG* foram utilizadas cinquenta e sete (57) amostras de urina provenientes de indivíduos com suspeita de patologia prostática, as quais foram recolhidas sem realização prévia de massagem prostática. Estas foram posteriormente comparadas com dez (10) amostras de urina, recolhidas após massagem prostática, também provenientes

de indivíduos com suspeita de patologia prostática, recorrendo-se para tal à técnica de Real-Time PCR.

Uma vez que a utilização de urinas enquanto amostras biológicas para estudos de expressão genética é uma abordagem recente, foi necessária a optimização de um procedimento laboratorial para o processamento das amostras. Para tal, foram testadas diferentes soluções de conservação celular, diferentes métodos de extracção de RNA e ainda a utilidade de um teste de pré-amplificação.

Na avaliação da influência da variabilidade genética do indivíduo no risco de desenvolvimento/progressão de cancro da próstata, foi estudado o polimorfismo *NBN-8360G>C*, envolvido na resposta a danos no DNA, em amostras de sangue periférico de trezentas e noventa e sete (397) indivíduos com doença localizada e avançada. A caracterização genotípica foi realizada por técnica de PCR-RFLP. Posteriormente, destas 397 amostras, foram seleccionadas catorze (14) amostras para avaliar a relação entre o polimorfismo em estudo e a expressão do gene *NBN*, através da técnica de Real-Time PCR.

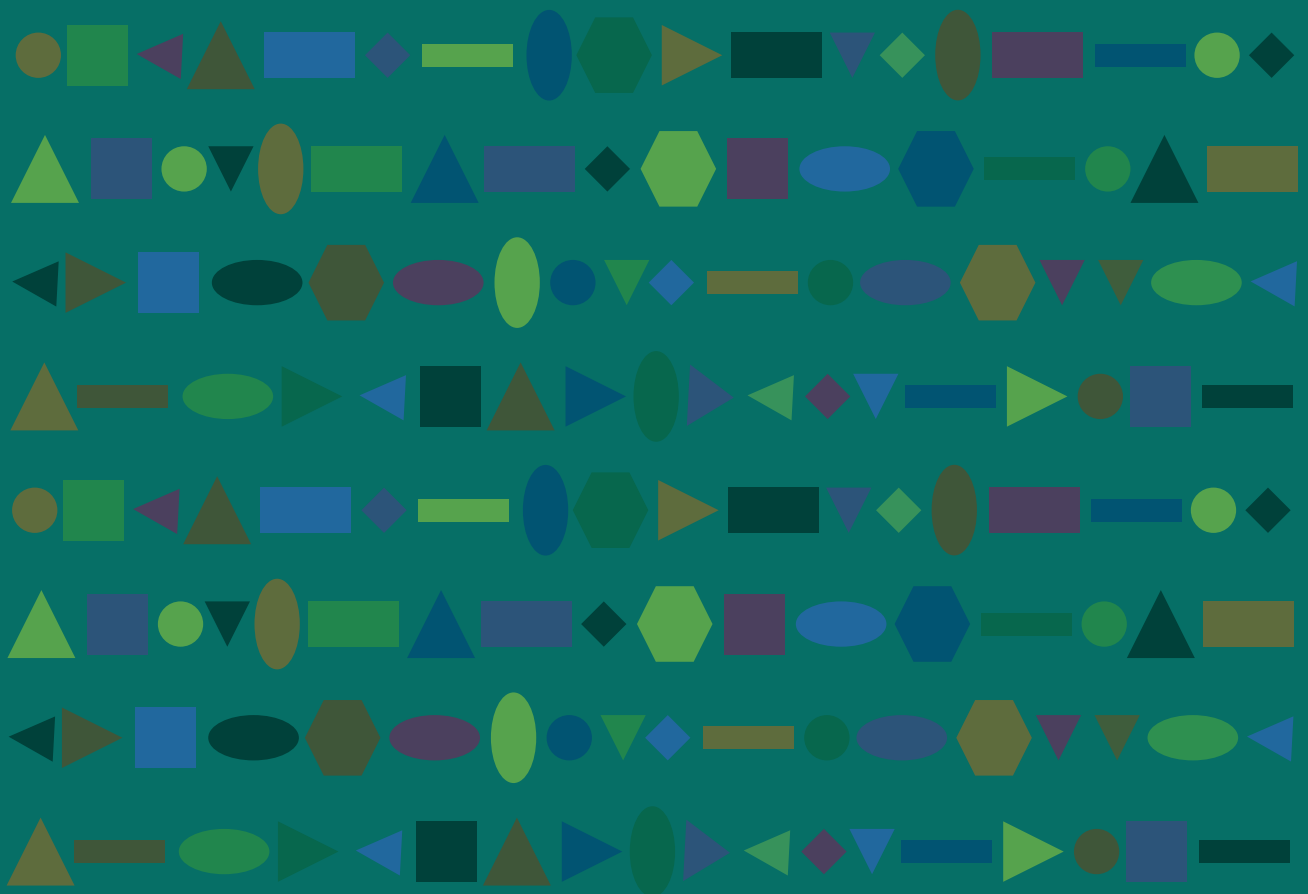
Os resultados obtidos referentes à avaliação do uso de urinas enquanto amostras biológicas revelaram que o melhor procedimento laboratorial a adoptar seria o armazenamento das amostras em solução de TriPure, e posterior extracção do RNA através do método clássico do TriPure. A realização de um passo de pré-amplificação não revelou qualquer melhoria nos resultados obtidos por Real-Time PCR. No que diz respeito à influência da realização de massagem prostática, foi possível verificar um ligeiro aumento na detecção dos transcritos da maior parte dos genes em estudo, existindo no entanto ainda alguma dificuldade nessa mesma detecção.

Relativamente ao estudo do polimorfismo *NBN-8360G>C*, verificou-se que os indivíduos portadores do genótipo GG apresentam um risco mais elevado para doença metastática (OR = 1,955; IC 95% = 1,300 – 2,940;  $p = 0,001$ ), não se tendo encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa para o grau de Gleason, idade e concentração de PSA ( $p = 0,317$ ;  $p = 0,254$ ;  $p = 0,639$ , respectivamente). Também não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significativas nos níveis de expressão do gene *NBN* quando comparados os portadores do alelo C com os indivíduos com o genótipo *NBN-8360GG* (rácio de expressão normalizada = 1,05;  $p = 0,894$ ).

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a necessidade de se estabelecer um procedimento universal para o processamento de amostras de urina em estudos de expressão genética, sublinhando a importância da realização de massagem prostática, de forma a aumentar a concentração de células esfoliadas presentes na

amostra. No entanto, parecem existir outros factores capazes de influenciar a detecção de transcritos em amostras de urina. A associação encontrada entre o polimorfismo *NBN-8360G>C* e o risco para doença avançada revela a importância desta variação genética na progressão do cancro da próstata.

# ABSTRACT



Prostate cancer represents a serious health problem by being one of the most common cancers all over the world. Given the enormous heterogeneity presented by this disease, it is urgent to study the molecular pathways implicated in its development/progression, and also to identify key genes that might be involved in different stages of the disease.

The application of *PSA* as a biomarker allowed some great advances in prostate cancer detection and is being currently used in screening tests for this disease. However, there are still a few problems in its application, mainly regarding its sensitivity and specificity. Therefore, it is important to discover new biomarkers that may improve prostate cancer diagnosis and prognosis, in order to avoid its development/progression into a metastatic disease and allow the discovery of new therapies that are more effective and individualized. The use of urine samples in gene expression studies has many advantages, namely its easy collection in elevated quantities without involving any invasiveness to the patient.

Prostate cancer development/progression may also be influenced by functional genetic variants in key genes involved in prostate carcinogenesis. These variants may affect the bioavailability/activity of the respective protein, therefore altering the tumoral and cellular microenvironment. This will reflect in a higher risk for prostate cancer development and progression. The occurrence of these variants in genes involved in the maintenance of genomic integrity may compromise this system function, influencing prostate cancer risk in carriers of such variants.

For this reason, this study comprises a multivariate approach with the purpose of identifying possible biomarkers for prostatic disease present in urine samples, and evaluating genetic variability influence in prostate cancer development/progression.

In order to assess *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* and *ERG* transcripts, fifty-seven (57) urine samples from men with suspected prostate disease were used. These samples were collected without performing prostate massage and then compared with ten (10) urine samples collected after prostate massage, also from men with prostate disease. A gene expression analysis was carried out by Real-Time PCR. Since urine samples represent a recent approach in gene expression studies, it was necessary to optimize a laboratory procedure to collect, process and preserve the samples. Different solutions for cell conservation, different RNA extraction methods and also a pre-amplification step were tested.

To evaluate the influence of genetic variability on prostate cancer development/progression, the *NBN-8360G>C* polymorphism, involved in the response to

DNA damages, was analyzed by PCR-RFLP in peripheral blood samples from three hundred and ninety seven (397) men with localized and advanced prostate cancer. Then, fourteen (14) samples were selected from the 397 samples, so as to evaluate the relationship between the polymorphism in study and *NBN* expression by Real-Time PCR.

Regarding the use of urine as biological samples, the results show that the best laboratory procedure would be the storage of samples in TriPure Isolation Reagent, followed by RNA extraction through classical TriPure method. The pre-amplification test demonstrates no improvement in the results obtained by Real-Time PCR. As far as prostate massage influence is concerned, it is possible to detect a slight increase in transcripts detection for the most genes in study. However, there are still some difficulties in this detection.

As for *NBN-8360G>C* polymorphism, the results show that men with GG genotype have a higher risk for metastatic disease (OR = 1,955; IC 95% = 1,300 – 2,940;  $p = 0,001$ ), with no significant association to age, *PSA* levels and Gleason grade. Any statistically differences in *NBN* gene expression levels were not found as well, when comparing C carriers and GG genotype (normalized expression ratio = 1,05;  $p = 0,894$ ).

The results obtained in the present work suggest the need of a universal laboratory procedure for urine samples handling in gene expression analysis, highlighting the importance of prostate massage, in order to increase exfoliated cells concentration in the sample. However, there seem to be other factors capable of influencing transcripts detection in urine samples. The association found between *NBN-8360G>C* polymorphism and the risk for advanced disease shows the importance of this genetic variation for prostate cancer progression.

# 1. INTRODUÇÃO



### 1.1 Cancro: Aspectos gerais

Todos os anos são detectados cerca de 11 milhões de novos casos de cancro em todo o mundo. Destes, apenas 30% sobrevivem, tornando o cancro a segunda causa de morte por doença em todo o mundo, a seguir às doenças cardiovasculares [1]. Em Portugal, o risco de uma pessoa ter cancro antes dos 75 anos é de 22,3% [2]. Estes números têm tendência a aumentar devido à crescente exposição a diversos factores de risco, quer sejam de natureza química, física ou biológica, bem como ao aumento da esperança média de vida.

Apesar dos registos mais antigos sobre esta doença remontarem ao Antigo Egipto, acredita-se ter sido Hipócrates o primeiro a dar-lhe um nome – *karkinos*, que em grego significa caranguejo, uma vez que o padrão de invasão da doença lhe fazia lembrar as garras deste animal [3]. No entanto, só no século XVIII é que o cancro começou a ser estudado exaustivamente, revelando uma heterogeneidade enorme que ainda hoje torna difícil a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao seu desenvolvimento. Assim, o grande desafio no estudo desta doença diz respeito à sua biologia, uma vez que reflecte a quebra das leis fundamentais do comportamento celular enquanto parte de um organismo multicelular.

### 1.2 Biologia Molecular do Cancro

Sabe-se hoje em dia que o cancro é uma doença multifactorial, caracterizado por diversas alterações na expressão genética responsáveis pela desregulação do programa normal de divisão e diferenciação celular. Esta desregulação afecta o normal balanço entre a replicação celular e a morte celular, favorecendo o crescimento de uma população de células alteradas [4]. Estas células, denominadas de tumorais, podem ser distinguidas das células normais recorrendo a técnicas de microscopia, já que os seus núcleos são comparativamente maiores, apresentam uma distribuição irregular dos cromossomas e os nucléolos são bastante proeminentes. A esta aparência dá-se o nome de desdiferenciação [4].

Os tumores podem ser divididos em dois grandes grupos: tumores benignos e tumores malignos. Os tumores benignos apresentam um risco reduzido para o hospedeiro uma vez que estão confinados, têm um tamanho pequeno e um crescimento

## 1. INTRODUÇÃO

---

lento, possibilitando assim a sua remoção através de cirurgia e evitando o crescimento de tumores em locais distantes (metastização). Por outro lado, as células que compõem um tumor maligno apresentam normalmente taxas de crescimento e divisão maiores, uma taxa de mortalidade menor e são capazes de invadir tecidos adjacentes, entrar no sistema circulatório e estabelecer novas áreas de proliferação, através de um processo denominado metastização [5].

O processo através do qual as células normais originam células neoplásicas é conhecido como carcinogénese e envolve três passos: iniciação, promoção/transformação e progressão [6] (Figura 1).

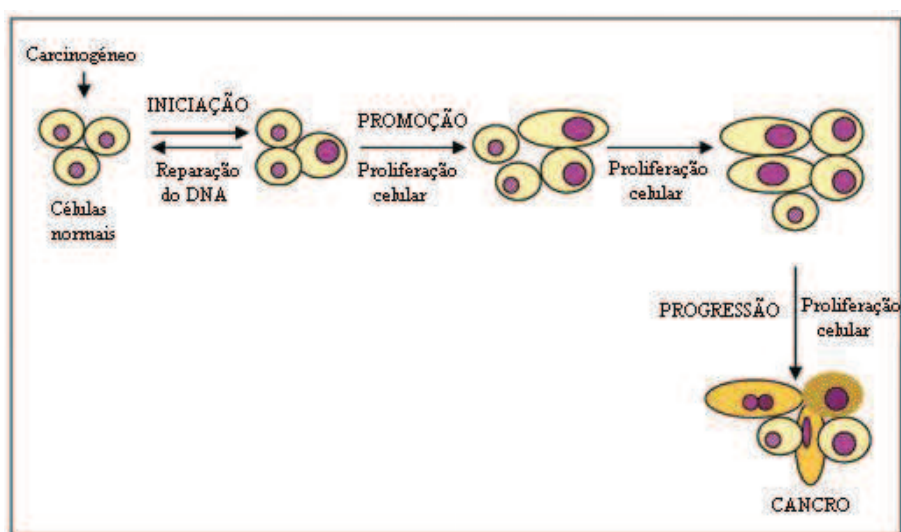


Figura 1 – Representação esquemática do processo de carcinogénese (adaptado de Oliveira PA *et al.*, 2007 <sup>[6]</sup>)

Durante a iniciação, um carcinogénico interage com o material genético, danificando-o e provocando uma mutação não-letal. Nesta fase pode ocorrer uma reparação do material genético e, por conseguinte, a reversão do processo. Quando a reparação falha, a promoção provoca a proliferação da célula danificada, formando uma massa de células biologicamente autónomas, mas dependentes de oxigénio e nutrientes do hospedeiro. Esta fase pode ainda ser reversível, uma vez que a remoção do agente promotor pode parar a expansão da massa tumoral. A progressão, contudo, é irreversível e envolve uma série de mutações sequenciais em genes chave, como proto-oncogenes (genes cuja função normal consiste na indução da proliferação celular) e genes supressores tumorais (genes que normalmente codificam proteínas que inibem a divisão celular), entre outros [6-7].

Como resultado deste processo, as células adquirem novos fenótipos e características que lhes conferem vantagem adaptativa, das quais se destacam a auto-suficiência em factores de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, potencial replicativo ilimitado, escape à apoptose, capacidade de invasão tecidual, metastização e angiogénese [8]. Mais recentemente foi proposta uma nova marca para estas células relacionada com a inflamação e cancro [9] (Figura 2).



Figura 2 – Representação esquemática das alterações adquiridas pelas células malignas (adaptado de Hanahan and Weinberg, 2000 e Mantovani A, 2009 <sup>[8-9]</sup>)

Algumas destas alterações poderão ser transmitidas à descendência, através da linhagem germinativa, originando os cancros familiares. No entanto, estima-se que cerca de 90% neoplasias surgem de modo esporádico, na linhagem somática de tipos específicos de células [10].

As causas de uma determinada neoplasia, bem como todos os mecanismos envolvidos na carcinogénese variam de indivíduo para indivíduo, o que reforça a

importância do estudo da genética para o desenvolvimento de cancro. A epidemiologia molecular surge assim como uma ferramenta essencial na análise de potenciais factores etiológicos, a fim de estabelecer grupos de risco para esta doença, isto é, grupos de indivíduos que sejam mais susceptíveis ao desenvolvimento de uma determinada neoplasia.

### 1.2.1 Integridade genómica e cancro

A capacidade de detectar danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) e activar formas de resposta que coordenem a sua reparação e a progressão do ciclo celular é essencial para a manutenção da integridade genómica e da viabilidade celular. Se esta defesa for comprometida, pode ocorrer uma acumulação de mutações em genes-chave, o que poderá resultar no desenvolvimento de transformações malignas [11].

De entre os vários tipos de danos do DNA, a quebra da cadeia dupla é dos mais importantes e severos, podendo ocorrer ocasionalmente durante o processamento do DNA, ou por indução através de agentes externos como por exemplo a radiação ionizante [12]. A detecção inicial deste tipo de danos é feito por *checkpoints*, que consistem em mecanismos de controlo de qualidade, isto é, asseguram a execução correcta do ciclo celular emitindo sinais que estimulam respostas biológicas apropriadas [13].

Existem pelo menos dois mecanismos de reparação de quebras na cadeia dupla do DNA: recombinação homóloga, que usa sequências homólogas de DNA como modelo para a síntese de novas cadeias e união terminal não homóloga (em inglês *Non-homologous end joining* – NHEJ) que como o nome indica promove a ligação das extremidades quebradas na ausência de uma nova cópia.

O mau funcionamento destes mecanismos pode resultar na fusão anómala de cromossomas, provocando rearranjos tais como inversões, translocações e deleções, que irão modificar a expressão de determinados genes, podendo desta forma afectar a proliferação e morte celular [14].

### 1.2.2 Variabilidade genética e cancro

Tendo em conta o carácter heterogéneo do cancro, sabe-se que o seu desenvolvimento é condicionado por diversos genes, que podem ser avaliados de acordo

com a sua penetrância, isto é, com a probabilidade que têm em serem expressos fenotipicamente. Desta forma, existem genes de elevada penetrância, que estão geralmente envolvidos em cancros hereditários, e genes de baixa penetrância, mais associados com cancros esporádicos [15]. Estes últimos constituem bons alvos de estudo, uma vez que estão envolvidos em diversos processos importantes na carcinogénese, tais como a reparação do DNA, a manutenção da integridade genómica e/ou o controlo da proliferação e diferenciação celular. Apesar destes genes não estarem muito relacionados com o risco individual, a sua análise poderá ser útil na elaboração de estratégias de prevenção a nível populacional [7].

A variabilidade genética inter-individual, com impacto no microambiente celular do hospedeiro, parece exercer algum efeito na susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro. Esta variabilidade é consequência da ocorrência de polimorfismos genéticos, que consistem em variações genéticas que existem em indivíduos normais, sendo que a variante menos frequente pode ser encontrada em pelo menos 1% da população. Estas variações podem afectar a transcrição genética, a estabilidade do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) ou a quantidade e a actividade da proteína resultante, afectando em última instância o desenvolvimento tumoral [4].

A variação genética mais comum designa-se por *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), e tal como o nome sugere, resulta na alteração de um único nucleótido na sequência do DNA [16]. Acredita-se que os padrões de SNP's que um indivíduo possui em determinados genes-chave possam influenciar o seu risco para o desenvolvimento de certas doenças, nomeadamente de cancro [17]. Neste sentido, é de extrema importância o estudo de perfis genéticos que permitam a identificação de grupos de risco, de forma a melhorar a eficácia de programas de intervenção nesta doença.

## 1.3 Cancro da Próstata

### 1.3.1 Epidemiologia

O cancro da próstata constitui um grave problema de saúde pública, sendo uma das neoplasias mais frequentes no mundo. Estima-se que no ano de 2008 tenham ocorrido 903.000 novos casos no mundo inteiro, 75% dos quais em países desenvolvidos, e 258.000 mortes provocadas pela doença [18]. Foi no mesmo ano a

neoplasia mais frequente no sexo masculino em Portugal, com uma taxa de incidência ajustada à idade de 50,0 novos casos por cada 100.000 homens. Já a taxa de mortalidade ajustada à idade foi de 18,8 por cada 100.000 indivíduos, representando um dos valores mais elevados da Europa (Figura 3) [19].

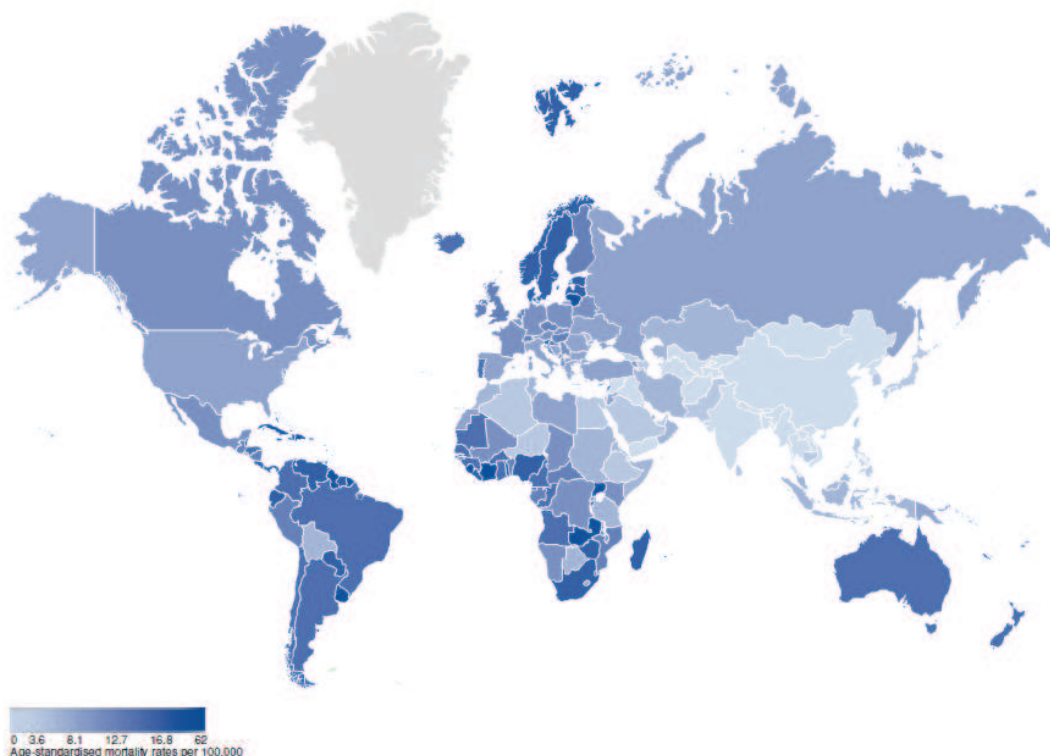


Figura 3 – Taxa de mortalidade anual por cancro da próstata/100.000 homens (Globocan 2008, IARC [2])

Relativamente às taxas de incidência de cancro da próstata verifica-se uma grande heterogeneidade a nível mundial, o que revela a existência de grandes diferenças inter-popacionais. Observam-se taxas de incidência mais elevadas nas populações de países desenvolvidos, nomeadamente na Austrália e Nova Zelândia, Europa Ocidental e América do Norte, enquanto as mais baixas foram registadas em populações Asiáticas [20]. A etnia também parece desempenhar um papel no desenvolvimento desta neoplasia. A população Afro-americana apresenta a maior taxa de incidência da doença, sendo 70% superior à da população Caucasiana [21]. No entanto, a incidência de cancro da próstata em indivíduos de raça negra em África é cerca de 4 vezes inferior à dos Afro-americanos [20, 22], o que sugere a existência de outros factores, que não os de origem genética, envolvidos no aparecimento desta doença, nomeadamente factores ambientais e estilo de vida. Também as taxas de mortalidade por cancro da próstata variam

globalmente, tendo vindo a aumentar em alguns países Asiáticos, como o Japão e Singapura. Por outro lado, países mais desenvolvidos como os Estados Unidos, Reino Unido e Canadá apresentam uma diminuição destas taxas, facto que se deve provavelmente à inovação nos tratamentos e à detecção precoce da doença, bem como ao tipo de registo oncológico de cada país [23-24].

O desenvolvimento de estratégias de detecção precoce e de abordagens terapêuticas reflectiu-se significativamente nas taxas de incidência e mortalidade. É possível verificar a cada 5 anos um aumento de cerca de 10% de novos casos de cancro da próstata na maioria dos países Europeus. Relativamente às taxas de mortalidade, estas têm estabilizado, chegando mesmo a diminuir em alguns casos [25].

### 1.3.2 Factores de risco

Apesar da sua elevada incidência e mortalidade, pouco se sabe acerca da etiologia do cancro da próstata, tendo sido propostos diversos factores de risco.

O ambiente, dieta e estilo de vida têm sido alvo de vários estudos, tendo-se observado que a migração de indivíduos de países com baixas taxas de incidência e mortalidade de cancro da próstata para países com taxas mais elevadas aumenta o risco para a doença [21, 26-27].

A idade é o principal factor de risco para cancro da próstata, verificando-se um aumento exponencial do número de casos em homens com mais de 65 anos. Um estudo recente com base em autópsias revelou uma prevalência média da doença de 23% em homens com 40 anos, 42% em homens com 60 anos e quase 60% em homens com 70 anos [28].

Outra possível causa que tem vindo a ser estudada é a ingestão de gorduras saturadas. As gorduras e produtos de origem animal constituem mais de 40% da ingestão calórica total na população norte-americana, população em que esta neoplasia é mais frequente. No mundo oriental, onde a dieta é em geral pobre em gorduras e produtos de origem animal mas rica em fibras e outros constituintes de origem vegetal, a mortalidade em consequência da doença é significativamente mais baixa. No entanto, a associação entre dieta e risco para cancro da próstata ainda não está bem estabelecida, existindo alguns estudos com resultados controversos [29-31].

A história familiar da doença é também um importante factor de risco para o desenvolvimento de cancro da próstata, representando cerca de 9% de todos os casos

[32]. No entanto permanece por esclarecer se esta associação é resultado de susceptibilidade genética, da exposição a factores de risco comuns ou simplesmente do acaso.

Como referido anteriormente, a etnia também parece desempenhar um papel no desenvolvimento desta neoplasia. Apesar de existirem vários factores ambientais, genéticos e biológicos associados com o desenvolvimento de cancro da próstata, a variação nas taxas de incidência encontradas em todo o mundo também se deve às diferenças no acesso a técnicas de rastreio. No entanto, este parâmetro não explica por si só a diferença de risco de quase 60 vezes que existe entre populações de alto e baixo risco [21], sugerindo a existência de outros factores de risco ainda desconhecidos.

### 1.3.3 Patologia e História Natural

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino localizada abaixo da bexiga e que se encontra envolvida por uma cápsula fibrosa. Tem como principal função a secreção de um fluido alcalino para a uretra que confere protecção aos espermatozóides [33].

