



U. PORTO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO



ESTUDO DE POLIMORFISMOS FUNCIONAIS NOS GENES *EGF* E *TGFB1* NA SUSCEPTIBILIDADE, AGRESSIVIDADE E DESENVOLVIMENTO DE ANDROGÉNIO-INDEPENDÊNCIA

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E FARMACOGENÓMICA DO CANCRO DA PRÓSTATA:

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E FARMACOGENÓMICA DO CANCRO DA PRÓSTATA:
ESTUDO DE POLIMORFISMOS FUNCIONAIS NOS GENES *EGF* E *TGFB1* NA
SUSCEPTIBILIDADE, AGRESSIVIDADE E DESENVOLVIMENTO DE ANDROGÉNIO-
INDEPENDÊNCIA**

ANA LUÍSA PEREIRA TEIXEIRA

Dissertação de Mestrado em Oncologia

*Aos meus pais, irmão, namorado,
família e amigos.*

ANA LUÍSA PEREIRA TEIXEIRA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E FARMACOGENÓMICA DO
CANCRO DA PRÓSTATA:
ESTUDO DE POLIMORFISMOS FUNCIONAIS NOS GENES *EGF* E *TGFB1*
NA SUSCEPTIBILIDADE, AGRESSIVIDADE E DESENVOLVIMENTO DE
ANDROGÉNIO-INDEPENDÊNCIA**

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 Auxiliar Convidado com Agregação.

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

INFORMAÇÃO TÉCNICA

TÍTULO:

Epidemiologia Molecular e Farmacogenómica do Cancro da Próstata:
Estudo de Polimorfismos Funcionais nos Genes *EGF* e *TGFB1* na Susceptibilidade, Agressividade e
Desenvolvimento de Androgénio-Independência
Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre, em Oncologia,
apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto

AUTOR:

Ana Luísa Pereira Teixeira

DATA:

Setembro de 2008

EDITOR: Ana Luísa Pereira Teixeira

MORADA: Rua de Perlinhas nº97 2º

LOCALIDADE: Rio Tinto

CÓDIGO POSTAL: 4435-393 Rio Tinto

CORREIO ELECTRÓNICO: a-luisa-teixeira@clix.pt; analuisaperteixeira@hotmail.com

TELEMÓVEL: +351 917955241

1ª EDIÇÃO, Setembro de 2008

Agradecimentos

Com o término do Mestrado em Oncologia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, não posso deixar de agradecer a todos os que contribuíram de modo directo ou indirecto para o alcançar desta minha nova etapa académica e científica.

Deste modo, agradeço à comissão Coordenadora do Mestrado em Oncologia, sob a pessoa do Professor Doutor Carlos Lopes, a oportunidade de frequentar o mesmo, permitindo o meu enriquecimento científico e aquisição de conhecimentos importantes para a minha formação.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e meu orientador, por me acolher na sua “jovem” equipa, pela confiança depositada, por acreditar no meu trabalho e nas novas ideias que foram surgindo nestes dois últimos anos de trabalho.

Ao Programa de Apoio à Investigação Oncológica do Norte de Portugal, Liga Portuguesa Contra o Cancro - Núcleo Regional do Norte, por me conceder a bolsa que permitiu a realização deste trabalho e por fomentar a Investigação em Portugal.

A toda a “jovem” equipa do Grupo de Oncologia Molecular, que permite que se realize um bom trabalho de um modo descontraído, mas eficiente. Em especial ao Dr. Ricardo Ribeiro, colega e amigo, que muito ajudou no meu crescimento científico nestes últimos anos e cuja ajuda foi essencial para realização deste trabalho. À Dra. Mónica Gomes que se revelou uma amiga única, com quem é possível rir até nos momentos mais complicados e imprevisíveis. A todos aqueles que nos últimos tempos se revelaram óptimos companheiros de trabalho e de amizade, trabalhar assim é muito mais estimulante e gratificante.

Às minhas amigas e companheiras de importantes fases da minha vida, que apesar, das poucas oportunidades de estarmos juntas actualmente estão sempre presentes em pensamento e coração. A todos os amigos que foram surgindo ao longo do tempo e que permaneceram na minha vida tornando-a tão mais positiva.

Aos meus pais, por todo o apoio e por tudo aquilo que me ajudaram a conquistar ao longo da minha vida, sem eles não tinha conseguido. Ao Joãozinho, sem o qual a minha vida não era tão alegre e estimulante.

Aos meus avós e família, em especial à minha tia, Professora Doutora Fátima Pinheiro por acreditar em mim e pelo apoio, sentindo que os meus objectivos e o meu entusiasmo eram também os seus.

Ao Rui por tudo aquilo que vivemos juntos e por tudo aquilo que somos juntos.

Obrigada a todos os que fazem com que a minha vida seja tão positiva

A

AR- Receptor de androgénios

aLHRH- Agonistas da hormona libertadora da hormona luteinizante

AI- Androgénio-independência

AD- Androgénio-dependência

Akt- Cínases activadas por mitogénios

A- Adenina

AP- Fracção atribuível

C

CaP- Cancro da próstata

CaPAI- Cancro da próstata androgénio-independente

CDKs- Cínases dependentes de ciclina

C- Citosina

D

DNA- Ácido desoxirribonucléico

DHT- Di-hidrotestosterona

dNTP's – Desoxinucleotídeos-trifosfato

E

EGF- Factor de crescimento epidérmico

EGFR- Receptor do factor de crescimento epidérmico

G

GnRH- Hormona libertadora de gonadotrofinas

G- Guanina

I

IC- Intervalo de confiança

ILD- Intervalo livre de doença

L

LH- Hormona luteinizante

M

MAPK – cinases de proteínas activadas por mitogénios

O

OR- “Odds ratio”

P

PSA- Antígeno específico da próstata

PI3K- cinase de fosfatidilinositol 3-OH

pRb- Proteína retinoblastoma

PCR-RFLP- “Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism”

pb- Pares de bases

PRF- Percentagem do factor de risco nos casos

PIN- Neoplasia intraepitelial da próstata

R

Real-Time PCR- “Real-Time Polymerase Chain Reaction”

S

SNP’s- “Single nucleotide polymorphisms”

SHBG- Globulina de ligação a hormona sexual

T

TBA- Terapia de bloqueio androgénico

TGF β 1- Factor de crescimento de transformação beta 1

T β RI- Receptor do factor de crescimento de transformação beta 1 do tipo I

T β RII- Receptor do factor de crescimento de transformação beta 1 do tipo II

T- Timina

TGF α - Factor de crescimento de transformação alfa

V

VEGF- Factor de crescimento do endotélio vascular

Resumo	XXI
Abstract	XXIII
Résumé	XXV
1. Introdução	1
1.1. Cancro: Conceitos Gerais	1
1.2. Oncobiologia Molecular	1
1.2.1. Carcinogénese	1
1.2.2. Variabilidade Genética Individual: Repercussão no Microambiente Tumoral	4
1.3. Cancro da Próstata	5
1.3.1. Epidemiologia e História Natural da Doença	5
1.3.2. Mecanismos de Desenvolvimento de Androgénio-independência ...	10
1.4. Factor de Crescimento Epidérmico	16
1.5. Factor de Crescimento de Transformação Beta 1	19
1.6. Polimorfismos Funcionais nos Genes <i>EGF</i> e <i>TGFB1</i>	23
2. Objectivos	27
2.1. Objectivo Geral	27
2.2. Objectivos Específicos	27
3. Material e Métodos	29
3.1. População	29
3.2. Procedimentos Laboratoriais	30