Esta glândula pode ser subdividida em quatro regiões: zona fibromuscular anterior; zona central, onde se desenvolvem 15-20% das neoplasias; zona periférica, onde se desenvolvem 70% das neoplasias; e zona de transição junto à uretra, na qual se desenvolvem 10-15% das neoplasias (Figura 4) [34].

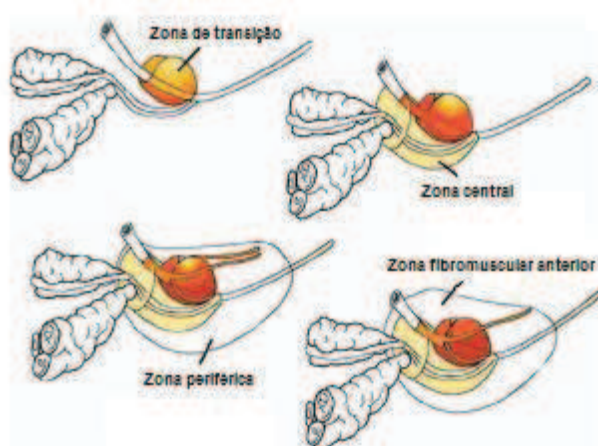


Figura 4 – Representação esquemática das diferentes zonas que constituem a próstata (adaptado de Greene *et al.*, 1992 [34])

Ainda está por esclarecer se esta categorização das diferentes zonas reflecte de algum modo as suas diferenças a nível funcional. Contudo, estas parecem apresentar características biológicas distintas, o que poderá justificar a diferença de percentagens de tumores desenvolvidos em cada região.

Ainda não se conhece muito acerca da história natural do cancro da próstata. Isto deve-se em parte ao facto de ser uma doença bastante heterogénea em relação à morfologia e ao comportamento biológico [34]. Uma das principais diferenças entre esta e outras neoplasias diz respeito à prevalência latente, sendo a sua incidência histológica bastante superior à manifestação clínica. Esta maioria de casos “silenciosos” sugere o envolvimento de diversas alterações genéticas necessárias para o desenvolvimento da doença agressiva [35].

Sabe-se que o desenvolvimento do cancro da próstata varia com o seu confinamento. Tumores de baixo grau, isto é, tumores que sejam alta ou moderadamente diferenciados e que estejam confinados, tendem a ter um curso mais lento. Em oposição, alguns tumores de alto grau progridem mais rapidamente para doença metastática [36-37]. Apesar dos tumores altamente diferenciados apresentarem taxas de progressão e mortalidade baixas, cerca de 15-20 anos após o diagnóstico verifica-se uma diminuição da sobrevivência global, sobrevivência livre de doença e sobrevivência livre de doença metastática, bem como um aumento da taxa de mortalidade [37]. Isto revela a importância do tempo no desenvolvimento de cancro da próstata, tempo este que oferece oportunidades de intervenções para alterar o curso natural da doença.

O adenocarcinoma é a forma mais comum de cancro da próstata, sendo diagnosticado em 95% dos casos. Os restantes incluem o carcinoma mucinoso, carcinoma fusocelular, carcinoma de pequenas células, carcinoma espinocelular, carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células em anel e carcinoma endometrióide [38].

Uma vez que a cápsula prostática funciona como uma barreira à expansão tumoral, as células malignas tendem a proliferar para o centro da própria glândula, produzindo assim sintomas detectáveis. Com a progressão da doença, as células desdiferenciam-se e migram para os tecidos adjacentes (vesículas seminais e bexiga) e/ou metastizam através do sistema linfático ou hematogéneo. No entanto, o curso clínico da doença varia bastante, sendo que alguns tumores permanecem localizados durante anos, enquanto outros podem metastizar sem qualquer sinal prévio de disseminação.

A maior parte dos casos de cancro da próstata são multifocais, isto é, existem múltiplos clones malignos independentes na mesma glândula. Estas lesões multicêntricas

estão normalmente presentes em diferentes zonas da próstata e apresentam diferentes graus [39-41]. Uma vez que as lesões multicêntricas podem ter características diferentes, não se consegue ter a certeza quanto às propriedades de um carcinoma identificado somente por uma amostra de biópsia, uma vez que esta não representa o estado da glândula inteira. Desta forma, apenas se consegue estabelecer um diagnóstico correcto quando a próstata é removida [41].

### 1.3.4 Rastreio e Detecção Precoce

A descoberta do antígeno específico da próstata (*PSA*) como biomarcador veio revolucionar o rastreio de cancro da próstata [42-43], afectando significativamente as taxas de incidência em todo o mundo. Apesar do teste do *PSA* ser aceite como um método de detecção precoce desta neoplasia, ainda existe alguma controvérsia quanto à sua utilização, devido principalmente às suas limitações na sensibilidade e na especificidade. Valores aumentados desta proteína ( $> 4$  ng/mL) podem estar associados a situações benignas como a hiperplasia benigna da próstata (HBP), prostatite, enfarte prostático, entre outros [43]. Assim, no sentido de melhorar a especificidade do *PSA* na detecção precoce de cancro da próstata, em especial para valores na faixa 4-10 ng/mL, foram propostas algumas alternativas, entre as quais a velocidade do *PSA* [44-45], a densidade do *PSA* [46], o *PSA* ajustado à idade [47] e as formas moleculares do *PSA* [48-51]. Estudos mais recentes mostraram que o tempo de duplicação do *PSA* parece estar relacionado com a progressão da doença após tratamento cirúrgico [52]. No entanto, e apesar de todas as alterações já referidas, continua a não existir um consenso quanto à efectividade do teste do *PSA* no rastreio do cancro da próstata.

O rastreio define-se como um processo de selecção, realizado com o objectivo de detectar formas precoces da doença em indivíduos assintomáticos, de forma a possibilitar intervenções mais precoces que conduzam à cura, diminuindo assim a morbilidade e a mortalidade [53]. Devido à controvérsia existente em torno do *PSA*, foram realizados dois grandes estudos internacionais randomizados: o *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial* (PLCO) e o *European Randomised study of Screening for Prostate Cancer* (ERSPC) [54-55]. À primeira vista, as conclusões destes dois estudos parecem ser contraditórias. Enquanto o PLCO demonstrou não existir qualquer benefício no rastreio com *PSA*, resultados do ERSPC sugerem uma redução de cerca de 20% na mortalidade por cancro da próstata. No entanto, uma análise atenta destes dois estudos

revela uma diferença importante no tipo de pesquisa efectuada. No ERSPC avaliou-se a eficácia do teste do *PSA*, ou seja, este estudo teve como objectivo verificar se o teste era capaz de reduzir a taxa de mortalidade por cancro da próstata comparativamente com a sua não realização. Já no PLCO avaliou-se a efectividade do mesmo teste, uma vez que o objectivo foi verificar se este era capaz de reduzir a taxa de mortalidade por cancro da próstata na prática clínica diária. Deste modo, pode dizer-se que enquanto os resultados do ERSPC se encaixam num “mundo ideal”, com circunstâncias controladas, os resultados do PLCO reflectem um “mundo real”, com condições comuns. O problema do excesso de diagnósticos também foi notório em ambos os estudos, razão pela qual continua a existir uma enorme controvérsia relativamente ao uso do teste do *PSA* no rastreio do cancro da próstata.

### 1.3.5 Diagnóstico e Tratamento

Como já foi anteriormente referido, o cancro da próstata apresenta uma grande variabilidade quanto ao seu comportamento biológico. Resultados clínicos mostraram que a combinação do toque rectal (DRE), dos níveis séricos do *PSA* e da ecografia transrectal (TRUS) da próstata constitui um bom meio de diagnóstico desta neoplasia em fases assintomáticas [38].

Existem algumas características que ajudam a prever a agressividade da doença: tamanho (volume relativo ou absoluto do tumor), grau histológico (classificação de Gleason), extensão local (atingimento da cápsula e/ou das vesículas seminais) e disseminação à distância (metastização).

O volume tumoral constitui um importante factor de previsão da sobrevivência, sendo no entanto bastante difícil de ser avaliado com rigor antes da cirurgia. O valor sérico do *PSA* constitui um bom marcador do volume do tumor, e quanto mais elevado for este nível, maior é a probabilidade de doença metastática [56].

Para a avaliação do grau histológico recorre-se a classificação de Gleason, um sistema que apesar de ter sido desenvolvido há mais de 40 anos, continua a ser o mais usado na prática clínica e na investigação em todo o mundo, representando deste modo um dos poucos indicadores de prognóstico bem estabelecidos para o cancro da próstata [57]. Este sistema mede o grau de diferenciação glandular e o modelo de crescimento do tumor relativamente ao estroma prostático, atribuindo um número de 1 (mais diferenciado) a 5 (menos diferenciado) aos diferentes padrões. Deve depois somar-se os

números do padrão primário (predominante) e do padrão secundário (o segundo mais comum), de modo a obter-se uma pontuação combinada que, para cada tumor, pode variar entre 2 e 10. Uma pontuação de 2, 3 ou 4 indica a presença de um tumor bem diferenciado; uma pontuação de 5 ou 6 indica um tumor moderadamente diferenciado; e uma pontuação de 8, 9 ou 10 indica um tumor pouco diferenciado; uma pontuação de 7 indica um tumor mais agressivo que um tumor moderadamente diferenciado mas menos letal que uma lesão pouco diferenciada [57]. Assim, quanto maior o grau de Gleason de um tumor, maior a probabilidade deste apresentar um comportamento agressivo.

Juntamente com o diagnóstico histopatológico, o estadiamento clínico também tem um papel na classificação da doença oncológica. O primeiro sistema clínico de estadiamento foi apresentado por Whitmore e Jewett. Posteriormente, foi introduzido o sistema TNM pelo *Committee of the International Union Against Cancer* (UICC) e recomendado pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) [58]. Este sistema tem como base a descrição anatômica da doença e baseia-se na valorização de três componentes: **T** – extensão do tumor primário; **N** – ausência ou presença de metástases nos gânglios linfáticos regionais; **M** – ausência ou presença de metástases à distância.

O estadiamento vai permitir depois a escolha do tratamento. A cirurgia é a única abordagem com potencial curativo, sendo apenas recomendada em doentes com uma esperança média de vida superior a 10 anos, que tenham tumores moderadamente diferenciados e estádios clínicos T1 ou T2. No caso de doença localmente avançada ou metastática, as opções passam pela radioterapia, quimioterapia e/ou hormonoterapia, deixando de ter intuito curativo e servindo apenas para atrasar a progressão tumoral [59].

A vigilância activa é uma abordagem válida para doentes com tumores localizados e de baixo ou médio grau que tenham uma esperança média de vida inferior a 10 anos [59]. Estes doentes são submetidos a testes de PSA e DRE regulares, poupando-os desta forma a tratamentos mais agressivos que lhes iriam reduzir substancialmente a qualidade de vida [60].

### 1.4 Biomarcadores

O cancro é uma doença que envolve alterações dinâmicas em diversos genes, modificando a sua expressão nas células tumorais. O estudo destes genes é assim de extrema importância, uma vez que poderão servir de marcadores moleculares na

identificação de diferentes tipos de cancro bem como ajudar no diagnóstico e prognóstico da doença.

Um dos objectivos dos testes de expressão genética é encontrar células tumorais, a partir das quais se possam extrair ácidos nucleicos ou proteínas, que sirvam de marcadores para uma doença. Desta forma, podem considerar-se três grupos de marcadores para a detecção de cancro da próstata: marcadores de ácido ribonucleico (RNA), marcadores de DNA e marcadores proteicos.

Uma vez que as características clínicas e o comportamento de um tumor são determinados por alterações genéticas específicas presentes nas células tumorais que se reflectem no padrão de expressão do mRNA, este parece ser uma boa ferramenta para uma melhor compreensão do desenvolvimento de cancro da próstata.

A centralidade do RNA nos processos celulares e regulação genética reflecte as suas propriedades bioquímicas e aparecimento precoce durante a evolução. A sua sequência linear torna-o uma fonte simples de informação genética. Por outro lado, a capacidade em formar estruturas secundárias e terciárias, “escondendo” certas sequências e expondo outras para serem reconhecidas facilita a sua interacção com outras moléculas [61].

Para efectuar análises de expressão genética, pode recorrer-se a várias metodologias tais como *microarrays*, *Northern blotting* e *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), sendo esta última a mais sensível, exacta e adaptativa [62].

O biomarcador ideal para cancro da próstata deve ser específico para o órgão, facilmente detectável em fluidos de fácil acesso e capaz de diferenciar entre tecido normal, HBP, neoplasia intraepitelial da próstata (PIN) e tecido prostático neoplásico. Deve ainda poder medir-se através de um ensaio reproduzível e com sensibilidade e especificidade elevadas.

O estudo da alteração da expressão genética no desenvolvimento de cancro da próstata é um desafio complexo. No entanto, a informação que se obtém de tais estudos é de elevada importância, uma vez que conduz a uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares adjacentes à doença, o que se irá reflectir no desenvolvimento de melhores métodos de diagnóstico e tratamento. Isto é particularmente importante para o cancro da próstata devido à sua heterogeneidade, bem como à grande variabilidade da sua progressão clínica, pois pode evitar o excesso de tratamento em casos desnecessários [63]. Deve também ter-se em conta a ligação existente entre as características genéticas de cada indivíduo e a repercussão a nível do seu

microambiente, que podem afectar a susceptibilidade para o desenvolvimento tumoral. A existência de polimorfismos em genes envolvidos em processos de conservação da integridade genómica pode comprometer a sua função, servindo por isso para identificar possíveis grupos de risco para a progressão do cancro da próstata.

### 1.4.1 Detecção de biomarcadores em amostras de urina

Desde 1869 que se tem conhecimento que as células tumorais são capazes de escapar do local do tumor primário, podendo ser detectadas em diferentes fluidos do corpo humano [64].

No que diz respeito a amostras biológicas para estudos de expressão genética, pode dizer-se que o sangue tem sido a escolha mais frequente. Isto deve-se a várias razões, em particular ao facto de este fluido se encontrar distribuído por todo o corpo humano, o que faz com que esteja exposto a todos os órgãos e por conseguinte a uma variedade enorme de moléculas envolvidas no processo de carcinogénese.

No entanto, têm-se vindo a desenvolver, nos últimos anos, vários estudos para identificação de novos biomarcadores, tais como proteínas, metabolitos e transcritos genéticos, em diferentes tipos de amostras, incluindo soro, tecidos e urina.

A utilização de amostras de urina apresenta várias vantagens. Comparativamente com o sangue, pode dizer-se que este tipo de amostra é mais estável, uma vez que a sua actividade molecular não se altera significativamente após a recolha e armazenamento. Outra grande vantagem tem a ver com a sua obtenção, uma vez que não apresenta qualquer tipo de invasividade para o doente, estando disponível em grandes quantidades [65-67]. Para além disso, uma vez que os fluidos prostáticos são libertados para o sistema urinário, este tipo de amostra pode ser usada para detectar células tumorais esfoliadas ou secreções prostáticas, que poderão depois servir na identificação de possíveis biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico [68] (Figura 5).

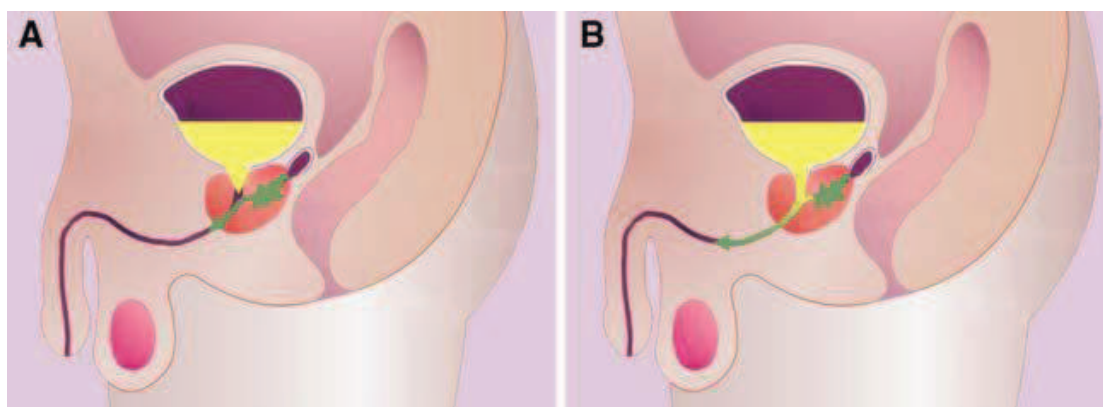


Figura 5 – Representação esquemática da passagem de secreções prostáticas para o sistema urinário. **(a)** As secreções prostáticas que contêm informação tumoral específica (*verde*) são emitidas para o sistema urinário (*seta verde*); **(b)** As secreções são depois recolhidas juntamente com a urina (*amarelo*), aumentando a sua concentração em genes específicos da próstata (Schiffer E, 2007 <sup>[68]</sup>)

Actualmente encontra-se apenas disponível um teste para detecção, em urinas, de um biomarcador para cancro, o gene 3 do cancro da próstata (*PCA3*). Apesar de ainda não estar aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), este teste genético pode ser realizado em algumas instituições em diversos países, servindo de complemento ao teste do *PSA* uma vez que é capaz de identificar quais os casos que devem ser submetidos a biópsia [69].

Outra abordagem a ter em conta é a utilização de vários biomarcadores em detrimento de um único, a fim de se identificar uma possível “assinatura genética” da doença. Isto é especialmente importante para o caso do cancro da próstata devido à sua enorme heterogeneidade. Um estudo recente conduzido por Laxman e colaboradores comprovou esta teoria, tendo sido verificada uma associação entre os níveis de expressão de diversos genes e o desenvolvimento de cancro da próstata [70].

Em suma, a urina tem vindo a revelar-se como um potencial tipo de amostra biológica para estudos de expressão genética, sublinhando a importância do seu estudo no desenvolvimento de diversas doenças, nomeadamente no cancro da próstata.

#### 1.4.1.1 PSA

Actualmente utilizado como marcador no diagnóstico de cancro da próstata, o *PSA* foi inicialmente descoberto na década de 70, existindo alguma controvérsia quanto à identidade dos seus autores. Isto deve-se ao facto desta proteína se encontrar presente

## 1. INTRODUÇÃO

no sêmen e também no tecido prostático, o que fez com que se lhe atribuíssem nomes diferentes aquando das descobertas independentes. Deste modo, pode dizer-se que a descoberta do *PSA* resultou de diversos estudos, tendo sido sugerido pela primeira vez como marcador para cancro da próstata por Stamey e colaboradores em 1987 [71].

Esta glicoproteína de cadeia simples pertencente à família das Kalicrinas, apresenta um peso molecular de 33 kD e localiza-se no cromossoma 19q13.41. Com uma intensa actividade proteolítica, é capaz de clivar rapidamente a semenogelina (principal proteína estrutural do coágulo seminal), provocando a sua liquefacção [72-73].

Devido à estreita ligação entre o *PSA* e o cancro da próstata, desenvolveram-se testes para detectar esta proteína no sangue, a fim de identificar a doença [74]. Esta detecção é possível devido à destruição da membrana basal do epitélio glandular, que possibilita a migração do *PSA* para a corrente sanguínea [75]. Como já foi anteriormente referido deve ter-se em conta que apesar do *PSA* ser específico em relação ao órgão, não é específico para cancro, podendo estar associado a diversas situações benignas. Isto compromete a sua utilização como biomarcador, uma vez que irá afectar os valores de sensibilidade e especificidade, como se pode ver na Tabela 1.

Quadro I: Comportamento do *PSA* em homens assintomáticos com resultados normais de DRE (Adaptado de Ribeiro FR, 2006)

| Nível do <i>PSA</i><br>(ng/mL) | Probabilidade<br>de cancro na<br>biopsia | Sensibilidade<br>média (%) | Especificidade<br>média (%) | Valor<br>preditivo<br>positivo<br>médio (%) | Valor preditivo<br>negativo<br>médio (%) |
|--------------------------------|------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|
| 0.0 – 2.4                      | Indeterminada                            | 95%                        | 20%                         | 11%                                         | > 95%                                    |
| 2.5 – 4.0                      | 12 – 23%                                 | 85%                        | 35%                         | 23%                                         | > 95%                                    |
| 4.1 – 10                       | 25%                                      | 71%                        | 75%                         | 37%                                         | 91%                                      |
| > 10                           | > 50%                                    | 56%                        | 77%                         | 47%                                         | 88%                                      |

### 1.4.1.2 PCA3

O gene *PCA3*, também conhecido como *DD3*, é um gene específico da próstata que apresenta uma super expressão em tecidos com cancro da próstata [76]. Este gene

encontra-se no cromossoma 9q21.2 e apresenta uma elevada densidade de codões stop, o que faz com que não possua uma grelha de leitura resultando assim num mRNA não codificante [69].

Ainda se desconhece a função deste gene, mas pensa-se que poderá estar envolvido na regulação da expressão de outros genes ou no processo de *splicing* genético [77]. Estudos de *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (Real-Time PCR) sugerem que o *PCA3* poderá servir de biomarcador na detecção de cancro da próstata, ajudando na redução de biópsias desnecessárias. Este gene apresenta altos valores de sensibilidade e especificidade, com uma super-expressão em 95% dos casos de tumores primários e metastáticos [69]. Ao contrário do *PSA*, o *PCA3* não aumenta a sua expressão em situações benignas. Por outro lado, estudos anteriores revelaram que este gene não aparece expresso em outras situações malignas [76, 78-79]. Deste modo, o *PCA3* apresenta uma maior especificidade enquanto biomarcador da doença. Estudos mais recentes sugerem, no entanto, que a detecção destes dois genes em conjunto representa o melhor método de diagnóstico para o cancro da próstata [80].

Clinicamente, o mRNA do *PCA3* pode ser detectado na urina e no fluido prostático de homens com cancro da próstata, apresentando níveis mais elevados em tumores mais agressivos. Estes níveis são no entanto independentes do volume prostático e do valor sérico do *PSA* [81]. Até à data, este é o único gene para o qual se comercializou um teste de detecção em urinas para doentes com cancro da próstata [82-85].

### 1.4.1.3 AMACR

A  $\alpha$ -metilacil Co-enzima A racemase (*AMACR*) foi inicialmente identificada em estudos de *microarrays* [86-88] e localiza-se no cromossoma 5p13. Este gene parece estar envolvido na conversão de estereoisómeros R de ácidos gordos de cadeia ramificada em estereoisómeros S (processo de racemização), que podem depois ser degradados por  $\beta$ -oxidação peroxisomal [89-91]. Nestes estudos, foi possível verificar uma maior expressão do gene em casos de cancro da próstata, comparativamente com tecidos normais. Estudos posteriores revelaram que este aumento de expressão ocorre a nível proteico [92-96].

De uma forma geral, este gene encontra-se expresso em mais de 90% dos cancros. Contudo, parece existir uma sobreposição entre amostras neoplásicas e benignas já que algumas amostras benignas expressam *AMACR*, enquanto alguns

cancros não expressam este marcador [97]. Apesar deste problema, estudos de imunohistoquímica que usam o *AMACR* juntamente com outros marcadores parecem ter bastante utilidade no diagnóstico de cancro da próstata [92, 98-103], sendo possível a detecção deste gene em amostras de urina, tanto a nível de mRNA como a nível proteico [104]. Um estudo realizado em 2009 demonstrou que a utilização do *AMACR*, em conjunto com o *PSA* em amostras de urina de doentes com cancro da próstata, constitui uma boa ferramenta para a detecção da doença em indivíduos com biópsia negativa, apresentando uma sensibilidade de 100% e especificidade de 87,5% [105]. Estudos anteriores sugerem ainda uma redução da expressão deste gene em casos de doença metastática [93, 95, 97, 102].

### 1.4.1.4 *TFF3*

O gene 3 da família de factores *Trefoil* (*TFF3*) foi inicialmente descoberto em 1991 [106]. Localiza-se no cromossoma 21q22.3 e apresenta um domínio *trefoil* (do inglês trevo) que consiste num péptido compacto com 42-43 aminoácidos, com 6 resíduos de cisteína que formam 3 ligações de sulfido, criando assim a estrutura característica de três folhas de onde o nome deriva [107]. A sua estrutura estável faz com que este gene seja resistente à degradação proteolítica do intestino e do estômago [108], onde se encontra mais expresso.

De entre as suas diversas funções destacam-se a participação no processo de homeostase e a interacção com mucinas para estabilizar a barreira de muco e proteger a mucosa contra vários danos [109-110], bem como a capacidade anti-apoptótica [111].

O papel desta família de genes no desenvolvimento e progressão tumoral tem vindo a ser estudado por diversos investigadores, que sugerem possíveis capacidades angiogénicas e pró-invasivas por parte do *TFF3* [112]. Estudos anteriores revelaram uma elevada expressão deste gene em doentes com cancro da próstata [113-114], existindo no entanto algumas dúvidas quanto à sua detecção em amostras de urina, devido aos baixos valores de especificidade apresentados [70].

Alguns estudos revelaram um aumento de expressão do *TFF3* em diversas doenças associadas ao sistema gastrointestinal, incluindo bastantes tumores [115-120], revelando a crescente importância do seu estudo no desenvolvimento e progressão tumoral.

#### 1.4.1.5 SERPINB5

As serpinas (do inglês **serine protease inhibitors**) são um grupo proteico envolvido em vários processos biológicos fundamentais, nomeadamente na fibrinólise, inflamação, angiogénese, diferenciação e motilidade celular e apoptose [121-122]. Esta superfamília encontra-se dividida em vários subgrupos, entre os quais se encontra a classe *SERPINB*, que foi descoberta em 1993 devido às suas semelhanças aminoacídicas com a ovalbumina [123].

Um dos membros desta classe é o gene *SERPINB5* (do inglês *serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5*), também denominado de maspina, que foi originalmente isolado em 1994 [124]. Este gene é composto por 2584 nucleótidos que codificam um péptido de 42kD e localiza-se no cromossoma 18q21.3-q23 [125]. O modelo de Benarafa e Remold-O'Donnell sugere que este gene é uma das serpinas da classe B mais antigas [126], sendo o único cuja deficiência pode ser letal em fases iniciais da embriogénese [127], o que sugere que a sua função não pode ser compensada por outras serpinas.

Actualmente pouco se sabe acerca da função e dos mecanismos biológicos da maspina. Vários estudos sugerem um envolvimento deste gene nas fases iniciais da progressão tumoral, uma vez que aparece frequentemente mais expresso em lesões pré-cancerígenas e tumores de baixo grau [128-129]. Pensa-se que a maspina tem um papel de gene supressor tumoral devido às diferenças no padrão de expressão em vários tumores. Estudos funcionais mostraram que há uma inibição da progressão tumoral e do aparecimento de metástases em ratinhos transfectados com linhas celulares de cancro da mama que expressavam maspina [130], demonstrando que este gene é capaz de inibir a invasão da matriz da membrana basal em culturas celulares, bem como diminuir a motilidade celular [130-131]. Sabe-se ainda que a maspina se encontra expressa em resposta a diversos sinais de stress, contribuindo deste modo para o mantimento das condições de homeostase.

Tendo em conta que a maspina pode ser regulada directamente pela proteína p53, uma maior expressão do gene pode tornar as células mais sensíveis à apoptose. De facto, células tumorais que sejam induzidas a expressar maspina exibem uma maior resposta apoptótica a diversos fármacos *in vitro* [132-133]. Este efeito pró-apoptótico parece estar também associado com um aumento da expressão do gene *BAX*, um gene pró-apoptótico pertencente à família de genes Bcl-2, sendo funcionalmente mediado por este [133].

É interessante verificar que a localização da maspina parece estar relacionada com a sua função, uma vez que em certos casos pode ser indicativa de uma lesão neoplásica. Estudos anteriores sugerem que uma localização citoplasmática da maspina poderá estar associada com um pior prognóstico, enquanto que uma localização nuclear é indicativa de lesões benignas, sugerindo um papel de gene supressor tumoral para a maspina nuclear [128, 134-135].

Relativamente ao cancro da próstata, estudos anteriores tentaram relacionar a perda de expressão da maspina com a progressão tumoral [136-137]. Para além disso, a perda deste gene parece estar associada com tumores de alto grau [138]. Estudos mais recentes demonstraram que a maspina é necessária para a inibição da inflamação induzida pelo cancro da próstata [139-140]. Luo e colaboradores identificaram uma nova via de activação da inflamação necessária para a metastização de tumores da próstata [141] que requer a inibição da transcrição da maspina [139], o que comprova que a sua função de gene supressor tumoral. Deste modo, é altamente provável que alguns doentes com cancro da próstata possam ter mutações, deleções ou outras alterações epigenéticas no gene da maspina que afectem a sua expressão. A detecção deste gene em amostras de urina de doentes com cancro da bexiga revelou um aumento significativo da expressão [142], sublinhando a importância deste tipo de estudo para diferentes neoplasias.

### 1.4.1.6 **GOLM1**

O gene *GOLM1* (do inglês *golgi membrane protein 1*) localiza-se no cromossoma 9q21.33 e codifica uma proteína denominada GOLPH2 ou GP73, cuja função se desconhece. No entanto, e devido à sua localização no aparelho de Golgi, supõe-se que este gene esteja envolvido em processos de modificação de proteínas, sinalização celular e transporte intracelular. A sua super-expressão foi inicialmente descoberta em hepatócitos de doentes com hepatite crónica e cancro hepatocelular [143].

Esta proteína tem um terminal N citoplasmático mais curto, alguns domínios enrolados e um terminal C luminal mais longo. A clivagem do terminal N resulta na libertação do terminal C, tornando possível a detecção do gene no soro [144]. Esta forma clivada do *GOLM1* foi detectada em doentes com cancro hepatocelular, sendo por isso uma ferramenta bastante útil aquando do diagnóstico [145].

Estudos anteriores sugerem uma maior expressão do *GOLM1* em tecidos com cancro da próstata [86, 146]. Também foi possível detectar transcritos deste gene em amostras de urinas provenientes de doentes com cancro da próstata, revelando ser um potencial marcador, juntamente com outros genes, para esta neoplasia [70].

Uma vez que existem tão poucos estudos sobre o *GOLM1*, ainda se desconhece se este poderá ser específico para certos tipos de tumores. Este gene poderá estar envolvido no mecanismo de carcinogénese de uma forma geral, como é o caso da p53. No entanto é mais provável que assuma uma posição secundária, não estando directamente relacionado com o desenvolvimento neoplásico, devido à falta de informação que identifique mutações neste gene em doentes oncológicos.

### 1.4.1.7 ERG

O primeiro evento de translocação em cancro da próstata foi inicialmente descrito em 2005 e envolve um gene da família de factores de transcrição ETS denominado *ERG* (do inglês *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene like (avian)*), localizado no cromossoma 21q22.2 [147]. Este pode aparecer fundido com o gene *TMPRSS2*, localizado no cromossoma 21q22.3, através de uma translocação ou de uma deleção intersticial [147]. O resultado é um gene de fusão denominado *TMPRSS:ERG*, que aparece em cerca de 50% a 70% dos carcinomas localizados e em cerca de 40% dos tumores metastáticos androgénio-independentes [147-150].

Estudos anteriores revelaram uma associação entre a expressão do *ERG* e fenótipos de HBP, bem como PIN [151-152], sugerindo um possível papel deste gene na iniciação tumoral. No entanto, estudos moleculares e com ratinhos revelaram uma associação entre a super-expressão do *ERG* e a estimulação das propriedades invasivas, sem qualquer efeito sobre a proliferação celular [152]. Estes dados apontam para um possível papel oncogénico do *ERG* não na iniciação tumoral mas sim em etapas posteriores, nomeadamente na metastização. Por outro lado, dois estudos recentes demonstraram que a super-expressão do *ERG* por si só não é suficiente para o desenvolvimento de cancro da próstata, parecendo existir uma relação deste gene com o gene supressor tumoral *PTEN*, cujas alterações resultam na iniciação tumoral [153-154].

Ainda há alguma controvérsia relativamente ao papel do gene de fusão *TMPRSS:ERG* no desenvolvimento e progressão de cancro da próstata. Alguns estudos sugerem que a presença deste gene de fusão está associada com um pior *outcome* [155-

157] e que a expressão específica do *ERG* se relaciona com uma doença mais agressiva [158]. Já outros estudos sugerem que estas alterações cromossómicas por si só não estejam relacionadas com os *outcomes*, mas que o aumento do número de cópias do gene resultante das alterações cromossómicas seja responsável pela progressão tumoral [159].

Um estudo realizado por Hessels e colaboradores revelou uma sensibilidade de 73% na detecção de cancro da próstata a partir de amostras de urinas, combinando a utilização do gene de fusão *TMPRSS:ERG* e do *PCA3* [160].

O gene *ERG* parece ainda estar envolvido no desenvolvimento de outras neoplasias, nomeadamente no sarcoma de Ewing [161] e em alguns casos de leucemia [162-163], revelando a importância do estudo deste gene.

### 1.4.2 Detecção da variante genética -8360G>C no gene da nibrina

O gene da nibrina (*NBN*), também conhecido como *NBS1*, localiza-se no cromossoma 8q21. Pouco se conhece acerca da estrutura deste gene, sabendo-se apenas que possui um domínio denominado *forkhead associated* (FHA) na região N-terminal responsável pelo reconhecimento de aminoácidos fosforilados em diversas proteínas, e um domínio *breast cancer C-terminal* (BRCT) que parece estar envolvido na mediação de interações proteicas [164-165]. Ambos os domínios são frequentemente observados em proteínas envolvidas na resposta a danos no DNA, sendo por isso considerados potencialmente funcionais.

Juntamente com mais dois genes, o *NBN* constitui o complexo MRN, que parece estar envolvido na reparação das quebras de cadeia dupla do DNA, na conservação da integridade dos telómeros, no controlo dos *checkpoints* do ciclo celular e no processo de meiose [166]. A subunidade Mre11 confere actividade endonuclease e exonuclease ao complexo, enquanto a Rad50 está envolvida nos processos de recombinação de DNA. Por seu lado, o *NBN* é responsável pela detecção de danos na cadeia dupla de DNA e posterior estimulação de uma resposta apropriada, recrutando para tal diversos membros envolvidos na reparação de danos no DNA, como é o caso das proteínas ATM e ATR, e mobilizando-os para os locais danificados [167], apresentando desta forma uma função de gene supressor tumoral. Mutações no gene *NBN* estão ainda associadas com a síndrome Nijmegen Breakage (SNB), uma doença autossómica recessiva, causada por

uma instabilidade cromossômica, e caracterizada por microcefalia, atraso no crescimento, imunodeficiência e predisposição para cancro [168].

No entanto, têm sido apontadas outras funções para o gene *NBN*, estando algumas relacionadas com o processo de proliferação celular e possível carcinogénese. Esta capacidade de indução da proliferação é sugerida pela expressão do gene em tecidos altamente proliferativos [169], tendo sido ainda proposta uma associação com a taxa de proliferação de fibroblastos em ratinhos onde o gene se encontrava mutado [170]. Estudos anteriores indicam que uma elevada expressão deste gene pode contribuir para a transformação celular através da activação da via fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K)/Akt, que por sua vez induz a transformação através do aumento da proliferação celular e inibição da apoptose, fosforilando as suas proteínas alvo a jusante [171].

Desta forma, tanto a elevada como a baixa expressão do *NBN* pode conduzir a eventos de carcinogénese, através de diferentes mecanismos. A figura 6 visa representar a dicotomia gene supressor tumoral *versus* oncogene de que é alvo o gene, apresentando as diferentes vias em que pode estar envolvido.

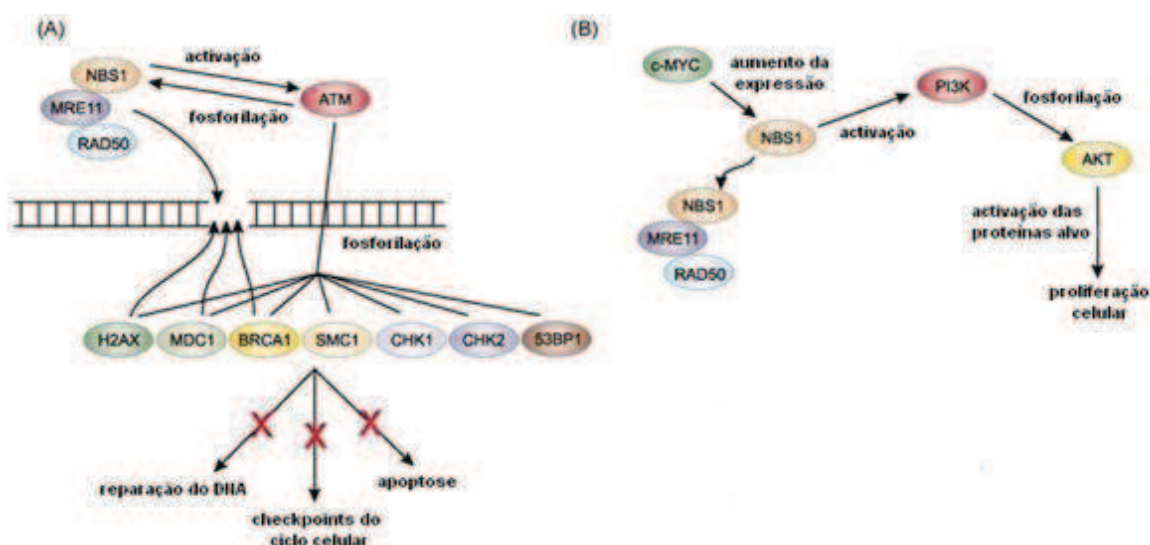


Figura 6 – Representação esquemática das diferentes vias em que o *NBN* pode estar envolvido. (A) Uma baixa expressão do *NBN* conduz a uma diminuição da actividade do complexo MRN e do *ATM*, resultando na diminuição da fosforilação das proteínas a jusante, o que irá afectar processos fundamentais como a reparação do DNA e o controlo de *checkpoints* do ciclo celular e da apoptose. (B) O gene *MYC* aumenta a expressão do *NBN*, que por sua vez activa a via oncogénica PI3K/Akt, conduzindo ao aumento da proliferação celular e consequente desenvolvimento tumoral (adaptado de Dzikiewicz-Krawczyk A, 2008 <sup>[172]</sup>)

O gene *NBN* apresenta vários polimorfismos, sendo um dos mais estudados o *NBN-8360G>C* (Glu185Gln; E185Q; rs1805794), que resulta na substituição de um ácido glutâmico por uma glutamina no exão 5. Este polimorfismo localiza-se no domínio BRCT, que auxilia a interacção do *NBN* com o *BRCA1*, formando o complexo de vigilância do genoma associado ao *BRCA1* (BASC), responsável pelo reconhecimento e reparação de DNA defeituoso [173].

Estudos anteriores revelam uma possível associação entre este polimorfismo e mutações da p53 em doentes com cancro do pulmão, tendo sido também relacionado com diversas outras neoplasias, nomeadamente cancro renal, cancro da mama e cancro do colo uterino, sublinhando a importância do *NBN* no desenvolvimento tumoral [174-177]. Existem no entanto resultados contraditórios relativamente à influência deste polimorfismo na susceptibilidade para cancro [174, 178-179], não se tendo ainda conseguido definir o seu impacto a nível funcional, o que reforça a importância do seu estudo e caracterização.

## 2. OBJETIVOS



### 2.1 Objectivos gerais:

- Avaliar a influência da expressão dos genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG* no desenvolvimento de cancro da próstata a partir de amostras de urina;
- Avaliar a influência do polimorfismo *NBN-8360G>C* na progressão do cancro da próstata, e na expressão do gene *NBN*.

### 2.2 Objectivos específicos:

- Avaliar o uso de urinas enquanto amostras biológicas em estudos de expressão genética;
- Optimizar um procedimento laboratorial para utilização de urinas enquanto amostras biológicas para estudos de expressão genética;
- Analisar a expressão dos genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG* em indivíduos com cancro da próstata e indivíduos com patologia benigna, e avaliar a susceptibilidade para o desenvolvimento tumoral;
- Distinguir subgrupos de doentes com diferentes características clínico-patológicas com base nas diferenças de expressão dos genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG*, individualmente e em combinação;
- Identificar possíveis biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico para o desenvolvimento de cancro da próstata;
- Analisar a frequência do polimorfismo *NBN-8360G>C* em indivíduos com cancro da próstata avançado e localizado;

## 2. OBJECTIVOS

---

- Avaliar a associação do polimorfismo *NBN-8360G>C* com características clínico-patológicas dos doentes com cancro da próstata;
- Avaliar a influência do polimorfismo *NBN-8360G>C* na expressão da nibrina, em doentes com cancro da próstata.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS



### **3.1 Análise da expressão dos genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG* em amostras de urina**

#### **3.1.1 Caracterização da população**

As amostras incluídas neste estudo, escolhidas de forma aleatória, são provenientes de indivíduos portugueses e foram utilizadas com o seu conhecimento e consentimento prévio, de acordo com a declaração de Helsínquia. Para a análise da expressão dos genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG* foram utilizadas amostras urinas de sessenta e sete (67) doentes, das quais dez (10) foram recolhidas após aplicação de massagem prostática e cinquenta e sete (57) foram recolhidas sem massagem prostática. Este segundo grupo foi dividido em duas categorias, de acordo com o diagnóstico: trinta e dois (32) dos indivíduos, com uma idade média de  $65,19 \pm 7,4$  anos, manifestavam sinais de doença prostática não oncológica e vinte e cinco (25) indivíduos, cuja idade média era de  $69,16 \pm 7,4$  anos apresentavam doença oncológica.

#### **3.1.2 Procedimentos laboratoriais**

##### **3.1.2.1 Optimização do procedimento laboratorial**

Como já foi referido anteriormente, a utilização de urinas enquanto amostras biológicas para estudos de expressão genética é uma abordagem relativamente recente, o que faz com que ainda não estejam estabelecidos procedimentos laboratoriais universais para este tipo de amostra. Desta forma, um dos objectivos do trabalho passou pela optimização de um procedimento que permitisse este tipo de estudo, utilizando-se para isso dezasseis (16) amostras provenientes de dadores. Estas amostras serviram para testar algumas variáveis, nomeadamente os tipos de conservação das células obtidas e de extracção de RNA, entre outras (Figura 7).

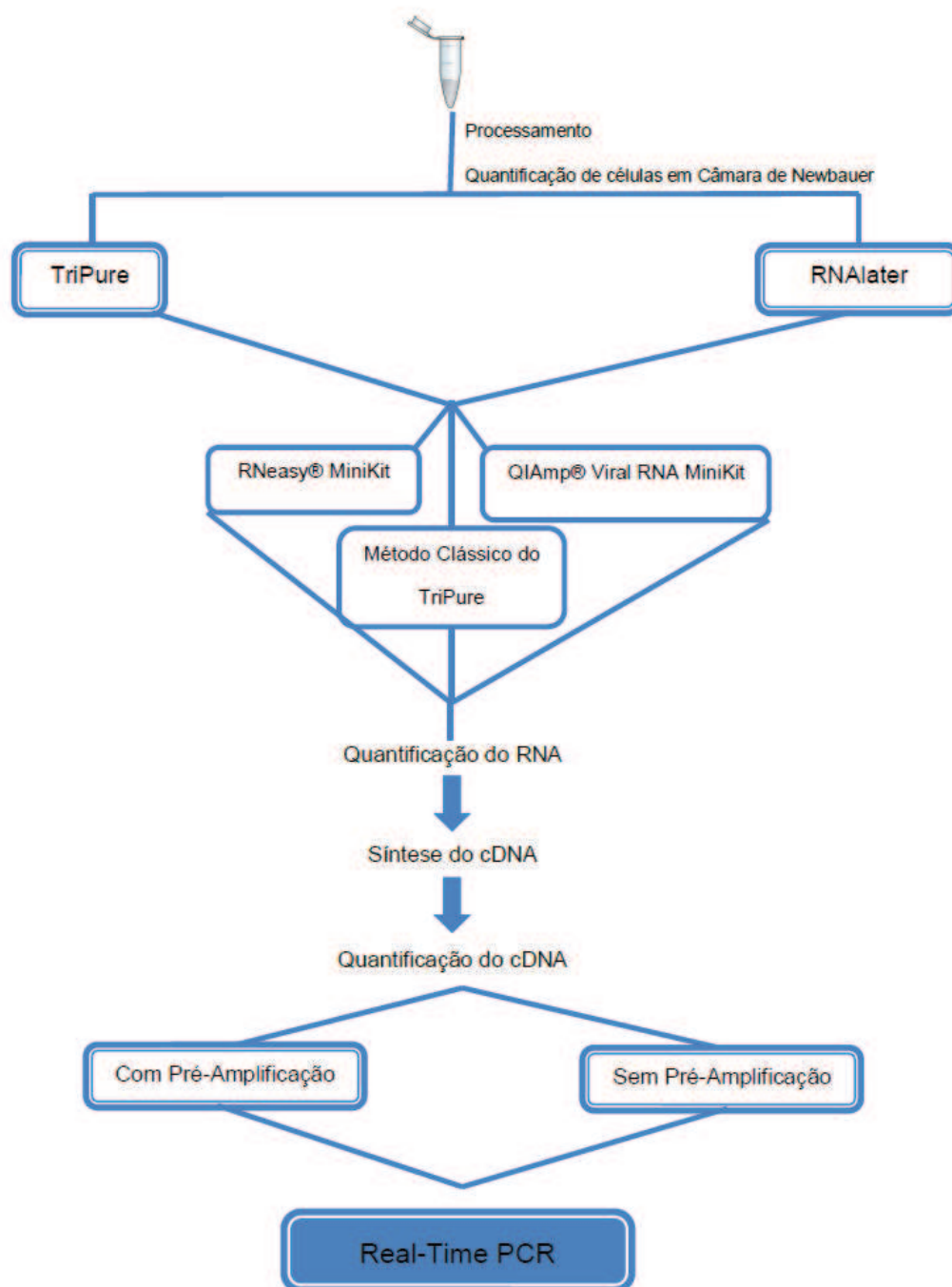


Figura 7 – Representação esquemática dos passos efectuados para a optimização do procedimento de amostras de urinas para estudos de expressão genética.

Relativamente ao tipo de conservação, testaram-se duas soluções de conservação celular: *RNAlater* (Ambion, Cat. #AM7020) e *TriPure* Isolation Reagent (Roche Applied Science, Cat. Nº 11 667 165 001). Este é um passo de extrema

importância para evitar a degradação do RNA, uma vez que esta iria afectar os níveis de expressão genética. A principal diferença entre as duas soluções testadas é que enquanto o RNA $\text{later}$  serve unicamente para estabilizar o RNA e manter a sua integridade, o TriPure promove ainda a lise celular. Deste modo, foi necessário efectuar um passo de lise celular para as amostras armazenadas em RNA $\text{later}$ , que foi conseguido com o instrumento MagNA Lyser (*Roche Applied Science*) (**Anexo I**)

Em seguida testaram-se várias metodologias diferentes para extracção de RNA: os *kits* comerciais RNeasy® Mini Kit (Qiagen® 74106; **Anexo II**) e Qiamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen® 52904; **Anexo II**), e ainda o método clássico de extracção a partir do TriPure. Uma vez que as amostras utilizadas neste trabalho seriam urinas obtidas sem massagem prostática, testou-se ainda um *kit* de pré-amplificação, TaqMan® PreAmp Master Mix (*Applied Biosystems*<sup>TM</sup> 4391128), de forma a tentar facilitar a detecção da expressão dos genes em estudo. Por fim analisou-se a expressão dos vários genes em todas as amostras, por Real-Time PCR e verificou-se que a melhor opção seria conservar as amostras em TriPure e realizar a extracção de RNA através do método clássico do TriPure. Relativamente à utilização do *kit* de pré-amplificação, constatou-se não ser relevante, uma vez que não se verificou qualquer alteração dos níveis de expressão dos genes nas amostras pré-amplificadas comparativamente com as restantes.

Assim, os pontos abaixo sumarizam todos os procedimentos utilizados para as amostras dos doentes incluídos neste estudo.

#### 3.1.2.2 Recolha das amostras

Foram recolhidas amostras de urina de todos os participantes do estudo, as quais foram centrifugadas a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 20 minutos. Em seguida, descartaram-se os sobrenadantes e lavaram-se os *pellets* de células em 30 mL de PBS (**Anexo III**), procedendo-se a uma nova centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos. Obtiveram-se *pellets* após o descarte dos sobrenadantes, os quais foram analisados ao microscópio óptico para se proceder à contagem das células (**Anexo II**). Esta contagem permitiu depois ajustar o volume de TriPure a adicionar a cada *pellet* obtido, de forma a promover uma lise celular eficaz.

#### 3.1.2.3 Extracção do RNA

O RNA foi isolado a partir dos *pellets* conservados em TriPure através do método clássico do TriPure. Para tal, utilizaram-se 500 µL de amostra, aos quais se adicionaram 100 µL de uma solução de clorofórmio. Homogeneizou-se a solução por meio de agitação no vórtex durante cerca de 15 segundos e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. De seguida centrifugaram-se as amostras a 10 000 rpm, durante 15 minutos e à temperatura de 4 °C, de forma a promover a separação dos diferentes componentes em fases distintas: uma fase orgânica avermelhada constituída por proteínas, seguida de uma fase intermédia branca formada por DNA e finalmente um fase aquosa superior que contém RNA. Procedeu-se então à transferência desta fase aquosa para um novo *ependorf*, ao qual se adicionaram 250 µL de uma solução de isopropanol, de forma a provocar a precipitação do RNA, e deixaram-se repousar as soluções durante cerca de 10 minutos à temperatura ambiente. Neste passo adicionou-se ainda 1 µL de glicogénio, que serviu de *carrier* à reacção, ajudando na precipitação do RNA e aumentando o rendimento da reacção. Em seguida centrifugaram-se as amostras a 10 000 rpm, durante 10 minutos e à temperatura de 4 °C, removeu-se novamente o sobrenadante de cada uma e efectuou-se a lavagem dos *pellets*. Para tal, utilizaram-se 500 µL de uma solução de etanol a 75% (v/v) e homogeneizaram-se as amostras por meio de agitação no vórtex, ao que se seguiu nova centrifugação a 6 500 rpm, durante 5 minutos e à temperatura de 4 °C. Após descartar o sobrenadante efectuou-se nova lavagem, nas mesmas condições. Por fim, deixaram-se secar os *pellets* durante aproximadamente 5 minutos, à temperatura ambiente, e dissolveram-se os mesmos em 15 µL de uma solução de água livre de RNase (Qiagen® 129112).

#### 3.1.2.4 Quantificação do RNA

A quantidade e pureza do RNA foram determinadas recorrendo ao espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000, *ThermoScientific*). Este aparelho utiliza a tensão superficial para manter a amostra localizada, permitindo assim a leitura do seu espectro de absorvâncias. Estes valores são depois traduzidos para valores de densidade óptica (DO) com base na expressão  $DO = \log(I_0/I)$ , em que  $I_0$  corresponde à intensidade da luz incidente e  $I$  refere-se à intensidade da luz transmitida através da amostra. Uma vez que os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260

nm, a concentração de RNA é estimada através da relação  $1 \text{ DO}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g}$  de RNA. O *software* do programa fornece no final os valores finais da concentração de RNA.

Outra informação que se obtém são os valores das absorvâncias a 280 nm e a 230 nm, visto estes comprimentos de onda corresponderem aos picos de absorvância das proteínas e de outros compostos, respectivamente. Desta forma, através dos rácios de absorvâncias 260/280 e 260/230 é possível avaliar a qualidade do RNA das amostras, sendo o valor de referência para ambas as razões próximo de 1,8.

#### 3.1.2.5 Síntese do cDNA

Para a síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) recorreu-se ao *kit* ThermoScript™ RT-PCR System (*Invitrogen*, Cat nº 11146-024). Começou por se ajustar a concentração das amostras de RNA previamente obtidas para cerca de 100 ng/ $\mu\text{L}$ , de forma a otimizar o rendimento da reacção. Pipetaram-se de seguida 2  $\mu\text{L}$  de RNA para um *ependorf*, ao qual se adicionaram 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10mM) e 1  $\mu\text{L}$  de *primers* aleatórios (Oligo(dT)<sub>20</sub> a 50  $\mu\text{M}$ ), perfazendo um volume final de 12  $\mu\text{L}$  com água bi-destilada. Em seguida procedeu-se à desnaturação do RNA e dos *primers*, incubando as amostras a 65 °C durante 5 minutos, à qual se seguiu um choque térmico com gelo.

Preparou-se uma solução contendo 4  $\mu\text{L}$  de tampão de síntese de cDNA (5x) (previamente homogeneizado por agitação no vórtex), 1  $\mu\text{L}$  de ditioneitol (DTT) (0,1 M), 1  $\mu\text{L}$  de RNase Out™ (40 U/  $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de água tratada com DEPC e 1  $\mu\text{L}$  de transcriptase reversa (15 U/  $\mu\text{L}$ ), a qual se adicionou às amostras desnaturadas previamente. Incubaram-se depois as amostras num termociclador programado para as submeter a uma temperatura de síntese de cDNA de 50 °C durante 45 minutos, ao qual se seguiu um passo de 5 minutos a 85 °C. Adicionou-se posteriormente 1  $\mu\text{L}$  de RNase H e incubaram-se as amostras a 37 °C durante 20 minutos. No final, guardaram-se as amostras de cDNA a -20 °C para posterior utilização.

#### 3.1.2.6 Quantificação do cDNA

Para a quantificação do cDNA recorreu-se novamente à técnica de espectrofotometria, utilizando o aparelho NanoDrop® ND-1000. O princípio do método é o mesmo referido anteriormente, com a diferença que para o caso de DNA, um valor de

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

DO a 260 nm equivale a 50 µg de DNA. Também neste caso se mediram as razões 260/280 e 260/230, de forma a avaliar o grau de pureza do cDNA.

#### 3.1.2.7 Análise da expressão genética por Real-Time PCR

Avaliou-se a expressão dos genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG* através de quantificação relativa por Real-Time PCR (*Applied Biosystems StepOne™*). Este método utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz proveniente da reacção de amplificação. Para tal, utilizam-se sondas específicas para um dado gene, que apresentam um fluorocromo na posição 5' e um quencher na posição 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade entre o *quencher* e o fluorocromo diminui significativamente a emissão de luz por parte do último. No entanto, quando a sonda se liga ao gene-alvo, torna-se susceptível à actividade 5' nuclease da enzima *Taq polimerase*, fazendo com que o sinal de fluorescência seja detectado pelo aparelho. Quando um sinal de fluorescência é detectado acima da linha base (*threshold*), pode ser usado para definir o ciclo de *threshold* (Ct) para a amostra em estudo. A fluorescência emitida antes do nível do Ct para cada curva é considerada ruído de fundo (*background*). Desta forma, a emissão de fluorescência será proporcional à quantidade de cópias de um determinado gene.

Para a normalização dos dados, utilizou-se o gene de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), uma vez que os seus níveis de expressão deverão ser constantes para todas as amostras, não sendo afectados pelas variáveis em estudo.

Na tabela 2 estão representados os *assays* utilizados.

Quadro II: Identificação dos *assays* (TaqMan® *Applied Biosystems*) utilizados para medir a expressão dos genes em estudo.

| Gene         | Assay ID      |                 |               |
|--------------|---------------|-----------------|---------------|
| <i>GAPDH</i> | Hs99999905_m1 | <i>TFF3</i>     | Hs00173625_m1 |
| <i>PSA</i>   | Hs02576345_m1 | <i>SERPINB5</i> | Hs00985283_m1 |
| <i>PCA3</i>  | Hs01371938_m1 | <i>GOLM1</i>    | Hs00213061_m1 |
| <i>AMACR</i> | Hs01091294_m1 | <i>ERG</i>      | Hs00171666_m1 |

A reacção foi efectuada para um volume final de 25 µL por caso, contendo 12,5 µL de TaqMan® Gene Expression Master Mix (*Applied Biosystems*, PN 4369016), 1,25 µL de assay, 8,75 µL de água destilada e 2,5 µL de cDNA. As condições de reacção foram as seguintes: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 80 ciclos de 95 °C durante 15 segundos alternando com 60 °C durante 1 minuto. A expressão foi detectada e analisada através do *software* StepOne (versão 2.1).

#### 3.1.3 Análise estatística

Para se determinar a expressão relativa de um gene alvo deve usar-se um gene de referência como normalizador. Ambas as expressões devem ser determinadas através da técnica de Real-Time PCR, que irá calcular valores de Ct correspondentes à expressão de cada gene para todas as amostras.

Após a obtenção dos valores de Ct podem usar-se diferentes métodos para medir o nível de expressão de cada gene. Actualmente, encontram-se descritos na bibliografia três métodos para a quantificação relativa: Método de Livak (também conhecido como o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), Método  $\Delta Ct$  e Método de Pfaffl. Cada um destes métodos apresenta vantagens e desvantagens, devendo a sua escolha prender-se com o tipo de análise desejada.

O método mais usado é o Método de Livak. Este é de fácil realização e assume que ambos os genes alvo e de referência são amplificados com taxas de eficiência próximas dos 100% e com uma diferença de até 5% entre ambos. Tal pressuposto é de extrema importância e deve ser sempre verificado antes da aplicação deste método. Para o cálculo das eficiências dos genes é necessário proceder-se à diluição das amostras de forma a se obterem valores de Ct para as diferentes concentrações testadas. Estes valores permitirão depois a construção de uma regressão linear cujo declive servirá para calcular a eficiência de cada gene através da expressão  $E = 10^{(-1/\text{declive})}$ . Por outro lado, o valor de  $R^2$  permite determinar o estado de optimização da actividade experimental, uma vez que irá reflectir a variabilidade consequente de uma baixa precisão e exactidão. Idealmente, as séries de diluição irão resultar em curvas de amplificação com espaçamento constante, que pode ser determinado pela equação  $2^n = \text{factor de diluição}$ .

Após se estabelecer que as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referência são similares e próximas dos 100% deve proceder-se à determinação das diferenças relativas na expressão do gene alvo nas diferentes amostras.

Para tal utilizam-se as seguintes fórmulas:

$$\Delta Ct_{\text{(caso)}} = Ct_{\text{(gene alvo)}} - Ct_{\text{(gene de referência)}}$$

$$\Delta Ct_{\text{(controlo)}} = Ct_{\text{(gene alvo)}} - Ct_{\text{(gene de referência)}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{(caso)}} - \Delta Ct_{\text{(controlo)}}$$

$$\text{Rácio de expressão} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

O resultado do rácio de expressão irá traduzir a magnitude da variação da expressão nas diferentes amostras. Foi ainda utilizado o teste t de Student na comparação dos valores médios dos diferentes grupos.

## 3.2 Análise da frequência do polimorfismo *NBN-8360G>C*

### 3.2.1 Caracterização da população

Neste estudo do tipo caso-controlo participaram trezentos e noventa e sete (397) homens caucasianos, com diagnóstico histopatológico de cancro da próstata e idade média de  $68,17 \pm 7,8$  anos. Definiram-se como “casos” os doentes que apresentavam doença avançada, e como “controles” aqueles que manifestavam tumores localizados. As amostras incluídas neste estudo foram escolhidas de forma aleatória e utilizadas com o conhecimento e consentimento prévio dos doentes, de acordo com a declaração de Helsínquia.

### 3.2.2 Procedimentos laboratoriais

#### 3.2.2.1 Processamento das amostras

Foram colhidos cerca de 8 mL de sangue periférico a cada participante do estudo através de uma técnica padronizada de colheita intravenosa.

O isolamento de DNA genómico foi efectuado através do *kit* QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen® 51106), no qual o DNA é extraído por um sistema de colunas de centrifugação. De uma forma simplificada, este procedimento consiste em três passos: adsorção, lavagem e eluição. O DNA liga-se especificamente às membranas de sílica das colunas, enquanto os contaminantes são descartados durante as centrifugações. Os possíveis inibidores da reacção de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) também são eliminados durante este procedimento, através de lavagens com duas soluções tampão diferentes, possibilitando um isolamento de DNA de elevada pureza. No final, o DNA é eluído num tampão de baixa concentração salina e valor de pH elevado.

#### 3.2.2.2 Amplificação do fragmento do gene *NBN*

A amplificação do DNA que contém as regiões a avaliar neste estudo foi realizada recorrendo à técnica de PCR.

A região de interesse foi amplificada numa reacção com volume final de 50 µL, contendo 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas #EP0713), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, incorporado no tampão de reacção (Fermentas #EP0713) 0,4 mM de dNTPs (Fermentas #RO192), 0,4 µM de cada um dos primers (forward: 5' GGATGTAAACAGCCTCTTTG 3' ; reverse: 5' CACAGCAACTATTACATCCT 3') para uma concentração de cerca de 60 ng de DNA por amostra. As condições da reacção incluíram um passo de pré-desnaturação a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos a 58 °C (emparelhamento) e 30 segundos a 72 °C (extensão), aos quais se seguiu um passo final de extensão a 72 °C durante 5 minutos.

#### 3.2.2.3 Identificação dos fragmentos de DNA por electroforese

Para confirmação da amplificação do fragmento de DNA de interesse foram analisados 15 µL do produto de PCR por electroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo (10 µg/mL). Os géis foram preparados em tampão TBE (**Anexo III**), sendo este também utilizado como tampão de electroforese. As amostras foram aplicadas directamente no gel e foi utilizado um marcador molecular de 100 pb (Fermentas #SM0243).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

A visualização dos géis foi efectuada por luz ultravioleta no transiluminador Gel DocXR, através do *software* Quantity One1-D Analysis Software (BioRad) (Figura 8).

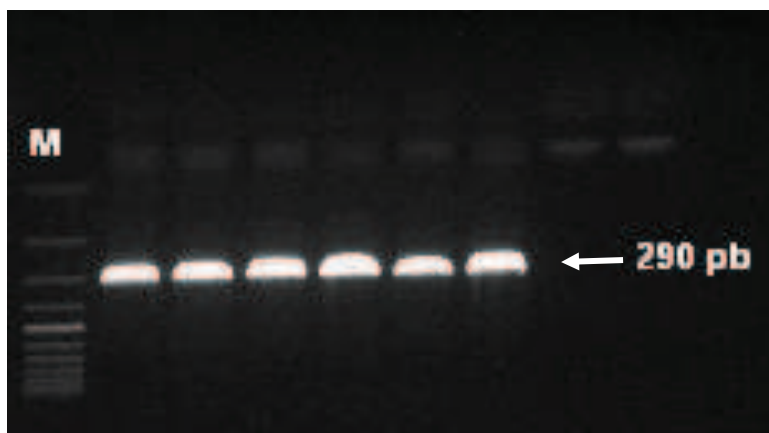


Figura 8 – Gel de agarose a 1,5% (p/v), representando a banda de 290 pb que corresponde à região de *NBN* amplificada por PCR (M- marcador 100 pb)

#### 3.2.2.4 Digestão do fragmento do gene *NBN*

Na análise do polimorfismo no gene *NBN* recorreu-se à técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Para tal, utilizaram-se 10 µL de produto de PCR de cada amostra para digestão com a enzima de restrição *HinfI* e respectivo tampão (Fermentas #ER0801), segundo as instruções fornecidas pelo fabricante, num volume final de reacção de 30 µL. A incubação ocorreu a 37 °C durante 4 horas.

#### 3.2.2.5 Separação dos fragmentos de DNA por electroforese

O resultado da digestão do fragmento amplificado do gene *NBN* foi observado por electroforese em gel de agarose a 3% (p/v) corado com brometo de etídeo (10 µg/mL). Foi possível observarem-se três padrões diferentes de bandas que nos permitiram identificar os respectivos genótipos: uma banda com 290 pb corresponde ao genótipo homozigótico *NBN-8360CC*; duas bandas com 170 pb e 120 pb correspondem ao genótipo homozigótico *NBN-8360GG*; três bandas com 290 pb, 170 pb e 120 pb correspondem ao grupo heterozigótico *NBN-8360GC* (Figura 9).

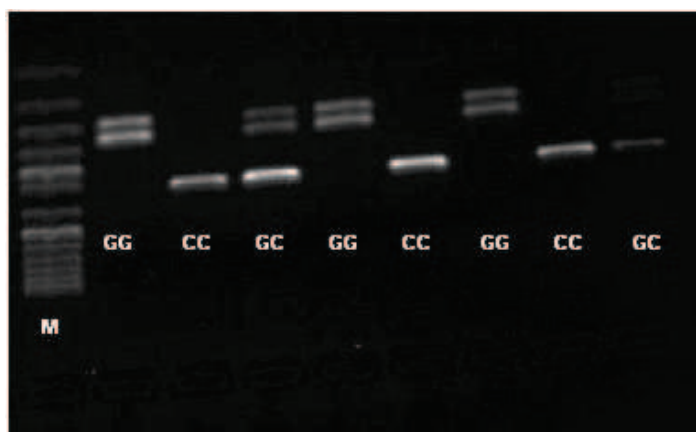


Figura 9 – Gel de agarose a 3% (p/v), representando os três padrões de RFLP, e respectivos genótipos do polimorfismo *NBN*-8360G>C (M- marcador 50 pb)

### 3.2.3 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do *software* estatístico “Statistical Package for Social Sciences – SPSS for Windows” (versão 17.0), e teve em conta as distribuições genotípicas estratificadas de acordo com os grupos determinados (Casos, Controlos) relacionando-as com as características clinicopatológicas dos doentes.

A análise pelo teste qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) foi utilizada para comparação das diferentes variáveis categóricas. O valor de  $p$  foi obtido pelo teste de  $\chi^2$  e a associação que este mede foi considerada estatisticamente significativa quando o seu valor era inferior a 0,05.

O valor de *Odds Ratio* (OR) indica o risco relativo para determinado acontecimento num estudo do tipo caso-controlo, e foi calculado juntamente com o intervalo de confiança (IC) de 95% para medir a associação entre os genótipos do *NBN* e o risco de progressão da doença em homens com cancro da próstata. Utilizou-se ainda o modelo recessivo para análise de risco de doença avançada associado ao polimorfismo em estudo.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado através do teste qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ), por comparação das frequências genotípicas observadas *versus* esperadas.

Foi ainda utilizado o teste ANOVA na comparação dos valores médios de diferentes grupos.

## 3.3 Análise da expressão do gene *NBN*

### 3.3.1 Caracterização da população

Para o estudo da expressão do gene *NBN*, seleccionaram-se catorze (14) amostras das trezentas e noventa e sete (397) utilizadas para a análise do polimorfismo *NBN-8360 G>C*. Destas, quatro (4) eram homozigóticas dominantes (GG), cinco (5) eram homozigóticas recessivas (CC) e cinco (5) eram heterozigóticas (GC) para o polimorfismo estudado.

### 3.3.2 Procedimentos laboratoriais

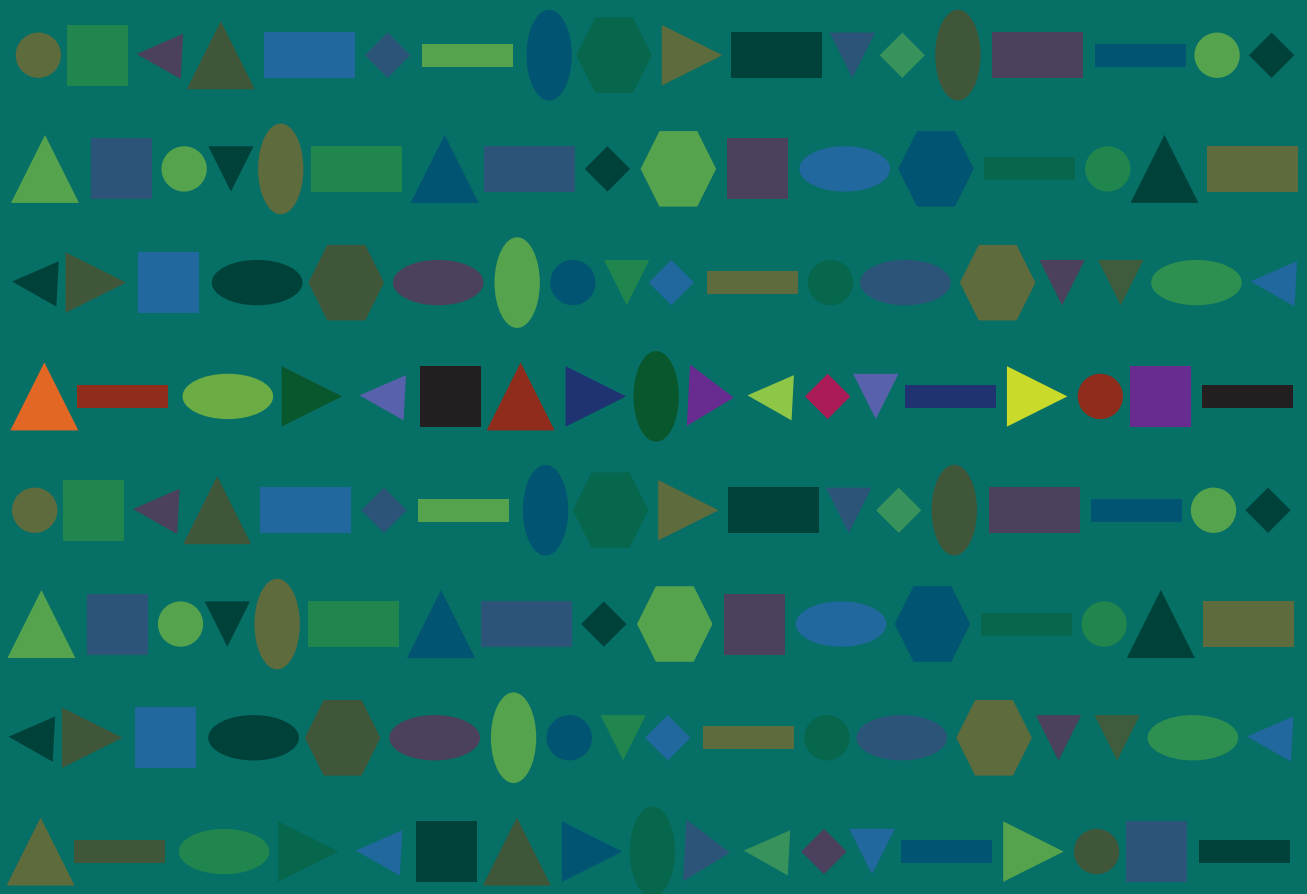
Foram colhidos cerca de 8 mL de sangue periférico a cada participante do estudo através de uma técnica padronizada de colheita intravenosa. Adicionou-se uma solução hipotónica (AKE) (**Anexo III**) às amostras, de forma a provocar a lise dos eritrócitos e incubaram-se as mesmas a -20 °C durante aproximadamente 20 minutos. Centrifugaram-se a 3000 rpm durante 10 minutos e ressuspendeu-se o *pellet* na solução hipotónica. Centrifugaram-se mais uma vez as amostras, e procedeu-se à lavagem dos *pellets* com PBS, seguindo-se outra centrifugação de 3000 rpm durante 10 minutos. Por fim, descartaram-se os sobrenadantes e ressuspenderam-se os pellets em 2 mL de TriPure, de forma a promover uma lise celular eficaz.

Todos os passos que se seguiram, desde a extracção de RNA, síntese de cDNA e análise da expressão genética, foram efectuados de acordo com os procedimentos laboratoriais anteriormente descritos no **ponto 3.1**.

### 3.3.3 Análise estatística

Para a análise dos resultados de expressão do gene *NBN* recorreu-se ao método de Livak, após verificação dos valores de eficiência para os genes alvo e de referência (ver **ponto 3.1.3**). Foi ainda utilizado o teste t de Student na comparação dos valores médios dos diferentes grupos.

## 4. RESULTADOS



#### 4.1 Análise da expressão dos genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG* em amostras de urina

##### 4.1.1 Optimização do procedimento laboratorial

Como já foi referido anteriormente, um dos objectivos deste trabalho consistiu na avaliação de diferentes procedimentos envolvidos na análise de expressão genética em amostras de urinas, a fim de se conseguir otimizar um procedimento laboratorial para este tipo de estudo. Para tal utilizaram-se amostras provenientes de doadores e procedeu-se à contagem do número de células viáveis em cada amostra, não se encontrando diferenças significativas entre estas.

O quadro III sumariza os resultados obtidos por espectrofotometria para algumas amostras, referentes à concentração de RNA (ng/μL) e ao rácio de absorvâncias  $A_{260/280}$ . Relativamente ao rácio de absorvâncias  $A_{260/230}$ , não se observaram diferenças significativas nos diversos procedimentos laboratoriais testados.

Quadro III: Resultados obtidos por espectrofotometria referentes à concentração de RNA (ng/μL) e ao rácio de absorvâncias  $A_{260/280}$ , para amostras processadas de diferentes formas

| Amostra | Solução de Armazenamento | Método de Extração       | [RNA] (ng/μL) | $A_{260/280}$ |
|---------|--------------------------|--------------------------|---------------|---------------|
| A       | <i>RNAlater</i>          | RNeasy Mini Kit          | 2,94          | 1,27          |
| B       | <i>RNAlater</i>          | QIAmp Viral RNA Mini Kit | 95,03         | 2,65          |
| C       | <i>RNAlater</i>          | Método clássico          | 122,69        | 1,2           |
| D       | TriPure                  | RNeasy Mini Kit          | 8,12          | 1,34          |
| E       | TriPure                  | QIAmp Viral RNA Mini Kit | 86,35         | 3,06          |
| F       | TriPure                  | Método clássico          | 652,76        | 1,89          |

Foram testadas duas soluções de armazenamento dos *pellets* obtidos, de forma a averiguar qual seria mais eficaz na conservação do RNA: TriPure Isolation Reagent e RNA*later*. Considerando os valores da concentração de RNA, verificou-se que as amostras armazenadas em TriPure apresentavam valores mais elevados comparativamente às amostras armazenadas em RNA*later*. Este método de conservação também revelou valores mais elevados nos rácios de pureza.

Outro dos procedimentos avaliados envolveu a extracção de RNA. Para tal, testaram-se três *kits* diferentes, como descrito no ponto 3.1.2.1 do capítulo anterior. Após análise dos resultados obtidos por espectrofotometria, constatou-se que o método clássico de extracção a partir do TriPure apresenta valores mais elevados de concentração de RNA, comparativamente aos restantes *kits*, independentemente da solução de armazenamento das amostras. O rácio  $A_{260/280}$  foi particularmente bom para o caso de amostras armazenadas em TriPure.

Avaliou-se ainda a influência de um passo de pré-amplificação anterior à reacção de Real-Time PCR na detecção de expressão genética, recorrendo-se ao *TaqMan PreAmp Master Mix Kit*, não tendo sido encontradas quaisquer diferenças significativas nos resultados obtidos.

Desta forma, verificou-se que o melhor procedimento laboratorial a utilizar neste trabalho consiste no armazenamento de amostras em TriPure Isolation Reagent, sendo o RNA posteriormente extraído através do método clássico de extracção do TriPure. Após a síntese do cDNA as amostras deverão ser analisadas por Real-Time PCR, não sendo efectuado qualquer passo de pré-amplificação antes.

### 4.1.2 Quantificação do RNA

Como já foi anteriormente referido, o RNA foi extraído a partir do método clássico do TriPure. O quadro IV apresenta os valores relativos à quantificação obtida por espectrofotometria, bem como os rácios das absorvâncias  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$ , para as amostras dos doentes que não realizaram massagem prostática.

Quadro IV: Resultados obtidos por espectrofotometria referentes à concentração de RNA (ng/μL) e aos rácios de absorvâncias  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$  para amostras de doentes que não realizaram massagem prostática. A nomenclatura das amostras está relacionada com a sua ordem de chegada ao laboratório.

| Amostra | [RNA]<br>(ng/μL) | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ |
|---------|------------------|---------------|---------------|
| U6      | 60,18            | 1,35          | 0,38          |
| U10     | 515,12           | 1,46          | 0,34          |
| U24     | 581,94           | 1,43          | 0,41          |
| U29     | 538,75           | 1,43          | 0,46          |
| U33     | 236,83           | 1,63          | 0,57          |
| U34     | 193,71           | 1,62          | 0,65          |
| U40     | 258,27           | 1,43          | 0,58          |
| U43     | 409,08           | 1,81          | 0,75          |
| U52     | 81,17            | 1,49          | 0,6           |
| U66     | 47,38            | 1,51          | 0,38          |
| U67     | 58,58            | 1,48          | 0,54          |
| U80     | 132,17           | 1,46          | 0,49          |
| U88     | 34,21            | 1,5           | 0,36          |
| U90     | 59,44            | 1,48          | 0,39          |
| U97     | 59,8             | 1,49          | 0,44          |
| U112    | 51,72            | 1,46          | 0,41          |
| U122    | 38,52            | 1,49          | 0,6           |
| U147    | 131,99           | 1,26          | 0,47          |
| U164    | 113,12           | 1,59          | 0,48          |
| U175    | 5,34             | 1,46          | 0,46          |
| U177    | 378,49           | 1,84          | 0,7           |
| U180    | 304,5            | 1,49          | 0,6           |
| U184    | 81,93            | 1,5           | 0,51          |
| U208    | 275,1            | 1,57          | 0,54          |
| U213    | 433,38           | 1,69          | 0,77          |
| U218    | 64,56            | 1,53          | 0,39          |
| U223    | 854,4            | 1,48          | 0,94          |
| U225    | 54,82            | 1,52          | 0,51          |
| U228    | 512,09           | 1,39          | 0,4           |
| U235    | 12,79            | 1,71          | 0,57          |
| U236    | 94,74            | 1,48          | 0,33          |
| U256    | 52,19            | 1,47          | 0,36          |
| U259    | 211,97           | 1,53          | 0,44          |
| U263    | 136,39           | 1,67          | 0,41          |
| U265    | 42,59            | 1,64          | 0,37          |
| U266    | 99,04            | 1,7           | 0,37          |
| U267    | 60,81            | 1,59          | 0,34          |
| U268    | 159,93           | 1,7           | 0,39          |
| U269    | 81,35            | 1,58          | 0,36          |
| U270    | 92,13            | 1,56          | 0,38          |
| U272    | 141,37           | 1,42          | 0,36          |
| U273    | 197,12           | 1,62          | 0,45          |
| U279    | 790,26           | 1,25          | 0,43          |
| U296    | 25,66            | 1,32          | 0,26          |
| U297    | 1,49             | 0,39          | 0,03          |
| U298    | 10,29            | 0,96          | 0,1           |
| U299    | 33,11            | 1,22          | 0,19          |
| U300    | 77,07            | 1,34          | 0,31          |
| U301    | 38,99            | 1,19          | 0,23          |
| U303    | 143,97           | 1,46          | 0,35          |
| U304    | 45,27            | 1,11          | 0,83          |
| U305    | 73,08            | 1,27          | 0,75          |
| U306    | 56,1             | 1,28          | 0,97          |
| U307    | 52,84            | 1,25          | 1,04          |
| U308    | 135,42           | 1,38          | 1,34          |
| U309    | 61,4             | 1,48          | 0,68          |
| U311    | 84,62            | 1,46          | 0,67          |

## 4. RESULTADOS

Os resultados referentes à concentração de RNA apresentados na tabela 3 revelam uma elevada dispersão, apresentando um valor médio de  $168,05 \pm 192,79$  ng/ $\mu$ L. Relativamente aos rácios de absorvâncias  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$ , revelam-se na sua maioria fora do intervalo indicativo de uma elevada pureza.

Estes resultados foram posteriormente comparados com os dados obtidos para as amostras de urina provenientes dos doentes que realizaram massagem prostática (Quadro V), tendo-se verificado um aumento significativo do valor médio da concentração de RNA ( $p = 0,040$ ). Os rácios de absorvâncias  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$  encontram-se tal como no caso anterior fora do intervalo indicativo de uma elevada pureza.

Quadro V: Resultados obtidos por espectrofotometria referentes à concentração de RNA (ng/ $\mu$ L) e aos rácios de absorvâncias  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$  para amostras de doentes que realizaram massagem prostática. A nomenclatura das amostras está relacionada com a sua ordem de chegada ao laboratório.

| Amostra | [RNA] (ng/ $\mu$ L) | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ |
|---------|---------------------|---------------|---------------|
| A       | 144,46              | 1,71          | 0,46          |
| B       | 403,9               | 2,06          | 0,72          |
| C       | 163,79              | 1,7           | 0,4           |
| D       | 600,12              | 1,49          | 0,34          |
| E       | 1221,77             | 1,4           | 0,47          |
| F       | 937,07              | 1,54          | 0,39          |
| G       | 919,08              | 1,52          | 0,39          |
| H       | 168,5               | 2,04          | 1,94          |
| I       | 2658,7              | 1,63          | 0,74          |
| J       | 208,61              | 1,73          | 0,45          |

### 4.1.3 Quantificação do cDNA

De forma a avaliar a influência dos baixos valores referentes aos rácios de absorvâncias  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$  obtidos na quantificação do RNA, nos processos a jusante, analisaram-se as amostras de cDNA por espectrofotometria. O quadro VI sumariza os valores relativos à concentração de RNA, bem como aos rácios das absorvâncias  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$ , para as amostras dos doentes que não realizaram massagem prostática.

Quadro VI: Resultados obtidos por espectrofotometria referentes à concentração de cDNA (ng/μL) e aos rácios de absorvâncias  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$  para amostras de doentes que não realizaram massagem prostática. A nomenclatura das amostras está relacionada com a sua ordem de chegada ao laboratório.

| Amostra | [cDNA]<br>(ng/μL) | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ |
|---------|-------------------|---------------|---------------|
| U6      | 1703,91           | 1,73          | 1,91          |
| U10     | 1135,82           | 1,69          | 1,35          |
| U24     | 2056,64           | 1,76          | 1,87          |
| U29     | 1203,86           | 1,7           | 1,67          |
| U33     | 1203,24           | 1,73          | 1,81          |
| U34     | 1695,81           | 1,74          | 1,86          |
| U40     | 1971,73           | 1,76          | 2,01          |
| U43     | 1195,62           | 1,73          | 1,71          |
| U52     | 1823,08           | 1,74          | 1,97          |
| U66     | 1271,28           | 1,74          | 1,98          |
| U67     | 1588,67           | 1,72          | 1,88          |
| U80     | 1722,79           | 1,73          | 1,88          |
| U88     | 2023,19           | 1,76          | 2,00          |
| U90     | 1709,32           | 1,73          | 1,92          |
| U97     | 1694,93           | 1,73          | 1,88          |
| U112    | 1689,97           | 1,75          | 1,92          |
| U122    | 1394,97           | 1,74          | 2,00          |
| U147    | 1242,73           | 1,73          | 1,90          |
| U164    | 2203,60           | 1,75          | 2,03          |
| U175    | 1123,08           | 1,73          | 1,95          |
| U177    | 1817,34           | 1,75          | 1,88          |
| U180    | 1082,65           | 1,72          | 1,73          |
| U184    | 1681,30           | 1,73          | 1,91          |
| U208    | 1545,31           | 1,74          | 1,73          |
| U213    | 1910,24           | 1,76          | 1,92          |
| U218    | 2582,34           | 1,76          | 2,08          |
| U223    | 1725,72           | 1,72          | 1,87          |
| U225    | 2582,28           | 1,76          | 2,07          |
| U228    | 1865,62           | 1,73          | 1,82          |
| U235    | 2039,47           | 1,77          | 2,16          |
| U236    | 2451,41           | 1,76          | 2,03          |
| U256    | 2572,35           | 1,75          | 2,02          |
| U259    | 2240,65           | 1,76          | 1,96          |
| U263    | 2096,01           | 1,76          | 2,00          |
| U265    | 1538,06           | 1,76          | 1,82          |
| U266    | 1150,44           | 1,76          | 1,86          |
| U267    | 1342,47           | 1,78          | 1,92          |
| U268    | 1271,98           | 1,75          | 1,79          |
| U269    | 1506,91           | 1,78          | 1,76          |
| U270    | 1602,15           | 1,76          | 1,90          |
| U272    | 1510,43           | 1,77          | 1,91          |
| U273    | 1176,46           | 1,73          | 1,77          |
| U279    | 1498,25           | 1,69          | 1,24          |
| U296    | 3161,58           | 1,78          | 2,21          |
| U297    | 2417,97           | 1,78          | 2,17          |
| U298    | 2921,10           | 1,77          | 2,21          |
| U299    | 3181,39           | 1,78          | 2,19          |
| U300    | 2783,75           | 1,78          | 2,16          |
| A U301  | 1296,29           | 1,73          | 1,77          |
| U303    | 1529,97           | 1,76          | 2,07          |
| U304    | 86,94             | 1,25          | 0,78          |
| U305    | 2531,43           | 1,76          | 2,17          |
| U306    | 1102,58           | 1,65          | 1,71          |
| U307    | 1718,22           | 1,80          | 2,24          |
| U308    | 1344,90           | 1,71          | 1,87          |
| U309    | 1048,66           | 1,73          | 1,92          |
| U311    | 2256,23           | 1,75          | 2,14          |

#### 4. RESULTADOS

Verifica-se uma maior homogeneidade nos resultados relativos à concentração de cDNA, comparativamente com os resultados da concentração de RNA obtidos anteriormente, existindo no entanto ainda alguma variabilidade entre as amostras. O valor médio da concentração de cDNA obtido é de  $1751,32 \pm 595,57$  ng/ $\mu$ L. Relativamente aos rácios de absorvâncias  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$ , verifica-se uma melhoria dos resultados, encontrando-se a maioria próxima do valor pretendido.

Procedeu-se ao mesmo tipo de análise espectrofotométrica para as amostras dos doentes que realizaram massagem prostática, encontrando-se os resultados obtidos sumarizados no quadro VII.

Quadro VI: Resultados obtidos por espectrofotometria referentes à concentração de cDNA (ng/ $\mu$ L) e aos rácios de absorvâncias  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$  para amostras de doentes que realizaram massagem prostática. A nomenclatura das amostras está relacionada com a sua ordem de chegada ao laboratório.

| Amostra | [cDNA] (ng/ $\mu$ L) | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ |
|---------|----------------------|---------------|---------------|
| A       | 2286,16              | 1,72          | 2,05          |
| B       | 2296,05              | 1,71          | 2,02          |
| C       | 2100,53              | 1,71          | 2,06          |
| D       | 2172,11              | 1,79          | 1,78          |
| E       | 4096,39              | 1,76          | 2,04          |
| F       | 2185,82              | 1,77          | 1,85          |
| G       | 2424,74              | 1,77          | 1,87          |
| H       | 4773,92              | 1,67          | 1,86          |
| I       | 5610,02              | 1,45          | 1,35          |
| J       | 5668,25              | 1,32          | 1,58          |

Comparativamente aos resultados obtidos para as amostras de doentes que não realizaram massagem prostática, pode verificar-se um aumento significativo ( $p = 0,008$ ) da concentração de cDNA obtido. Relativamente aos valores dos rácios de absorvâncias  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$ , pode verificar-se que a maioria das amostras apresenta valores superiores a 1,7.

#### 4.1.4 Análise da expressão genética por Real-Time PCR

Como referido no capítulo anterior, a análise da expressão dos genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG* realizada pela técnica de Real-Time PCR. Também se avaliou a expressão do gene de referência *GAPDH*, que serve para normalizar os dados relativos à expressão dos restantes genes, e cujos valores de Ct obtidos por Real-Time PCR se encontram sumarizados no quadro VIII.

Quadro VIII: Resultados obtidos por Real-Time PCR para o gene de referência *GAPDH*, para todas as amostras em estudo. A nomenclatura das amostras está relacionada com a sua ordem de chegada ao laboratório, em que as letras de A a J representam as amostras de doentes que realizaram massagem prostática.

| Amostra | Ct    |      |       |      |       |
|---------|-------|------|-------|------|-------|
| U6      | 62,87 | U184 | 32,16 | U298 | 38,18 |
| U10     | 57,99 | U208 | 54,45 | U299 | 35,98 |
| U24     | 46,75 | U213 | 34,41 | U300 | 30,85 |
| U29     | 54,16 | U218 | 37,51 | U301 | 29,68 |
| U33     | 44,14 | U223 | 43,18 | U303 | 39,68 |
| U34     | 40,50 | U225 | 36,22 | U304 | 36,58 |
| U40     | 67,26 | U228 | 35,01 | U305 | 33,66 |
| U43     | 39,31 | U235 | 38,15 | U306 | 40,97 |
| U52     | 55,18 | U236 | 74,79 | U307 | 33,66 |
| U66     | 57,93 | U256 | 43,83 | U308 | 35,55 |
| U67     | 75,10 | U259 | 39,51 | U309 | 39,53 |
| U80     | 76,92 | U263 | 41,56 | U311 | 38,02 |
| U88     | 36,19 | U265 | 34,52 | A    | 40,14 |
| U90     | 48,98 | U266 | 37,46 | B    | 39,19 |
| U97     | 66,99 | U267 | 37,34 | C    | 35,40 |
| U112    | 69,38 | U268 | 38,02 | D    | 38,30 |
| U122    | 74,84 | U269 | 35,69 | E    | 34,32 |
| U147    | 40,32 | U270 | 35,50 | F    | 31,53 |
| U164    | 40,65 | U272 | 39,21 | G    | 36,98 |
| U175    | 36,22 | U273 | 37,74 | H    | 35,50 |
| U177    | 64,80 | U296 | 58,64 | I    | 47,96 |
| U180    | 38,50 | U297 | 37,96 | J    | 37,96 |

#### 4. RESULTADOS

Relativamente aos restantes genes em estudo, apenas se detectou expressão genética em algumas amostras. A figura 10 apresenta os valores das percentagens de casos em que a detecção foi possível para os genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG*.

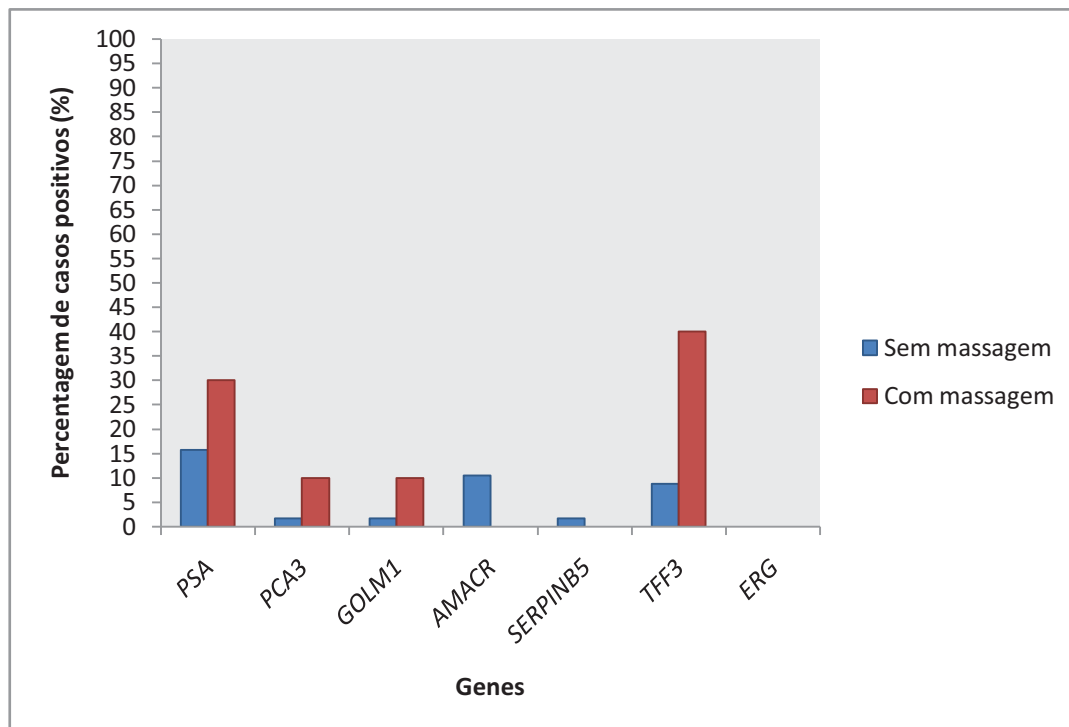


Figura 10: Gráfico representativo da percentagem de amostras em estudo em que foi possível detectar-se expressão dos genes *PSA*, *PCA3*, *GOLM1*, *AMACR*, *SERPINB5*, *TFF3* e *ERG*. As amostras foram divididas de acordo com a realização ou não de massagem prostática.

No caso dos genes *PSA*, *PCA3*, *GOLM1* e *TFF3* verifica-se um aumento da percentagem de detecção para as amostras provenientes de doentes que realizaram massagem prostática. O contrário acontece para os genes *AMACR* e *SERPINB5*, em que apenas foi possível a detecção dos genes em amostras de doentes que não realizaram massagem prostática. No caso do gene *ERG*, não se verifica nenhum caso positivo.

Devido à baixa detecção de expressão genética para os possíveis biomarcadores em estudo, não foi possível efectuar a análise estatística segundo o método de Livak.

Relativamente à análise das médias dos valores de Ct, normalizados com o gene de referência *GAPDH*, nos indivíduos com patologia benigna *versus* indivíduos com doença oncológica, no grupo que não realizou massagem prostática, não se verificaram quaisquer diferenças significativas.

Esta análise foi apenas possível para os genes *PSA*, *AMACR* e *TFF3*, cujos valores de  $p$  se encontram apresentados nas figuras 11, 12 e 13.

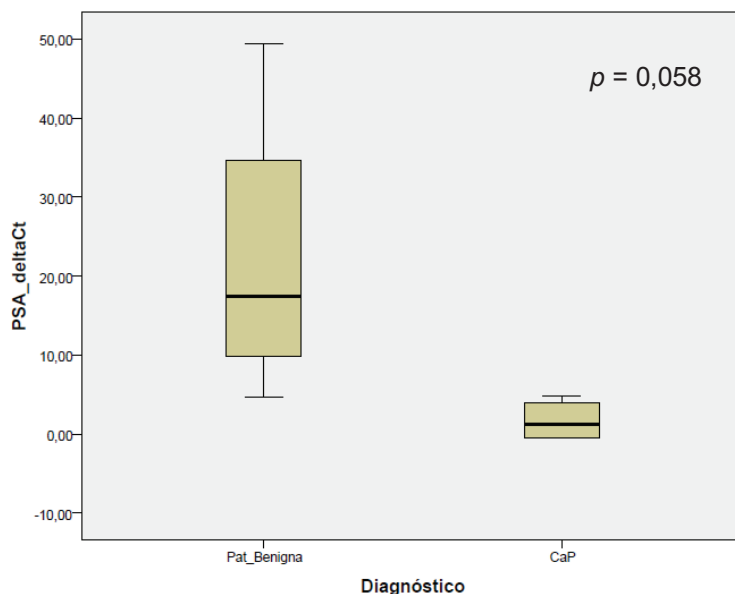


Figura 11: Gráfico representativo da comparação dos valores de  $C_t$  obtidos por Real-Time PCR para o gene *PSA*, e normalizados com o gene de referência *GAPDH*, nos indivíduos com patologia benigna *versus* indivíduos com doença oncológica. Nenhum dos indivíduos incluídos nestas categorias realizou massagem prostática.

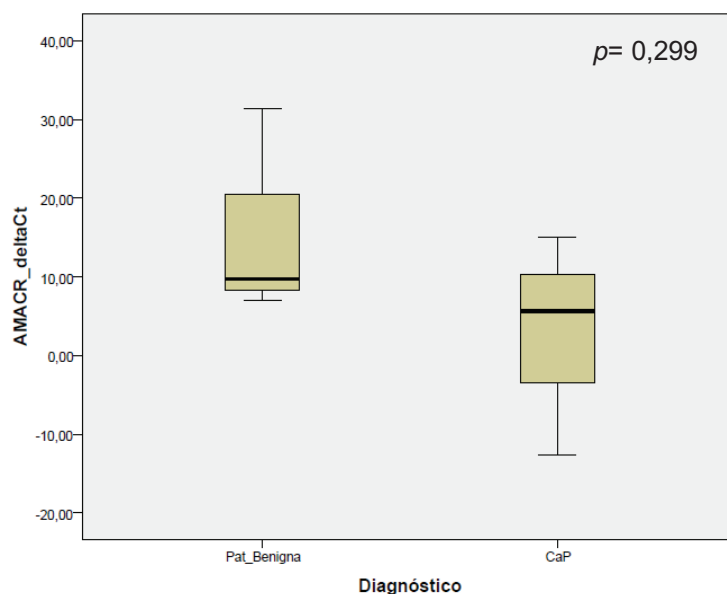


Figura 12: Gráfico representativo da comparação dos valores de  $C_t$  obtidos por Real-Time PCR para o gene *AMACR*, e normalizados com o gene de referência *GAPDH*, nos indivíduos com patologia benigna *versus* indivíduos com doença oncológica. Nenhum dos indivíduos incluídos nestas categorias realizou massagem prostática.

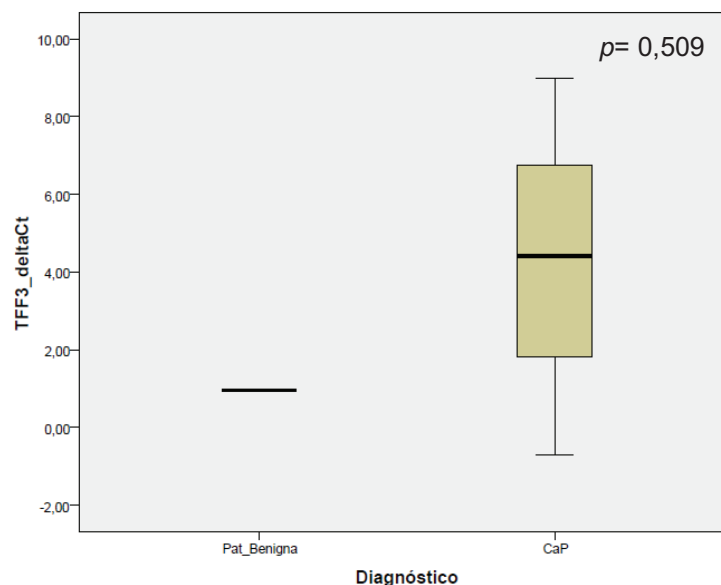


Figura 13: Gráfico representativo da comparação dos valores de  $C_t$  obtidos por Real-Time PCR para o gene *TFF3*, e normalizados com o gene de referência *GAPDH*, nos indivíduos com patologia benigna *versus* indivíduos com doença oncológica. Nenhum dos indivíduos incluídos nestas categorias realizou massagem prostática.

Não foi possível efectuar qualquer tipo de análise estatística para analisar as diferenças de expressão dos restantes genes. O gene *GOLM1* foi detectado apenas numa das cinquenta e sete (57) amostras de indivíduos que não realizaram massagem prostática, correspondendo a um caso oncológico. O mesmo aconteceu para o gene *PCA3*. Já o gene *SERPINB5* também foi detectado em apenas uma amostra, correspondendo, no entanto, a um indivíduo com patologia benigna. Por fim, não foi possível detectar o gene *ERG* em nenhuma das amostras incluídas neste estudo.

### 4.2 Análise da frequência do polimorfismo *NBN-8360G>C*

A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos de casos e controlos, de acordo com os genótipos do polimorfismo *NBN-8360G>C*, permitiu observar que as frequências genotípicas observadas eram similares às esperadas (casos,  $p = 3,65$ ; controlos,  $p = 0,45$ )

Encontram-se apresentados no quadro IX os valores médios correspondentes à idade e concentração de *PSA* (ng/mL) dos doentes incluídos neste estudo, de acordo

com os genótipos do polimorfismo *NBN-8360G>C*. não tendo sido encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa com estas duas características ( $p = 0,254$  e  $p = 0,639$ , respectivamente).

Quadro IX: Valores médios correspondentes à idade e concentração de *PSA* (ng/mL), de acordo com os genótipos do polimorfismo *NBN-8360G>C*

|                                 | Genótipos     |                |                | <i>p</i> |
|---------------------------------|---------------|----------------|----------------|----------|
|                                 | CC            | GC             | GG             |          |
| Idade <sup>a</sup>              | 68,35 ± 8,35  | 67,33 ± 7,91   | 68,72 ± 7,68   | 0,254    |
| <i>PSA</i> (ng/mL) <sup>a</sup> | 19,06 ± 23,51 | 62,55 ± 420,67 | 67,89 ± 222,74 | 0,639    |

<sup>a</sup> – Média ± Desvio Padrão

A distribuição das frequências dos genótipos do polimorfismo *NBN-8360G>C* entre o grupo de doente com cancro da próstata avançado e doentes com cancro da próstata localizado está descrita no quadro X.

Quadro X: Frequências genóticas de *NBN-8360G>C* nos grupos de cancro da próstata com doença avançada e doença localizada

|            | Doença<br>avançada |      | Doença<br>localizada |      | OR    | IC 95%        | p     |
|------------|--------------------|------|----------------------|------|-------|---------------|-------|
|            | (n = 156)          |      | (n = 241)            |      |       |               |       |
|            | n                  | %    | n                    | %    |       |               |       |
| Genótipos  |                    |      |                      |      |       |               |       |
| CC         | 16                 | 10,3 | 29                   | 12,1 |       |               |       |
| GC         | 52                 | 33,3 | 116                  | 48,1 |       |               |       |
| GG         | 88                 | 56,4 | 96                   | 39,8 |       |               |       |
| Portador C | 68                 | 43,6 | 145                  | 60,2 | 1,00  | Referência    | -     |
| GG         | 88                 | 56,4 | 96                   | 39,8 | 1,955 | 1,300 – 2,940 | 0,001 |

#### 4. RESULTADOS

Observam-se diferenças estatisticamente significativas da distribuição dos genótipos e dos alelos entre o grupo de casos e o grupo controle.

A frequência do genótipo raro CC foi de 10,3% e 12,1% em casos e controles, respectivamente. A frequência observada do genótipo GC foi de 33,3% nos casos e 48,1% nos controles. A frequência do genótipo GG, no grupo de casos e no grupo de controles, foi de 56,4% e 39,8% respectivamente.

Na análise de acordo com o modelo recessivo, foram agrupados os genótipos (GG vs portador C), verificando-se risco aumentado para doença avançada para o genótipo *NBS18360GG* (OR = 1,955; IC 95% = 1,300 – 2,940;  $p = 0,001$ ).

O quadro XI sumariza a distribuição das frequências genotípicas no grupo de doentes com cancro da próstata de acordo com o grau histológico de Gleason.

Quadro XI: Frequências genotípicas de *NBN-8360G>C* no grupo de doentes com cancro da próstata, de acordo com o grau histológico de Gleason

|            | Gleason < 8 |      | Gleason > 8 |      | OR    | IC 95%        | p     |
|------------|-------------|------|-------------|------|-------|---------------|-------|
|            | (n = 303)   |      | (n = 89)    |      |       |               |       |
|            | n           | %    | n           | %    |       |               |       |
| Genótipos  |             |      |             |      |       |               |       |
| CC         | 36          | 11,9 | 8           | 9,0  |       |               |       |
| GC         | 132         | 43,6 | 36          | 40,4 |       |               |       |
| GG         | 135         | 44,6 | 45          | 50,6 |       |               |       |
| Portador C | 168         | 55,4 | 44          | 49,4 | 1,00  | Referência    | -     |
| GG         | 135         | 44,6 | 45          | 50,6 | 1,273 | 0,793 – 2,043 | 0,317 |

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos de *NBN-8360G>C* entre os dois grupos considerando o grau histológico de Gleason (OR = 1,273; IC 95% = 0,793 – 2,043;  $p = 0,317$ ).

### 4.3 Análise da expressão do gene *NBN*

Para a análise da expressão do gene *NBN* recorreu-se à técnica de Real-Time PCR, sendo registados os valores de Ct através do software StepOne (versão 2.1). Utilizou-se mais uma vez o gene de referência *GAPDH*, cuja expressão serve para normalizar os dados relativos à expressão do gene *NBN*. Encontram-se apresentados no quadro XII, os valores de Ct correspondentes às amostras em estudo.

Quadro XII: Resultados obtidos por Real-Time PCR para o gene de referência *GAPDH* e para o gene alvo *NBN*, para todas as amostras incluídas neste estudo. A nomenclatura das amostras está relacionada com a sua ordem de processamento.

| Amostra | Ct <sub>GAPDH</sub> | Ct <sub>NBN</sub> |
|---------|---------------------|-------------------|
| A1      | 27,98               | 33,98             |
| A2      | 31,53               | 35,84             |
| A3      | 31,62               | 36,96             |
| A4      | 41,57               | 39,19             |
| A5      | 30,15               | 35,53             |
| A6      | 32,76               | 29,95             |
| A7      | 27,8                | 34,55             |
| A8      | 30,24               | 34,94             |
| A9      | 30,52               | 33,89             |
| A10     | 29,55               | 35,1              |
| A11     | 31,47               | 36,21             |
| A12     | 24,49               | 31,01             |
| A13     | 41,06               | 37,86             |
| A14     | 33,55               | 36,33             |

Após verificação dos pressupostos referentes às taxas de eficiência dos genes alvo e de referência, procedeu-se à análise dos resultados através do método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), comparando-se os valores de Ct nos casos que apresentavam o genótipo *NBN*-8360GG com os valores de Ct dos portadores do alelo C. O resultado obtido foi de 1,05,

#### 4. RESULTADOS

---

o que revela a ausência de uma associação entre os genótipos avaliados e a expressão do gene *NBN*.

A análise de comparação dos valores médios de Ct para o gene *NBN*, e normalizados com o gene *GAPDH*, também não revelou qualquer tipo de diferença significativa, como se pode ver na figura 14.

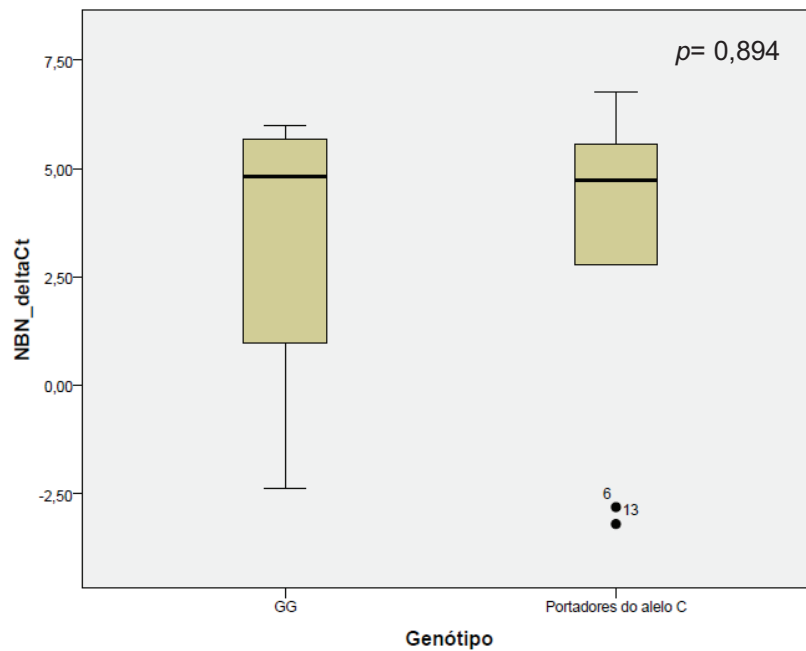
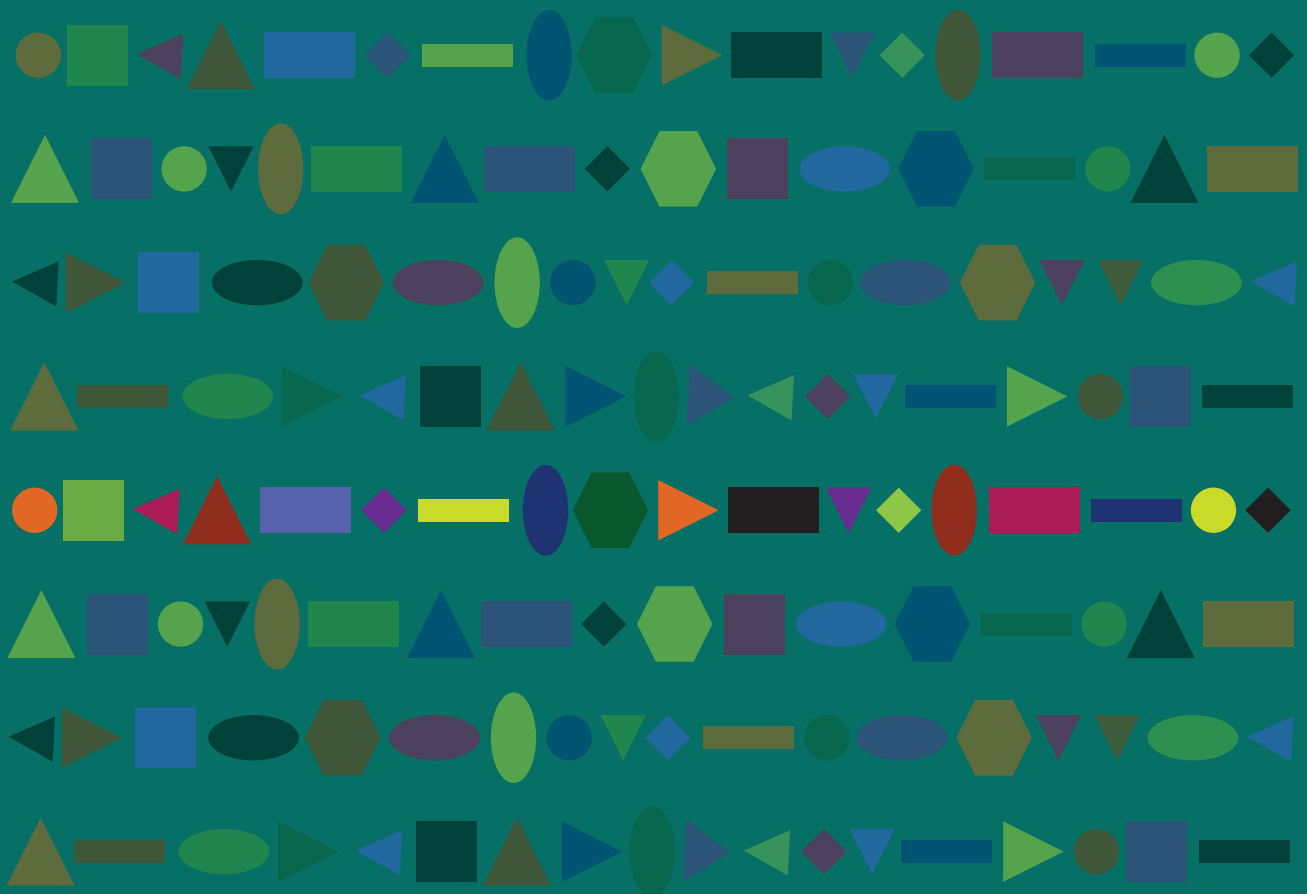


Figura 14: Gráfico representativo da comparação dos valores de Ct obtidos por Real-Time PCR para o gene *NBN*, e normalizados com o gene de referência *GAPDH*.

## 5. DISCUSSÃO



Apesar de um dos maiores pontos de viragem na área da Oncologia ter sido a descoberta de que o cancro é uma doença genética e multifactorial, grande parte da investigação centra-se no estudo de apenas um gene ou uma abordagem. No entanto, deve ter-se em conta a ligação existente entre o microambiente tumoral e as características genéticas de um hospedeiro, que o podem tornar mais ou menos susceptível ao desenvolvimento tumoral [180-182]. Isto reflecte a importância de se estabelecerem diferentes perspectivas para o estudo oncológico, possibilitando uma melhor compreensão da doença enquanto um todo.

O cancro da próstata representa uma ameaça significativa à saúde dos homens, sendo uma das neoplasias mais frequentes no mundo [18]. Devido ao carácter heterogéneo da doença, ainda se desconhece o curso natural do seu desenvolvimento. Sabe-se apenas que está relacionado com o confinamento do tumor, e que se caracteriza muitas vezes por um comportamento latente, existindo muitos casos de doença sem manifestação clínica [35]. Devido à forte componente genética que esta neoplasia apresenta, é de extrema importância o estudo das vias moleculares envolvidas na sua progressão, bem como a identificação de genes que possam contribuir para o seu desenvolvimento.

Desta forma, o objectivo deste trabalho passou pelo estudo do impacto que a diversidade genética tem na susceptibilidade e progressão do cancro da próstata.

### **5.1 Expressão dos genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG* em amostras de urina**

Actualmente, o *PSA* representa o biomarcador por excelência para o rastreio do cancro da próstata. No entanto, este gene apresenta algumas limitações, nomeadamente no que diz respeito aos valores de sensibilidade e especificidade, conduzindo a um excesso de diagnósticos [42-43]. Torna-se pois fundamental diminuir o número de biópsias desnecessárias em homens sem doença oncológica. Mais importante que isso, deve melhorar-se a detecção dos tumores que estão presentes em homens cujos valores de *PSA* são considerados normais. Para tal, têm-se vindo a estudar a possibilidade de outros biomarcadores que ajudem no prognóstico e diagnóstico do cancro da próstata, a fim de evitar o seu desenvolvimento e progressão para doença metastática.

A epidemiologia molecular visa a identificação de possíveis causas de determinadas doenças, como é o caso do cancro, bem como a caracterização do seu papel e impacto na transformação maligna. A utilização de biomarcadores na área epidemiológica tem vindo a aumentar exponencialmente durante os últimos anos, uma vez que a identificação de novos agentes carcinogéneos através das abordagens epidemiológicas tradicionais tem-se tornado cada vez mais difícil. Por outro lado, o conhecimento crescente dos mecanismos de carcinogénese conduziu ao desenvolvimento de modelos que envolvem eventos genéticos e epigenéticos, bem como alterações celulares e histológicas. O desenvolvimento de equipamentos na área da biologia molecular e da genética também contribuíram para o estudo de novas abordagens metodológicas [183].

Os biomarcadores moleculares são capazes de detectar a existência de tumores em fases precoces, antes destes poderem ser identificados por outras abordagens. Por outro lado, a utilização destes biomarcadores enquanto ferramentas no diagnóstico e prognóstico do cancro da próstata servirá para nos ajudar a conhecer um pouco mais acerca das causas e dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento desta doença [63].

Tudo isto revela a importância do estudo de novos biomarcadores na progressão do cancro da próstata, uma vez que estes permitirão o desenvolvimento de novas técnicas de rastreio da doença. No entanto, devem ter-se em conta os imensos desafios a nível metodológico e analítico para estabelecimento de novos biomarcadores, de forma a otimizar os ensaios clínicos necessários à sua aprovação para uso clínico. Desta forma, deve proceder-se a um controlo rígido da sua análise, ou seja, devem conhecer-se todos os erros sistemáticos e do acaso que possam afectar a expressão do(s) gene(s) de interesse, de forma a validar a sua utilização.

Actualmente, a maior parte dos estudos centram-se no estudo da expressão de um único gene ou proteína. No entanto, o desenvolvimento tumoral consiste num processo bastante heterogéneo e dinâmico, sendo extremamente importante a análise de vários genes que possam estar envolvidos na progressão tumoral. Isto permitirá reunir o máximo de informação acerca das vias envolvidas no processo, ajudando à caracterização e identificação das diferentes fases do processo. Essa informação irá depois permitir a descoberta de genes importantes para a transformação maligna, que poderão servir de biomarcadores tumorais, formando uma “assinatura genética” da doença.

Desta forma, um dos objectivos deste trabalho passou pela análise da expressão dos genes *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG*, que poderiam estar implicados no desenvolvimento de cancro da próstata, avaliando a sua utilidade enquanto biomarcadores para esta doença.

Na análise dos resultados de espectrofotometria, para as diferentes condições testadas no passo de optimização do procedimento laboratorial para estudos de expressão genética em amostras de urina, foi possível verificar alguma discrepância nos valores obtidos. Relativamente às soluções de armazenamento testadas, o *RNA/ater* revelou valores mais baixos de concentração de RNA comparativamente ao *TriPure*, independentemente do método de extracção usado. Curiosamente, grande parte dos estudos opta pela utilização de *RNA/ater*, por ser considerado um bom conservante celular. Esta solução permeabiliza rapidamente os tecidos, de forma a proteger e estabilizar o RNA celular, eliminando a necessidade de um rápido processamento das amostras armazenadas [184]. A discordância dos resultados obtidos neste estudo pode dever-se a diferenças no processamento das amostras, sendo de extrema importância a escolha de uma solução de armazenamento apropriada para cada tipo de estudo.

Na comparação dos métodos de extracção de RNA, verificou-se que a pior opção seria a utilização do *kit* RNeasy® Mini Kit, uma vez que gerou as concentrações de RNA mais baixas, bem como os piores rácios de absorvância  $A_{260/280}$ . Estes resultados podem ser justificados pela contaminação das amostras de RNA com proteínas, bem como pela composição das soluções tampão do *kit*. Outros problemas podem ter ocorrido, nomeadamente a quantidade inicial de amostra, pois no caso de esta ser elevada, o volume de tampão de lise recomendado pelo fornecedor pode não ser suficiente. Existe também a possibilidade do RNA ficar preso à membrana das colunas, o que resulta num menor rendimento da reacção.

As amostras extraídas com o *kit* Qiamp® Viral RNA Mini Kit apresentaram um melhor rendimento da reacção, quando comparadas com o RNeasy® Mini Kit. No entanto, não foram os melhores valores obtidos. Relativamente ao rácio de absorvância  $A_{260/280}$ , estes apresentaram valores muito elevados, que se poderão dever à contaminação das amostras com DNA, bem como à composição incorrecta do tampão AVE. Podem ter ocorrido ainda outros problemas, tais como a degradação do *carrier* de RNA utilizado e/ou a passagem incompleta do lisado pela membrana da coluna.

Os melhores resultados tanto na concentração de RNA obtido como no rácio de absorvância  $A_{260/280}$ , corresponderam às amostras extraídas pelo método clássico do *TriPure*. Este método revelou-se particularmente vantajoso para amostras armazenadas

em TriPure, sendo esta a opção escolhida para processar as amostras dos doentes envolvidos no estudo. Esta escolha revelou-se vantajosa não só a nível de rendimento, como também de execução, revelando facilidade e rapidez no processamento das amostras.

A realização de um passo de pré-amplificação anterior à reacção de Real-Time PCR não revelou nenhuma melhoria dos resultados. Este é um passo normalmente usado em casos em que há uma quantidade limitada de RNA, ou quando este se encontra degradado, aumentando em cerca de 1000 a 16 000 vezes a transcrição de um determinado gene. Neste estudo, não se verificou qualquer tipo de vantagem na realização deste passo, o que se pode dever a interferências na reacção de pré-amplificação provocadas por inibidores existentes nas amostras que não foram devidamente descartados durante as lavagens efectuadas.

Apesar de se ter escolhido a melhor metodologia para o processamento das amostras dos doentes, os resultados obtidos por Real-Time PCR não foram suficientes para se efectuar uma análise estatística adequada, uma vez que foram poucos os casos em que se conseguiu detectar os níveis de expressão dos genes testados. Isto vai de encontro a estudos anteriores, que revelaram grande dificuldade na detecção de transcritos genéticos em amostras de urinas, apresentando valores de sensibilidade bastante baixos [185-187].

Este insucesso pode dever-se a vários factores sendo um dos mais emergentes o tipo de amostra utilizada. A urina apresenta diversas vantagens enquanto amostra biológica, nomeadamente para o estudo do cancro da próstata. A libertação de células tumorais para a urina, através do sistema ductal, permite a detecção de possíveis biomarcadores neste tipo de amostra [68]. No entanto, esta passagem das células não se faz de forma simples, sendo importante a aplicação de um estímulo. Para tal, tem sido proposta a realização de uma massagem prostática antes da recolha da urina, de forma a aumentar a concentração de secreções prostáticas na amostra [70]. No entanto, esta é uma medida bastante invasiva, que anula algumas das vantagens da utilização de urinas enquanto amostras para estudos de expressão genética, nomeadamente o fácil acesso em quantidades elevadas.

Quando comparamos a detecção de expressão dos genes em estudo nas amostras sem massagem prostática e com massagem prostática, verificamos que há um maior número de resultados positivos nos casos em que as amostras foram obtidas após massagem prostática. A maior diferença diz respeito ao gene *TFF3*, no qual há um aumento superior a 30% na detecção da sua expressão. Estes resultados vão de

encontro com o princípio que as amostras obtidas com massagem prostática deverão apresentar uma concentração de células superior às amostras obtidas sem massagem prostática. No entanto, o gene *AMACR* apenas foi detectado nas amostras obtidas sem massagem prostática, estando presente em aproximadamente 10% dos casos. Isto revela a existência de outros factores, para além da massagem prostática, importantes para o processamento das amostras, como a qualidade do RNA extraído, a quantidade óptima de cDNA utilizado na reacção de Real-Time PCR, entre outros.

Um dos resultados mais curiosos neste trabalho tem a ver com a expressão do *PSA* nas diferentes amostras. Quando analisamos os resultados da expressão deste gene nas amostras sem massagem, constatamos a sua baixa detecção: apenas 15,8% dos casos foram positivos. Sendo este gene específico da próstata, seria de esperar que a sua detecção fosse positiva para todos os casos. Como já foi referido, a aplicação da massagem prostática pode ser crucial para a detecção de biomarcadores, uma vez que estimula a passagem dos mesmos para a urina, aumentando a sua concentração [70]. No entanto, quando verificamos os resultados para a população cujas amostras de urina foram obtidas após aplicação da massagem prostática, apenas nos deparamos com 30% de casos positivos. Também no caso do gene *PCA3* houve uma baixa detecção da expressão do gene nos casos em que as amostras foram obtidas com massagem prostática. Isto vai contra estudos anteriores, que revelaram valores de sensibilidade e especificidade de aproximadamente 66% e 89% na detecção deste gene em amostras de urinas, através de Real-Time PCR [82]. No entanto, um estudo realizado por Crocitto e colaboradores demonstrou valores de sensibilidade e especificidade baixos para a detecção de biomarcadores na urina, independentemente da aplicação de massagem prostática [188]. Esta dificuldade na detecção de expressão de genes em amostras de urina obtidas com massagem prostática vai de encontro aos resultados deste trabalho, sublinhando a importância da formulação de um procedimento laboratorial universal para a recolha e processamento das amostras. Esta medida deverá reduzir a variabilidade nos resultados obtidos, daquela que já é só por si uma doença bastante heterogénea. A massagem prostática deve pois ser efectuada correctamente, de forma a estimular a passagem das células tumorais para a urina, aumentando a concentração dos genes potencialmente envolvidos no processo de carcinogénese, e facilitando consequentemente a detecção dos mesmos nas amostras obtidas.

Devem também ter-se em conta a outros factores, nomeadamente a variabilidade apresentada pela urina enquanto amostra biológica. Este tipo de amostra apresenta uma instabilidade de vários factores, nomeadamente no que diz respeito ao volume, à

concentração proteica (especialmente em casos de disfunção renal) e ao valor de pH (pode variar entre 4 e 8). Os próprios componentes da urina variam de acordo com uma série de factores, dos quais se destacam a idade, a saúde e a dieta, entre outros. É essencial proceder-se a um bom armazenamento das amostras, de forma a evitar a sua degradação. É necessário também ter atenção ao facto de todos estes factores variarem não só de caso para caso, como também no próprio indivíduo [189].

Por outro lado, estudos anteriores revelaram resultados contraditórios relativamente à detecção do mRNA do *PSA* em amostras de sangue [190-191]. Isto revela a existência de outras variáveis, para além do tipo de amostra, que devem ser optimizadas e controladas, de forma a se obterem resultados precisos.

Uma dessas variáveis tem a ver com o tipo de biomarcador em estudo. A utilização de RNA neste campo apresenta-se bastante vantajosa, na medida em que esta molécula está envolvida nos processos celulares mais ancestrais, apresentando-se como uma fonte de informação genética importantíssima. No entanto, deve ter-se em conta a dificuldade de manuseamento que esta molécula apresenta. A sua elevada susceptibilidade para se degradar, o seu isolamento em quantidades adequadas e elevada qualidade, a partir de amostras de urina, constitui um enorme desafio. As dificuldades aumentam quando não há possibilidade das amostras serem processadas na hora e local após a recolha [192]. Tudo isto pode traduzir-se em erros ao longo do trabalho, enviesando os resultados.

A reacção de síntese de cDNA também pode interferir com a reacção de Real-Time PCR, uma vez que tanto a enzima transcriptase reversa como o DTT podem ser inibidores da amplificação [193].

Outra questão importante neste tipo de trabalho prende-se com a escolha da população. Em qualquer estudo, essa escolha é de extrema importância, uma vez que irá condicionar os resultados. Sendo o cancro da próstata uma doença de curso lento, deverão existir genes e vias que apenas se encontram envolvidos em determinadas fases da doença. Assim, caso se incluam, por exemplo, unicamente homens com doença localizada, corre-se o risco de não se obter qualquer resultado acerca da expressão dos genes seleccionados. Isto deve-se ao facto de tumores altamente diferenciados, correspondentes a fases precoces da doença, tenderem a apresentar menos esfoliação celular na urina, comparativamente com tumores mais avançados [193].

O resultado é uma maior dificuldade de detecção de possíveis biomarcadores em amostras de doentes que se encontram em fases iniciais da doença. Isto não significa necessariamente que estes não tenham um papel importante no desenvolvimento da

doença, mas sim que os resultados estão a “mascarar” o diagnóstico. Tais genes poderão estar envolvidos em fases mais tardias, sendo bastante úteis para a avaliação do prognóstico, pelo que devem ser testados em amostras populacionais com características diferentes.

## **5.2 Frequência do polimorfismo *NBN-8360G>C* em doentes com cancro da próstata**

Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento exponencial na relação existente entre a reparação de DNA e o desenvolvimento de cancro. Este aumento é consequência do esforço para compreender como é que o DNA sofre danos e como a célula é capaz de responder a estas lesões.

De entre os vários tipos de danos do DNA, destacam-se as quebra da cadeia dupla, cuja detecção é feita por *checkpoints* do ciclo celular [13]. O erro na reparação destes danos pode resultar em apoptose ou mudanças a nível da transcrição de determinados genes. Desta forma, mutações adquiridas durante o processo de reparação do DNA podem provocar um crescimento celular descontrolado, culminando no desenvolvimento de cancro [194]. Existem diversas vias, cada uma com vários factores, envolvidas no processo de reparação do DNA [195]. Uma dessas vias envolve o complexo MRN [166], que apenas apresenta actividade enzimática na presença do gene *NBN*. Desta forma, variações em qualquer um destes genes poderão estar associadas a um maior risco para desenvolvimento de cancro. É curioso verificar que indivíduos com mutações na linha germinativa em genes envolvidos no processo de reparação do DNA tendem a desenvolver síndromes que se caracterizam pela predisposição para diversos tipos de cancro e elevados níveis de aneuploidia [196]. Um destes exemplos tem a ver com o gene *NBN*. Como já foi anteriormente referido, mutações na linha germinativa deste gene conduzem ao desenvolvimento de SNB, uma doença rara caracterizada por uma elevada predisposição para cancro [168]. Em suma, e atendendo à importância dos genes envolvidos na reparação de lesões no DNA, polimorfismos no gene *NBN* podem afectar a actividade do complexo MRN, aumentando o risco para o aparecimento de mutações que poderão estar na base do desenvolvimento tumoral.

Um dos polimorfismos mais estudados neste gene tem sido o *NBN-8360G>C*. Este parece estar associado com o desenvolvimento de algumas neoplasias, entre as

quais cancro do pulmão e cancro da mama [174, 176]. Nenhum estudo avaliou ainda a influência deste polimorfismo em doentes com cancro da próstata, sendo este o primeiro trabalho a fazê-lo.

Neste estudo, foi encontrada uma associação significativa entre o polimorfismo *NBN-8360G>C* e o risco para doença avançada em indivíduos diagnosticados com cancro da próstata, estando o genótipo GG associado com um maior risco (OR = 1,955; IC = 1,300 – 2,940;  $p = 0,001$ ).

A revisão bibliográfica referente a estudos sobre uma possível associação deste polimorfismo com o desenvolvimento de cancro revelou resultados contrários. Estes estudos sugerem um maior risco para doença oncológica em indivíduos portadores do genótipo *NBN-8360CC*. Um estudo realizado por Medina e colaboradores [176] revelou uma associação entre o genótipo CC e um maior número de mutações na p53, em doentes com cancro do pulmão. No entanto, um outro estudo realizado por Lan e colaboradores revelou que o genótipo GG estava associado com a acumulação da p53 [197]. Esta divergência de resultados pode dever-se a diferenças de etnia das populações estudadas, bem como a diferenças na exposição dessas mesmas populações. De qualquer forma é evidente a relação existente entre o polimorfismo *NBN-8360G>C* e o estado da p53. Sendo esta proteína uma peça-chave na conservação da integridade genómica, é de extrema importância a compreensão de uma possível associação entre esta e o gene *NBN*.

Por outro lado, um estudo realizado em 2003 revelou uma associação entre o gene *NBN* e o gene *MYC* [198]. Segundo esse estudo, o gene *MYC* regula directamente a transcrição do *NBN*, influenciando a conservação da integridade genómica. Tal como a p53, o gene *MYC* desempenha um papel importantíssimo no desenvolvimento tumoral, pelo que a sua associação com o gene *NBN* deve ser estudada exaustivamente.

Muitas das funções do gene *NBN* ainda permanecem desconhecidas, sabendo-se no entanto que desempenha um papel duplo no processo de desenvolvimento tumoral. Se por um lado é considerado um gene supressor tumoral, devido à participação no complexo MRN e envolvimento na reparação da quebra de cadeias duplas de DNA, por outro é capaz de adquirir propriedades oncogénicas, activando a via *PI3K/AKT*, envolvida na transformação maligna [172]. Estas funções revelam a importância do gene *NBN* no processo de carcinogénese, podendo este gene ser afectado por alterações genéticas tal como SNP's.

No presente estudo não foi encontrada nenhuma associação do polimorfismo *NBN-8360G>C* com outras características clínico-patológicas dos doentes,

nomeadamente com o grau de Gleason, idade e concentração de *PSA* (ng/mL) aquando do diagnóstico ( $p = 0,317$ ;  $p = 0,254$ ;  $p = 0,639$ , respectivamente).

### 5.3 Expressão do gene *NBN* em doentes com cancro da próstata

Actualmente, sabe-se que a diferença nos níveis de expressão de determinados genes está na base do desenvolvimento de neoplasias [10]. Isto revela a importância do estudo de variações a nível de expressão genética na susceptibilidade e desenvolvimento de tumores, proporcionando uma melhor compreensão dos mecanismos e genes envolvidos neste processo.

Neste estudo tentou compreender-se qual o impacto do polimorfismo *NBN-8360G>C* na função do gene, estudando-se para tal a expressão do mesmo em indivíduos portadores de diferentes genótipos. A expressão do gene *NBN* foi realizada através da técnica de Real-Time PCR, utilizando o gene de referência *GAPDH* para normalizar os dados obtidos. Não foi encontrada qualquer diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão do gene de acordo com o genótipo ( $p = 0,894$ ). Estes resultados sugerem que o polimorfismo *NBN-8360G>C* não tem influência a nível de expressão do gene, podendo no entanto estar associado com a interacção deste com outros factores, afectando uma possível zona de ligação. De referir, no entanto, que a amostragem utilizada neste estudo era reduzida, devendo ser aumentada em estudos posteriores, de forma aos resultados possuírem um maior poder estatístico.

Como já foi anteriormente referido, o gene *NBN* apresenta um “papel duplo” no desenvolvimento tumoral. Por um lado, este gene faz parte do complexo MRN, estando envolvido na reparação das quebras na cadeia dupla de DNA. No entanto, é também capaz de induzir a proliferação celular, através da activação da via PI3K/Akt, que por sua vez induz a transformação maligna [171]. Curiosamente, esta última função dá-se quando o gene *NBN* se encontra demasiado expresso. Assim, a elevada expressão do gene pode ser ou não favorável para o indivíduo, dependendo da função que o gene desempenhar.

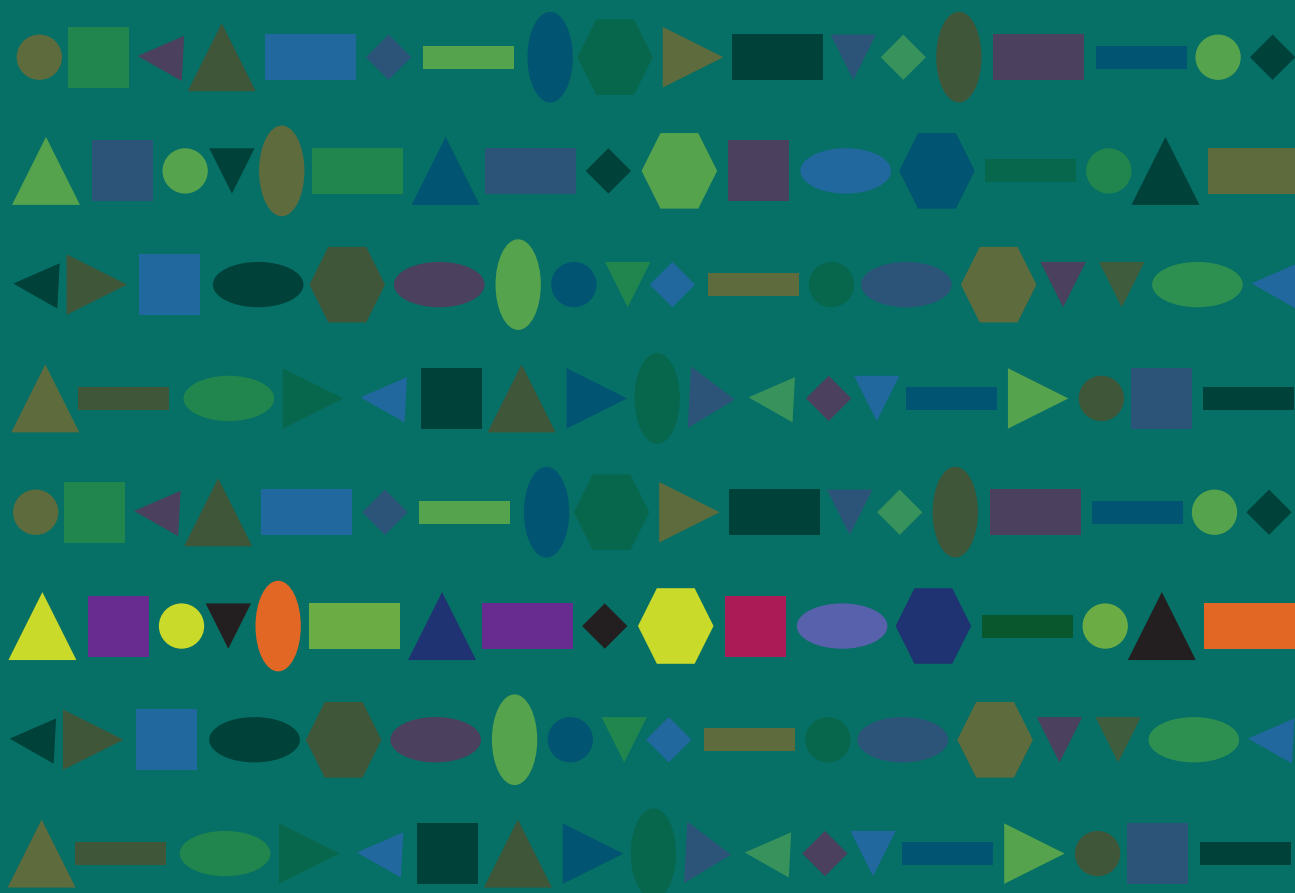
Apesar de não se ter verificado nenhuma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo estudado e a expressão do gene *NBN*, não se deve descartar a importância que esta variação genética pode ter no funcionamento do gene. Desta forma,

## 5. DISCUSSÃO

---

o polimorfismo *NBN-8360G>C* pode afectar a conformação do mRNA do gene, bem como a sua localização celular, desempenhando um papel importante na correcta função do mesmo [199].

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS



Uma das principais características do cancro da próstata prende-se com a complexidade da sua história natural, que ainda permanece, em grande parte, desconhecida. Tendo em conta o elevado carácter heterogéneo que esta neoplasia apresenta, torna-se importante descobrir o máximo de vias e genes que possam estar envolvidos na sua carcinogénese. Esta informação permitirá grandes avanços na área do diagnóstico, bem como na identificação de grupos de risco, prognóstico, entre outros.

O presente trabalho teve como objectivo avaliar de que forma a diversidade genética influencia a progressão do cancro da próstata, estudando para tal a expressão de um painel de genes e a possível influência de um SNP no desenvolvimento tumoral. Para tal utilizaram-se diferentes abordagens metodológicas, bem como doentes com características clínicas distintas, desde indivíduos com patologia benigna, indivíduos com tumores localizados e ainda com doença avançada. A diversidade deste trabalho permitiu o estudo de diferentes fases do desenvolvimento da doença, tentando deste modo caracterizar uma doença que continua a afectar milhares de homens em todo o mundo.

Uma das abordagens exploradas neste trabalho foi a utilização de urinas enquanto amostras biológicas para estudos de expressão genética em indivíduos com patologia prostática. Este tipo de amostragem foi sugerido pelas suas diversas vantagens comparativamente à utilização de outros fluidos, sendo uma das principais o facto da sua recolha ser fácil e pouco invasiva. No entanto, e particularmente no caso do cancro da próstata, é necessária a passagem de células tumorais para o sistema urinário. As amostras deste estudo foram recolhidas sem qualquer tipo de estímulo que ajudasse esta passagem, o que revelou dificuldades na realização do trabalho. Uma vez que os indivíduos participantes do estudo não tinham realizado massagem prostática, a concentração de células tumorais nas amostras de urina recolhidas era muito baixa. Isto tornou a detecção de possíveis biomarcadores bastante difícil, revelando a necessidade da aplicação de massagem prostática antes da recolha da urina. No entanto, deve ter-se em conta a agressividade que este procedimento apresenta para os doentes, estudando qual a melhor amostra para este tipo de estudo. Por outro lado, a manipulação de RNA revela algumas dificuldades, principalmente devido à sua fácil degradação. Este trabalho revelou algumas dificuldades na obtenção de RNA com elevado grau de pureza, atendendo aos valores de absorvâncias obtidos por espectrofotometria.

Desta forma, um dos objectivos principais deverá passar pela elaboração de um procedimento laboratorial reprodutível e preciso, de forma a se obterem resultados com elevadas taxas de sensibilidade e especificidade. Isto permitirá a utilização de diferentes biomarcadores que poderão funcionar em conjunto na detecção e avaliação da doença.

Tal procedimento laboratorial deverá ter em conta a aplicabilidade a testes de rastreio populacionais. Desta forma, os biomarcadores seleccionados deverão ser estáveis e resistentes às alterações de temperatura, de forma a possibilitar o envio das amostras de urina para laboratórios sem que haja degradação das amostras.

A combinação de marcadores positivos e negativos também poderá ajudar a otimizar o programa de rastreio do cancro da próstata. No entanto, deve ter-se em conta que a combinação de vários marcadores pode revelar-se difícil, devendo a sua escolha prender-se não só com a capacidade de detecção, mas também com a complementaridade que apresentam entre si. O objectivo deverá passar então pela utilização de um painel de genes que se deverão completar e não combinar ao acaso, de forma a elaborar uma “assinatura genética” do cancro da próstata.

Outra das abordagens deste trabalho teve em conta a influência dos polimorfismos no desenvolvimento tumoral. Através da análise efectuada, foi possível verificar uma possível associação entre o genótipo *NBN-8360GG* e o risco de progressão para doença avançada em indivíduos com cancro da próstata. No entanto, quando se verificou se este polimorfismo influenciava a expressão do gene *NBN*, não se constatou nenhuma diferença estatisticamente significativa. Estes resultados sugerem que o *NBN* possa estar associado a outros factores, nomeadamente a p53 e o *MYC*, estando o polimorfismo *NBN-8360G>C* num local importante, capaz de afectar esta associação.

A associação encontrada entre o polimorfismo *NBN-8360G>C* e o risco para doença avançada revela a importância desta variação genética na progressão do cancro da próstata. Isto sublinha a utilidade do seu estudo, de forma a compreender de que modo o SNP influencia os doentes, seja na falha da reparação de lesões celulares, ou na resposta ao tratamento. Uma melhor compreensão do seu papel permitirá assim a identificação de indivíduos com risco acrescido para desenvolvimento de cancro da próstata avançado.

Trabalhos futuros deverão estudar a influência do polimorfismo *NBN-8360G>C* na susceptibilidade para cancro da próstata, avaliando para tal a frequência de cada genótipo não só em doentes com cancro da próstata, como também em indivíduos saudáveis. Também seria interessante estudar a possível associação deste polimorfismo com outros factores, nomeadamente outros polimorfismos do *NBN* e mutações na p53, de forma a compreender melhor qual o papel deste SNP no desenvolvimento tumoral.

# 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. World Health Organization (2010) [www.who.int](http://www.who.int).
2. International Agency for Research on Cancer (2010) [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)
3. Long, E.R. (1928) **A History of Pathology**. Tindall & Cox.
4. Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., *et al.* (1997) **An Introduction to Genetic Analysis**. W H Freeman and Company.
5. Watson, J. (1987) **Molecular Biology of the Gene**. The Benjamim/Cummings Publishing Company, Inc.
6. Oliveira, P.A., Colaco, A., Chaves, R., *et al.* (2007) **Chemical carcinogenesis**. *An Acad Bras Cienc*. 79(4): 593-616.
7. Brennan, P. (2002) **Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it?** *Carcinogenesis*. 23(3): 381-7.
8. Hanahan, D. e Weinberg, R.A. (2000) **The hallmarks of cancer**. *Cell*. 100(1): 57-70.
9. Mantovani, A. (2009) **Cancer: Inflaming metastasis**. *Nature*. 457(7225): 36-7.
10. Schulz, W.A. (2005) **Molecular Biology of Human Cancers**. Springer.
11. Levitt, N.C. e Hickson, I.D. (2002) **Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity**. *Trends Mol Med*. 8(4): 179-86.
12. van den Bosch, M., Bree, R.T. e Lowndes, N.F. (2003) **The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes**. *EMBO Rep*. 4(9): 844-9.
13. Rhind, N. e Russell, P. (2000) **Checkpoints: it takes more than time to heal some wounds**. *Curr Biol*. 10(24): R908-11.
14. Tauchi, H., Matsuura, S., Kobayashi, J., *et al.* (2002) **Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability**. *Oncogene*. 21(58): 8967-80.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

15. Shields, P.G. e Harris, C.C. (1991) **Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer**. *JAMA*. 266(5): 681-7.
16. Brookes, A.J. (1999) **The essence of SNPs**. *Gene*. 234(2): 177-86.
17. Imyanitov, E.N. (2009) **Gene polymorphisms, apoptotic capacity and cancer risk**. *Hum Genet*. 125(3): 239-46.
18. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., *et al.* (2010) **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008**. *Int J Cancer*.
19. Ferlay, J., Parkin, D.M. e Steliarova-Foucher, E. (2010) **Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008**. *Eur J Cancer*. 46(4): 765-81.
20. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., *et al.* (2005) **Global cancer statistics, 2002**. *CA Cancer J Clin*. 55(2): 74-108.
21. Hsing, A.W. e Chokkalingam, A.P. (2006) **Prostate cancer epidemiology**. *Front Biosci*. 11: 1388-413.
22. Matsuda, T. e Saika, K. (2007) **Comparison of time trends in prostate cancer incidence (1973 1997) in East Asia, Europe and USA, from Cancer Incidence in Five Continents Vols IV VIII**. *Jpn J Clin Oncol*. 37(7): 556-7.
23. Baade, P.D., Coory, M.D. e Aitken, J.F. (2004) **International trends in prostate-cancer mortality: the decrease is continuing and spreading**. *Cancer Causes Control*. 15(3): 237-41.
24. Gronberg, H. (2003) **Prostate cancer epidemiology**. *Lancet*. 361(9360): 859-64.
25. Bracarda, S., de Cobelli, O., Greco, C., *et al.* (2005) **Cancer of the prostate**. *Crit Rev Oncol Hematol*. 56(3): 379-96.
26. Cook, L.S., Goldoft, M., Schwartz, S.M., *et al.* (1999) **Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants**. *J Urol*. 161(1): 152-5.

27. McCracken, M., Olsen, M., Chen, M.S., Jr., *et al.* (2007) **Cancer incidence, mortality, and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese ethnicities.** *CA Cancer J Clin.* 57(4): 190-205.
28. Delongchamps, N.B., Singh, A. e Haas, G.P. (2007) **Epidemiology of prostate cancer in Africa: another step in the understanding of the disease?** *Curr Probl Cancer.* 31(3): 226-36.
29. Fradet, Y., Meyer, F., Bairati, I., *et al.* (1999) **Dietary fat and prostate cancer progression and survival.** *Eur Urol.* 35(5-6): 388-91.
30. Hong, J.H., Ahn, K.S., Bae, E., *et al.* (2006) **The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer in vitro and in vivo.** *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 9(2): 147-52.
31. Kolonel, L.N. (2001) **Fat, meat, and prostate cancer.** *Epidemiol Rev.* 23(1): 72-81.
32. Karan, D., Lin, M.F., Johansson, S.L., *et al.* (2003) **Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas.** *Int J Cancer.* 103(3): 285-93.
33. Graaff, V.D. (2001) **Human Anatomy.** *The McGraw-Hill Companies.*
34. Greene, D.R. (1992) **Urologic Ultrasonography.** *Campell's Urology.*
35. Carter, H.B., Piantadosi, S. e Isaacs, J.T. (1990) **Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer.** *J Urol.* 143(4): 742-6.
36. Chodak, G.W., Thisted, R.A., Gerber, G.S., *et al.* (1994) **Results of conservative management of clinically localized prostate cancer.** *N Engl J Med.* 330(4): 242-8.
37. Johansson, J.E., Andren, O., Andersson, S.O., *et al.* (2004) **Natural history of early, localized prostate cancer.** *JAMA.* 291(22): 2713-9.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

38. Lopes, C., Campos, C. e Brito, M.J. (2000) **“Cancro da próstata” Problemas do diagnóstico em biopsias e em peças de prostatectomia: Resultados, certezas e dúvidas.** *Carcinoma da Próstata – Perspectiva Actual*.
39. Byar, D.P. e Mostofi, F.K. (1972) **Carcinoma of the prostate: prognostic evaluation of certain pathologic features in 208 radical prostatectomies. Examined by the step-section technique.** *Cancer*. 30(1): 5-13.
40. Miller, G.J. e Cygan, J.M. (1994) **Morphology of prostate cancer: the effects of multifocality on histological grade, tumor volume and capsule penetration.** *J Urol*. 152(5 Pt 2): 1709-13.
41. Miller, G.J. e Torkko, K.C. (2001) **Natural history of prostate cancer--epidemiologic considerations.** *Epidemiol Rev*. 23(1): 14-8.
42. Caplan, A. e Kratz, A. (2002) **Prostate-specific antigen and the early diagnosis of prostate cancer.** *Am J Clin Pathol*. 117 Suppl: S104-8.
43. Steuber, T., Helo, P. e Lilja, H. (2007) **Circulating biomarkers for prostate cancer.** *World J Urol*. 25(2): 111-9.
44. Carter, H.B., Pearson, J.D., Metter, E.J., *et al.* (1992) **Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease.** *JAMA*. 267(16): 2215-20.
45. Smith, D.S. e Catalona, W.J. (1994) **Rate of change in serum prostate specific antigen levels as a method for prostate cancer detection.** *J Urol*. 152(4): 1163-7.
46. Seaman, E., Whang, M., Olsson, C.A., *et al.* (1993) **PSA density (PSAD). Role in patient evaluation and management.** *Urol Clin North Am*. 20(4): 653-63.
47. Oesterling, J.E., Jacobsen, S.J., Klee, G.G., *et al.* (1995) **Free, complexed and total serum prostate specific antigen: the establishment of appropriate reference ranges for their concentrations and ratios.** *J Urol*. 154(3): 1090-5.

48. Catalona, W.J., Partin, A.W., Slawin, K.M., *et al.* (1998) **Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial.** *JAMA*. 279(19): 1542-7.
49. Catalona, W.J., Smith, D.S., Wolfert, R.L., *et al.* (1995) **Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening.** *JAMA*. 274(15): 1214-20.
50. Djavan, B., Remzi, M., Zlotta, A.R., *et al.* (2002) **Complexed prostate-specific antigen, complexed prostate-specific antigen density of total and transition zone, complexed/total prostate-specific antigen ratio, free-to-total prostate-specific antigen ratio, density of total and transition zone prostate-specific antigen: results of the prospective multicenter European trial.** *Urology*. 60(4 Suppl 1): 4-9.
51. Partin, A.W., Brawer, M.K., Bartsch, G., *et al.* (2003) **Complexed prostate specific antigen improves specificity for prostate cancer detection: results of a prospective multicenter clinical trial.** *J Urol*. 170(5): 1787-91.
52. Eastham, J.A. (2005) **Prostate-specific antigen doubling time as a prognostic marker in prostate cancer.** *Nat Clin Pract Urol*. 2(10): 482-91.
53. da Silva, F.C. (2005) **Rastreo do Cancro da Próstata.** *Acta Urulógica*. 22(3): 11-3.
54. Andriole, G.L., Crawford, E.D., Grubb, R.L., *et al.* (2009) **Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial.** *N Engl J Med*. 360(13): 1310-9.
55. Schroder, F.H., Hugosson, J., Roobol, M.J., *et al.* (2009) **Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study.** *N Engl J Med*. 360(13): 1320-8.
56. Kato, R.B., Srougi, V., Salvadori, F.A., *et al.* (2008) **Pretreatment tumor volume estimation based on total serum psa in patients with localized prostate cancer.** *Clinics (Sao Paulo)*. 63(6): 759-62.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

57. Humphrey, P.A. (2004) **Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate**. *Mod Pathol*. 17(3): 292-306.
58. Hermanek, P., Hutter, R. V. P., Sobin, L. H., *et al.* (1997) **Prostate**. Em: Illustrated guide to the TNM/pTNM classification of malignant tumors. *Springer-Verlag*.
59. Heidenreich, A., Aus, G., Bolla, M., *et al.* (2009) **[EAU guidelines on prostate cancer]**. *Actas Urol Esp*. 33(2): 113-26.
60. Chodak, G.W.e Warren, K.S. (2006) **Watchful waiting for prostate cancer: a review article**. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 9(1): 25-9.
61. Sharp, P.A. (2009) **The centrality of RNA**. *Cell*. 136(4): 577-80.
62. Jakupciak, J.P., Wang, W., Barker, P.E., *et al.* (2004) **Analytical validation of telomerase activity for cancer early detection: TRAP/PCR-CE and hTERT mRNA quantification assay for high-throughput screening of tumor cells**. *J Mol Diagn*. 6(3): 157-65.
63. Huppi, K. e Chandramouli, G.V. (2004) **Molecular profiling of prostate cancer**. *Curr Urol Rep*. 5(1): 45-51.
64. Ashworth, T.R. (1869) **A case of cancer in which cells similar to those in the tumours where seen in the blood after death**. *Aust Med J*. 14: 146.
65. Kolch, W., Neususs, C., Pelzing, M., *et al.* (2005) **Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery**. *Mass Spectrom Rev*. 24(6): 959-77.
66. Schaub, S., Wilkins, J., Weiler, T., *et al.* (2004) **Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry**. *Kidney Int*. 65(1): 323-32.
67. Theodorescu, D., Wittke, S., Ross, M.M., *et al.* (2006) **Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis**. *Lancet Oncol*. 7(3): 230-40.
68. Schiffer, E. (2007) **Biomarkers for prostate cancer**. *World J Urol*. 25(6): 557-62.

69. Hessels, D., Klein Gunnewiek, J.M., van Oort, I., *et al.* (2003) **DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer.** *Eur Urol.* 44(1): 8-15; discussion 15-6.
70. Laxman, B., Morris, D.S., Yu, J., *et al.* (2008) **A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer.** *Cancer Res.* 68(3): 645-9.
71. Stamey, T.A., Yang, N., Hay, A.R., *et al.* (1987) **Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate.** *N Engl J Med.* 317(15): 909-16.
72. Heidenreich, A., Vorreuther, R., Neubauer, S., *et al.* (1997) **The influence of ejaculation on serum levels of prostate specific antigen.** *J Urol.* 157(1): 209-11.
73. Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., *et al.* (1979) **Purification of a human prostate specific antigen.** *Invest Urol.* 17(2): 159-63.
74. Brawer, M.K. (1999) **Prostate-specific antigen: current status.** *CA Cancer J Clin.* 49(5): 264-81.
75. Brawer, M.K. (2000) **Screening for prostate cancer.** *Semin Surg Oncol.* 18(1): 29-36.
76. Bussemakers, M.J., van Bokhoven, A., Verhaegh, G.W., *et al.* (1999) **DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer.** *Cancer Res.* 59(23): 5975-9.
77. Schalken, J.A., Hessels, D. e Verhaegh, G. (2003) **New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene.** *Urology.* 62(5 Suppl 1): 34-43.
78. Schalken, J.A. (2005) **Validation of molecular targets in prostate cancer.** *BJU Int.* 96 Suppl 2: 23-9.
79. Verhaegh, G.W., van Bokhoven, A., Smit, F., *et al.* (2000) **Isolation and characterization of the promoter of the human prostate cancer-specific DD3 gene.** *J Biol Chem.* 275(48): 37496-503.

80. Neves, A.F., Araujo, T.G., Biase, W.K., *et al.* (2008) **Combined analysis of multiple mRNA markers by RT-PCR assay for prostate cancer diagnosis.** *Clin Biochem.* 41(14-15): 1191-8.
81. Nakanishi, H., Groskopf, J., Fritsche, H.A., *et al.* (2008) **PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance.** *J Urol.* 179(5): 1804-9; discussion 1809-10.
82. Fradet, Y., Saad, F., Aprikian, A., *et al.* (2004) **uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer.** *Urology.* 64(2): 311-5; discussion 315-6.
83. Groskopf, J., Aubin, S.M., Deras, I.L., *et al.* (2006) **APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer.** *Clin Chem.* 52(6): 1089-95.
84. Tinzi, M., Marberger, M., Horvath, S., *et al.* (2004) **DD3PCA3 RNA analysis in urine--a new perspective for detecting prostate cancer.** *Eur Urol.* 46(2): 182-6; discussion 187.
85. van Gils, M.P., Hessels, D., van Hooij, O., *et al.* (2007) **The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance.** *Clin Cancer Res.* 13(3): 939-43.
86. Dhanasekaran, S.M., Barrette, T.R., Ghosh, D., *et al.* (2001) **Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer.** *Nature.* 412(6849): 822-6.
87. Luo, J., Duggan, D.J., Chen, Y., *et al.* (2001) **Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling.** *Cancer Res.* 61(12): 4683-8.
88. Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Su, A.I., *et al.* (2001) **Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer.** *Cancer Res.* 61(16): 5974-8.
89. Cuebas, D.A., Phillips, C., Schmitz, W., *et al.* (2002) **The role of alpha-methylacyl-CoA racemase in bile acid synthesis.** *Biochem J.* 363(Pt 3): 801-7.

90. Mobley, J.A., Leav, I., Zielie, P., *et al.* (2003) **Branched fatty acids in dairy and beef products markedly enhance alpha-methylacyl-CoA racemase expression in prostate cancer cells in vitro.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12(8): 775-83.
91. Schmitz, W., Fingerhut, R. e Conzelmann, E. (1994) **Purification and properties of an alpha-methylacyl-CoA racemase from rat liver.** *Eur J Biochem.* 222(2): 313-23.
92. Jiang, Z. e Woda, B.A. (2004) **Diagnostic utility of alpha-methylacyl CoA racemase (P504S) on prostate needle biopsy.** *Adv Anat Pathol.* 11(6): 316-21.
93. Kumar-Sinha, C., Shah, R.B., Laxman, B., *et al.* (2004) **Elevated alpha-methylacyl-CoA racemase enzymatic activity in prostate cancer.** *Am J Pathol.* 164(3): 787-93.
94. Luo, J., Zha, S., Gage, W.R., *et al.* (2002) **Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer.** *Cancer Res.* 62(8): 2220-6.
95. Rubin, M.A., Zhou, M., Dhanasekaran, S.M., *et al.* (2002) **alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer.** *JAMA.* 287(13): 1662-70.
96. Zhou, M., Chinnaiyan, A.M., Kleer, C.G., *et al.* (2002) **Alpha-Methylacyl-CoA racemase: a novel tumor marker over-expressed in several human cancers and their precursor lesions.** *Am J Surg Pathol.* 26(7): 926-31.
97. Rubin, M.A., Zerkowski, M.P., Camp, R.L., *et al.* (2004) **Quantitative determination of expression of the prostate cancer protein alpha-methylacyl-CoA racemase using automated quantitative analysis (AQUA): a novel paradigm for automated and continuous biomarker measurements.** *Am J Pathol.* 164(3): 831-40.
98. Browne, T.J., Hirsch, M.S., Brodsky, G., *et al.* (2004) **Prospective evaluation of AMACR (P504S) and basal cell markers in the assessment of routine prostate needle biopsy specimens.** *Hum Pathol.* 35(12): 1462-8.

99. Farinola, M.A. e Epstein, J.I. (2004) **Utility of immunohistochemistry for alpha-methylacyl-CoA racemase in distinguishing atrophic prostate cancer from benign atrophy.** *Hum Pathol.* 35(10): 1272-8.
100. Hameed, O., Sublett, J. e Humphrey, P.A. (2005) **Immunohistochemical stains for p63 and alpha-methylacyl-CoA racemase, versus a cocktail comprising both, in the diagnosis of prostatic carcinoma: a comparison of the immunohistochemical staining of 430 foci in radical prostatectomy and needle biopsy tissues.** *Am J Surg Pathol.* 29(5): 579-87.
101. Jiang, Z., Wu, C.L., Woda, B.A., *et al.* (2002) **P504S/alpha-methylacyl-CoA racemase: a useful marker for diagnosis of small foci of prostatic carcinoma on needle biopsy.** *Am J Surg Pathol.* 26(9): 1169-74.
102. Jiang, Z., Wu, C.L., Woda, B.A., *et al.* (2004) **Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker.** *Histopathology.* 45(3): 218-25.
103. Magi-Galluzzi, C., Luo, J., Isaacs, W.B., *et al.* (2003) **Alpha-methylacyl-CoA racemase: a variably sensitive immunohistochemical marker for the diagnosis of small prostate cancer foci on needle biopsy.** *Am J Surg Pathol.* 27(8): 1128-33.
104. Ploussard, G. e de la Taille, A. (2010) **Urine biomarkers in prostate cancer.** *Nat Rev Urol.* 7(2): 101-9.
105. Risk, M.C. e Lin, D.W. (2009) **New and novel markers for prostate cancer detection.** *Curr Urol Rep.* 10(3): 179-86.
106. Suemori, S., Lynch-Devaney, K. e Podolsky, D.K. (1991) **Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(24): 11017-21.
107. Thim, L. (1997) **Trefoil peptides: from structure to function.** *Cell Mol Life Sci.* 53(11-12): 888-903.

108. Thim, L., Woldike, H.F., Nielsen, P.F., *et al.* (1995) **Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast.** *Biochemistry.* 34(14): 4757-64.
109. Hoffmann, W. (2005) **Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution.** *Cell Mol Life Sci.* 62(24): 2932-8.
110. Taupin, D. e Podolsky, D.K. (2003) **Trefoil factors: initiators of mucosal healing.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(9): 721-32.
111. Taupin, D.R., Kinoshita, K. e Podolsky, D.K. (2000) **Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(2): 799-804.
112. Abdou, A.G., Aiad, H.A. e Sultan, S.M. (2008) **pS2 (TFF1) expression in prostate carcinoma: correlation with steroid receptor status.** *APMIS.* 116(11): 961-71.
113. Faith, D.A., Isaacs, W.B., Morgan, J.D., *et al.* (2004) **Trefoil factor 3 overexpression in prostatic carcinoma: prognostic importance using tissue microarrays.** *Prostate.* 61(3): 215-27.
114. Garraway, I.P., Seligson, D., Said, J., *et al.* (2004) **Trefoil factor 3 is overexpressed in human prostate cancer.** *Prostate.* 61(3): 209-14.
115. Lee, J.Y., Eom, E.M., Kim, D.S., *et al.* (2003) **Analysis of gene expression profiles of gastric normal and cancer tissues by SAGE.** *Genomics.* 82(1): 78-85.
116. Poulson, R., Chinery, R., Sarraf, C., *et al.* (1993) **Trefoil peptide gene expression in small intestinal Crohn's disease and dietary adaptation.** *J Clin Gastroenterol.* 17 Suppl 1: S78-91.
117. Rio, M.C., Chenard, M.P., Wolf, C., *et al.* (1991) **Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract.** *Gastroenterology.* 100(2): 375-9.

118. Sasaki, M., Tsuneyama, K., Saito, T., *et al.* (2004) **Site-characteristic expression and induction of trefoil factor family 1, 2 and 3 and malignant brain tumor-1 in normal and diseased intrahepatic bile ducts relates to biliary pathophysiology.** *Liver Int.* 24(1): 29-37.
119. Van De Bovenkamp, J.H., Korteland-Van Male, A.M., Warson, C., *et al.* (2003) **Gastric-type mucin and TFF-peptide expression in Barrett's oesophagus is disturbed during increased expression of MUC2.** *Histopathology.* 42(6): 555-65.
120. Wright, N.A., Poulsom, R., Stamp, G., *et al.* (1993) **Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology.* 104(1): 12-20.
121. Askew, Y.S., Pak, S.C., Luke, C.J., *et al.* (2001) **SERPINB12 is a novel member of the human ov-serpin family that is widely expressed and inhibits trypsin-like serine proteinases.** *J Biol Chem.* 276(52): 49320-30.
122. van Gent, D., Sharp, P., Morgan, K., *et al.* (2003) **Serpins: structure, function and molecular evolution.** *Int J Biochem Cell Biol.* 35(11): 1536-47.
123. Remold-O'Donnell, E. (1993) **The ovalbumin family of serpin proteins.** *FEBS Lett.* 315(2): 105-8.
124. Zou, Z., Anisowicz, A., Hendrix, M.J., *et al.* (1994) **Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells.** *Science.* 263(5146): 526-9.
125. Maass, N., Hojo, T., Zhang, M., *et al.* (2000) **Maspin--a novel protease inhibitor with tumor-suppressing activity in breast cancer.** *Acta Oncol.* 39(8): 931-4.
126. Benarafa, C. e Remold-O'Donnell, E. (2005) **The ovalbumin serpins revisited: perspective from the chicken genome of clade B serpin evolution in vertebrates.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(32): 11367-72.
127. Gao, F., Shi, H.Y., Daugherty, C., *et al.* (2004) **Maspin plays an essential role in early embryonic development.** *Development.* 131(7): 1479-89.

128. Lonardo, F., Li, X., Siddiq, F., *et al.* (2006) **Maspin nuclear localization is linked to favorable morphological features in pulmonary adenocarcinoma.** *Lung Cancer*. 51(1): 31-9.
129. Xia, W., Lau, Y.K., Hu, M.C., *et al.* (2000) **High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma.** *Oncogene*. 19(20): 2398-403.
130. Sheng, S., Carey, J., Seftor, E.A., *et al.* (1996) **Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(21): 11669-74.
131. Sheng, S., Pemberton, P.A. e Sager, R. (1994) **Production, purification, and characterization of recombinant maspin proteins.** *J Biol Chem*. 269(49): 30988-93.
132. Jiang, N., Meng, Y., Zhang, S., *et al.* (2002) **Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis.** *Oncogene*. 21(26): 4089-98.
133. Liu, J., Yin, S., Reddy, N., *et al.* (2004) **Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin.** *Cancer Res*. 64(5): 1703-11.
134. Maass, N., Nagasaki, K., Ziebart, M., *et al.* (2002) **Expression and regulation of tumor suppressor gene maspin in breast cancer.** *Clin Breast Cancer*. 3(4): 281-7.
135. Sood, A.K., Fletcher, M.S., Gruman, L.M., *et al.* (2002) **The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma.** *Clin Cancer Res*. 8(9): 2924-32.
136. Machtens, S., Serth, J., Bokemeyer, C., *et al.* (2001) **Expression of the p53 and Maspin protein in primary prostate cancer: correlation with clinical features.** *Int J Cancer*. 95(5): 337-42.
137. Zou, Z., Zhang, W., Young, D., *et al.* (2002) **Maspin expression profile in human prostate cancer (CaP) and in vitro induction of Maspin expression by androgen ablation.** *Clin Cancer Res*. 8(5): 1172-7.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

138. Chen, Z., Fan, Z., McNeal, J.E., *et al.* (2003) **Hepsin and maspin are inversely expressed in laser capture microdissected prostate cancer.** *J Urol.* 169(4): 1316-9.
139. Affara, N.I. e Coussens, L.M. (2007) **IKKalpha at the crossroads of inflammation and metastasis.** *Cell.* 129(1): 25-6.
140. Al-Ayyoubi, M., Schwartz, B.S. e Gettins, P.G. (2007) **Maspin binds to urokinase-type and tissue-type plasminogen activator through exosite-exosite interactions.** *J Biol Chem.* 282(27): 19502-9.
141. Luo, J.L., Tan, W., Ricono, J.M., *et al.* (2007) **Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin.** *Nature.* 446(7136): 690-4.
142. Palzkill, T. (2002) **Proteomics, em Protein Expression Mapping.** Springer.
143. Kladney, R.D., Bulla, G.A., Guo, L., *et al.* (2000) **GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection.** *Gene.* 249(1-2): 53-65.
144. Bachert, C., Fimmel, C. e Linstedt, A.D. (2007) **Endosomal trafficking and proprotein convertase cleavage of cis Golgi protein GP73 produces marker for hepatocellular carcinoma.** *Traffic.* 8(10): 1415-23.
145. Marrero, J.A., Romano, P.R., Nikolaeva, O., *et al.* (2005) **GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma.** *J Hepatol.* 43(6): 1007-12.
146. Lapointe, J., Li, C., Higgins, J.P., *et al.* (2004) **Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(3): 811-6.
147. Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., *et al.* (2005) **Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer.** *Science.* 310(5748): 644-8.
148. Mehra, R., Tomlins, S.A., Shen, R., *et al.* (2007) **Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer.** *Mod Pathol.* 20(5): 538-44.

149. Mehra, R., Tomlins, S.A., Yu, J., *et al.* (2008) **Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer.** *Cancer Res.* 68(10): 3584-90.
150. Tu, J.J., Rohan, S., Kao, J., *et al.* (2007) **Gene fusions between TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues.** *Mod Pathol.* 20(9): 921-8.
151. Tomlins, S.A., Laxman, B., Dhanasekaran, S.M., *et al.* (2007) **Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer.** *Nature.* 448(7153): 595-9.
152. Tomlins, S.A., Laxman, B., Varambally, S., *et al.* (2008) **Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer.** *Neoplasia.* 10(2): 177-88.
153. Carver, B.S., Tran, J., Gopalan, A., *et al.* (2009) **Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate.** *Nat Genet.* 41(5): 619-24.
154. King, J.C., Xu, J., Wongvipat, J., *et al.* (2009) **Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis.** *Nat Genet.* 41(5): 524-6.
155. Attard, G., Clark, J., Ambrosini, L., *et al.* (2008) **Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer.** *Oncogene.* 27(3): 253-63.
156. Demichelis, F., Fall, K., Perner, S., *et al.* (2007) **TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort.** *Oncogene.* 26(31): 4596-9.
157. Nam, R.K., Sugar, L., Wang, Z., *et al.* (2007) **Expression of TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression.** *Cancer Biol Ther.* 6(1): 40-5.

158. Wang, J., Cai, Y., Ren, C., *et al.* (2006) **Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer.** *Cancer Res.* 66(17): 8347-51.
159. Gopalan, A., Leversha, M.A., Satagopan, J.M., *et al.* (2009) **TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy.** *Cancer Res.* 69(4): 1400-6.
160. Hessels, D., Smit, F.P., Verhaegh, G.W., *et al.* (2007) **Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer.** *Clin Cancer Res.* 13(17): 5103-8.
161. Sorensen, P.H., Lessnick, S.L., Lopez-Terrada, D., *et al.* (1994) **A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG.** *Nat Genet.* 6(2): 146-51.
162. Baldus, C.D., Liyanarachchi, S., Mrozek, K., *et al.* (2004) **Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(11): 3915-20.
163. Marcucci, G., Maharry, K., Whitman, S.P., *et al.* (2007) **High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study.** *J Clin Oncol.* 25(22): 3337-43.
164. Durocher, D., Taylor, I.A., Sarbassova, D., *et al.* (2000) **The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms.** *Mol Cell.* 6(5): 1169-82.
165. Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., *et al.* (1998) **Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome.** *Cell.* 93(3): 467-76.
166. Lee, J.H. e Lim, D.S. (2006) **Dual role of Nbs1 in the ataxia telangiectasia mutated-dependent DNA damage response.** *FEBS J.* 273(8): 1630-6.

167. Valerie, K. e Povirk, L.F. (2003) **Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair**. *Oncogene*. 22(37): 5792-812.
168. Matsuura, S., Kobayashi, J., Tauchi, H., *et al.* (2004) **Nijmegen breakage syndrome and DNA double strand break repair by NBS1 complex**. *Adv Biophys*. 38: 65-80.
169. Wilda, M., Demuth, I., Concannon, P., *et al.* (2000) **Expression pattern of the Nijmegen breakage syndrome gene, Nbs1, during murine development**. *Hum Mol Genet*. 9(12): 1739-44.
170. Kang, J., Bronson, R.T. e Xu, Y. (2002) **Targeted disruption of NBS1 reveals its roles in mouse development and DNA repair**. *EMBO J*. 21(6): 1447-55.
171. Chen, Y.C., Su, Y.N., Chou, P.C., *et al.* (2005) **Overexpression of NBS1 contributes to transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt**. *J Biol Chem*. 280(37): 32505-11.
172. Dzikiewicz-Krawczyk, A. (2008) **The importance of making ends meet: mutations in genes and altered expression of proteins of the MRN complex and cancer**. *Mutat Res*. 659(3): 262-73.
173. Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., *et al.* (2000) **BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures**. *Genes Dev*. 14(8): 927-39.
174. Lu, J., Wei, Q., Bondy, M.L., *et al.* (2006) **Polymorphisms and haplotypes of the NBS1 gene are associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women  $\leq 55$  years**. *Carcinogenesis*. 27(11): 2209-16.
175. Margulis, V., Lin, J., Yang, H., *et al.* (2008) **Genetic susceptibility to renal cell carcinoma: the role of DNA double-strand break repair pathway**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 17(9): 2366-73.
176. Medina, P.P., Ahrendt, S.A., Pollan, M., *et al.* (2003) **Screening of homologous recombination gene polymorphisms in lung cancer patients reveals an association of the NBS1-185Gln variant and p53 gene mutations**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 12(8): 699-704.

177. Sobti, R.C., Shekari, M., Kordi Tamandani, D.M., *et al.* (2008) **Effect of NBS1 gene polymorphism on the risk of cervix carcinoma in a northern Indian population.** *Int J Biol Markers.* 23(3): 133-9.
178. Forsti, A., Angelini, S., Festa, F., *et al.* (2004) **Single nucleotide polymorphisms in breast cancer.** *Oncol Rep.* 11(4): 917-22.
179. Kuschel, B., Auranen, A., McBride, S., *et al.* (2002) **Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility.** *Hum Mol Genet.* 11(12): 1399-407.
180. Medeiros, R., Morais, A., Vasconcelos, A., *et al.* (2003) **Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the shedding of circulating tumour cells in the blood of prostate cancer patients.** *Cancer Lett.* 189(1): 85-90.
181. Medeiros, R., Morais, A., Vasconcelos, A., *et al.* (2002) **Linkage between polymorphisms in the prostate specific antigen ARE1 gene region, prostate cancer risk, and circulating tumor cells.** *Prostate.* 53(1): 88-94.
182. Medeiros, R., Morais, A., Vasconcelos, A., *et al.* (2002) **The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the susceptibility to prostate cancer of a southern European population.** *J Hum Genet.* 47(8): 413-8.
183. MacGregor, J.T. (2004) **Biomarkers of cancer risk and therapeutic benefit: new technologies, new opportunities, and some challenges.** *Toxicol Pathol.* 32 Suppl 1: 99-105.
184. Botling, J., Edlund, K., Segersten, U., *et al.* (2009) **Impact of thawing on RNA integrity and gene expression analysis in fresh frozen tissue.** *Diagn Mol Pathol.* 18(1): 44-52.
185. Goessl, C., Krause, H., Muller, M., *et al.* (2000) **Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids.** *Cancer Res.* 60(21): 5941-5.
186. Gonzalgo, M.L. e Isaacs, W.B. (2003) **Molecular pathways to prostate cancer.** *J Urol.* 170(6 Pt 1): 2444-52.

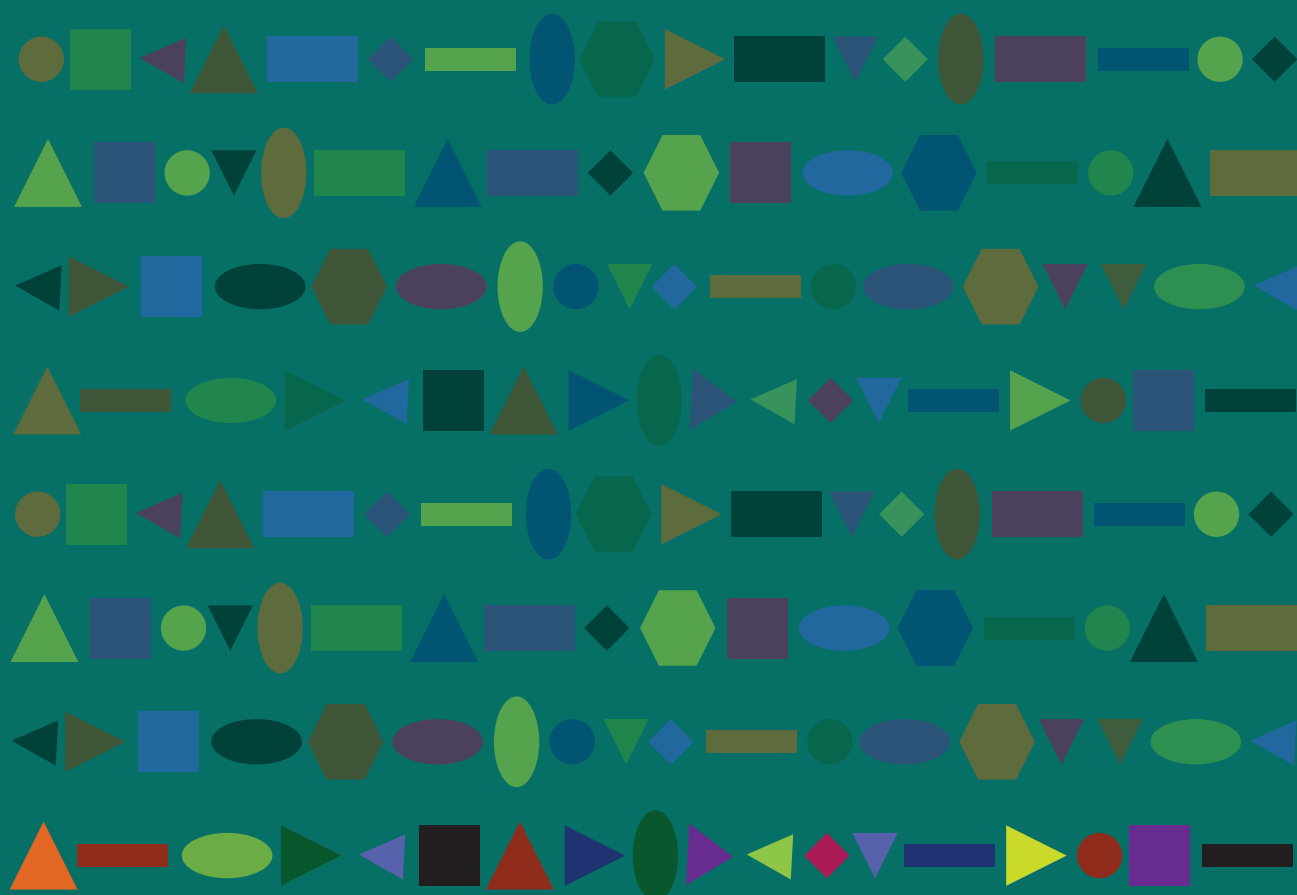
187. Jeronimo, C., Usadel, H., Henrique, R., *et al.* (2002) **Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer.** *Urology*. 60(6): 1131-5.
188. Crocitto, L.E., Korn, D., Kretzner, L., *et al.* (2004) **Prostate cancer molecular markers GSTP1 and hTERT in expressed prostatic secretions as predictors of biopsy results.** *Urology*. 64(4): 821-5.
189. Thomas, C.E., Sexton, W., Benson, K., *et al.* (2010) **Urine collection and processing for protein biomarker discovery and quantification.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 19(4): 953-9.
190. Gomella, L.G., Raj, G.V. e Moreno, J.G. (1997) **Reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen in the management of prostate cancer.** *J Urol*. 158(2): 326-37.
191. Katz, A.E., Olsson, C.A., Raffo, A.J., *et al.* (1994) **Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay.** *Urology*. 43(6): 765-75.
192. Medeiros, M., Sharma, V.K., Ding, R., *et al.* (2003) **Optimization of RNA yield, purity and mRNA copy number by treatment of urine cell pellets with RNAlater.** *J Immunol Methods*. 279(1-2): 135-42.
193. Suslov, O. e Steindler, D.A. (2005) **PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency.** *Nucleic Acids Res*. 33(20): e181.
194. Vispe, S., Yung, T.M., Ritchot, J., *et al.* (2000) **A cellular defense pathway regulating transcription through poly(ADP-ribosyl)ation in response to DNA damage.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(18): 9886-91.
195. Friedberg, E., Walker, G. C., Siede, W., *et al.* (2006) **DNA Repair and Mutagenesis.** ASM Press.
196. Hoeijmakers, J.H. (2001) **Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.** *Nature*. 411(6835): 366-74.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

197. Lan, Q., Shen, M., Berndt, S.I., *et al.* (2005) **Smoky coal exposure, NBS1 polymorphisms, p53 protein accumulation, and lung cancer risk in Xuan Wei, China.** *Lung Cancer.* 49(3): 317-23.
198. Chiang, Y.C., Teng, S.C., Su, Y.N., *et al.* (2003) **c-Myc directly regulates the transcription of the NBS1 gene involved in DNA double-strand break repair.** *J Biol Chem.* 278(21): 19286-91.
199. Shastry, B.S. (2002) **SNP alleles in human disease and evolution.** *J Hum Genet.* 47(11): 561-6.

## 8. ANEXOS



## 8.1 Anexo I

### Procedimentos laboratoriais

#### 8.1.1 Processamento dos *pellets* armazenados em *RNAlater* através do equipamento MagNA Lyser

O instrumento MagNA Lyser (*Roche Applied Science*, Cat. Nº 03358968001) foi especialmente desenhado para a extracção de ácidos nucleicos, provocando a ruptura de células e tecidos. Uma vez que a solução de armazenamento *RNAlater* não promove a lise celular, foi necessário recorrer a este aparelho de modo a possibilitar a libertação de RNA.

Para tal, adicionaram-se 200 µL da solução MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer (*Roche Applied Science*, Cat. Nº 04805160001) a cada *pellet*, transferindo-se esta mistura para uma MagNA Lyser Green Bead. De seguida, ajustou-se o aparelho para 6500 rpm durante 30s, realizando-se este processo duas vezes; entre os passos de lise as amostras foram colocadas em gelo. Posteriormente centrifugaram-se as amostras à velocidade máxima, durante 10s, de forma a reduzir a espuma formada no passo anterior. Transferiu-se depois cada amostra para um *ependorf* (1,5mL), ao qual se adicionaram 20µL de Proteinase K (12U), seguido de um passo de incubação a 55-66°C, até uma completa dissolução da amostra (1-2h). Por fim as amostras seguiram os vários métodos de extracção testados neste trabalho.

#### 8.1.2 Quantificação de células da urina em Câmara de *Newbauer*

Para realizar a quantificação celular recolheram-se 7,5 µL do *pellet* obtido após lavagem com PBS, ao qual se adicionaram 7,5 µL do corante *Trypan Blue*. Após homogeneização, dividiu-se-se o volume total pelos dois lados de uma câmara de contagem de *Newbauer*. Procedeu-se em seguida à contagem, num microscópio invertido, do número de células presentes nos dois campos equidistantes da câmara de contagem de *Newbauer* e calculou-se por fim o número de células presente na amostra utilizada, extrapolando esse mesmo valor para o *pellet* inicial.

### 8.1.3 Pré-Amplificação do cDNA

Os estudos de expressão genética são muitas vezes limitados pela quantidade de RNA que se consegue extrair a partir da amostra inicial. Para ultrapassar esta limitação recorreu-se ao *kit* de pré-amplificação TaqMan® PreAmp Master Mix (*Applied Biosystems*<sup>TM</sup> 4391128), que serve para amplificar fragmentos de cDNA, de forma a facilitar a detecção de um determinado gene por Real-Time PCR.

Para a realização da *pool* dos *assays* de expressão, combinaram-se iguais volumes de cada um dos *assay* (20X) desejados, procedendo-se de seguida a uma diluição com o tampão TE, de forma a obter uma concentração final para cada *assay* de 0,2X.

Testaram-se duas condições de pré-amplificação, cujas condições se apresentam no quadro XIII:

Quadro XIII: Condições de pré-amplificação segundo o número de ciclos desejado

| Nº de ciclos de pré-aplicação | Volume final do produto de pré-amplificação diluído (mL) | Factor de diluição do cDNA pré-amplificado | Nº de ciclos de Real-Time PCR |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------|
| 10                            | 0,250                                                    | 1:5                                        | 50                            |
| 14                            | 1,0                                                      | 1:20                                       | 200                           |

De seguida, prepararam-se as reacções de pré-amplificação, utilizando para tal 25 µL de TaqMan® PreAmp Master Mix (*Applied Biosystems*<sup>TM</sup> 4391128), 12,5 µL da *pool* de *assays* preparada anteriormente, e 250 ng de cDNA diluídos num volume final de 12,5 µL com água sem nucleases. Centrifugaram-se as misturas de reacção e efectuaram-se as reacções de pré-amplificação, que consistiram num passo de pré-desnaturação a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 10 ou 14 ciclos, conforme o desejado, de desnaturação a 95°C durante 10 segundos e de emparelhamento/extensão a 60°C durante 14 minutos.

Após a reacção terminar, colocaram-se as amostras numa placa de gelo e diluíram-se as soluções de reacção segundo os ciclos seleccionados (tabela X). Prepararam-se de seguida as reacções de Real-Time PCR, preparando uma mistura com volume final de 20 µL, contendo 10 µL de TaqMan Gene Expression Master Mix (*Applied Biosystems*, PN 4369016), 1 µL de *assay* de expressão TaqMan® (20X), 5 µL do produto

de cDNA pré-amplificado e 4 µL de água sem nucleases. As condições da reacção. As condições de reacção foram as seguintes: 95 °C durante 10 minutos, seguido de 10 ou 14 ciclos (conforme o desejado) de 95 °C durante 15 segundos alternando com 60 °C durante 4 minutos. A expressão foi detectada e analisada através do software StepOne (versão 2.1).

## 8.2 Anexo II

### Extracção de RNA

#### 8.2.1 RNeasy® Mini Kit (Qiagen)

O *kit* RNeasy® Mini Kit (Qiagen® 74106) é utilizado para purificação de RNA a partir de diversas amostras, recorrendo a uma tecnologia que combina as propriedades de ligação da membrana de sílica com a tecnologia de velocidade *microspin*.

O primeiro passo consistiu em descongelar as amostras processadas durante cerca de 5 minutos à temperatura ambiente, de forma a promover a dissociação dos complexos nucleoproteicos. De seguida, adicionaram-se 200 µL de clorofórmio a cada amostra e homogeneizaram-se por meio de agitação no vórtex, deixando depois em repouso à temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. Procedeu-se à centrifugação das amostras a 12 000 G, durante 15 minutos e à temperatura de 4 °C, sendo que esta centrifugação serviu para promover a separação das amostras em três fases: uma fase orgânica avermelhada constituída por proteínas, seguida de uma fase intermédia branca formada por DNA e finalmente uma fase aquosa superior que contém RNA. Transferiu-se o sobrenadante para um novo *ependorf*, ao qual se adicionaram 600 µL de etanol a 70% (v/v) e procedeu-se novamente à homogeneização das amostras, por meio de agitação no vórtex. Transferiram-se depois 700 µL da amostra para uma coluna fornecida pelo *kit*, colocada num tubo colector de 2 mL, e centrifugaram-se todas as amostras a 10 000 rpm durante 15 segundos à temperatura ambiente. Rejeitou-se o *flow-through* e repetiu-se a centrifugação anterior com a restante amostra. Em seguida adicionaram-se 700 µL da solução tampão RW1 à coluna e centrifugaram-se todas as amostras a 10 000 rpm durante 15 segundos à temperatura ambiente. Descartou-se o *flow-through* e

adicionaram-se 500 µL da solução tampão RPE à coluna, centrifugando-se mais uma vez a 10 000 rpm durante 15 segundos à temperatura ambiente e descartando-se no final o *flow through*. Repetiu-se o passo anterior, desta vez com uma centrifugação a 10 000 rpm durante 2 minutos à temperatura ambiente e no final colocaram-se as colunas em novos tubos colectores de 2 mL, e centrifugaram-se todas as amostras à velocidade máxima durante 1 minuto à temperatura ambiente. No final colocaram-se as colunas em *ependorfs* de 1,5 mL e adicionaram-se 30 µL de água sem RNase (Qiagen® 129112) directamente à membrana da coluna, centrifugando-se a 10 000 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente. Repetiu-se o passo anterior e guardaram-se as amostras de RNA a -20°C.

### 8.2.2 QIAmp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Tal como o *kit* anterior, o *kit* QIAmp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen® 52904) também é utilizado para purificação de RNA a partir de diversas amostras, recorrendo a uma tecnologia que combina as propriedades de ligação da membrana de sílica com a tecnologia de velocidade *microspin*.

Após o descongelamento das amostras, adicionaram-se 560 µL da solução tampão AVL com o *carrier* de RNA (glicogénio) a 140 µL de amostra e procedeu-se à homogeneização por meio de agitação no vórtex durante cerca de 15 segundos. Em seguida, incubaram-se as amostras à temperatura ambiente durante 10 minutos, de forma a promover a lise completa das células e inactivar as RNases. Fez-se uma breve centrifugação a todas as amostras, de forma a remover as gotas existentes nas tampas dos *ependorfs*, e adicionaram-se 560 µL de etanol (96-100%) seguido de homogeneização por meio de agitação no vórtex. Fez-se novamente uma breve centrifugação e transferiram-se 630 µL da solução obtida para uma coluna QIAamp Mini spin, colocada num tubo colector de 2 mL, procedendo-se em seguida a uma centrifugação a 8000 rpm durante 1 min à temperatura ambiente. Substituíram-se os tubos colectores de 2 mL e repetiu-se o passo anterior. Adicionaram-se depois 500 µL da solução tampão AW1 e centrifugaram-se todas as amostras a 6000 rpm durante 1 min à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 500 µL da solução tampão AW2 e centrifugaram-se mais uma vez todas as amostras, desta vez a 14 000 rpm durante 3 min à temperatura ambiente.

Descartaram-se os tubos com o filtrado e colocaram-se as colunas em novos tubos colectores de 2 mL, centrifugando-se a máxima velocidade durante 1 min à temperatura ambiente. Em seguida, colocaram-se as colunas em *eppendorfs* de 1,5 mL e adicionaram-se 60 µL da solução tampão AVE, incubando-se as soluções à temperatura ambiente durante 1 min, à qual se seguiu uma centrifugação a 8 000 rpm durante 1 minuto. Por fim, descartaram-se as colunas e armazenaram-se as amostras de RNA a -20°C.

### 8.3 Anexo III

#### Soluções

##### AKE:

NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> 82,9 g/L (Merck 101146)

KHCO<sub>3</sub> 10 g/L (Merck 48540500)

EDTA 0,37 g/L (Merck 108418)

##### PBS:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,48 g/L (Merck 1065860500)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,495 g/L (Merck 63460500)

NaCl 7,2 g/L (Panreac cod131659)

##### TBE 10x:

Tris Base 108 g/L (Merck 1083821000)

Ácido Bórico 55 g/L (Merck 1001651000)

EDTA 6,72 g/L (SIGMA E-1644)



Joana Raquel Faria da Silva

2010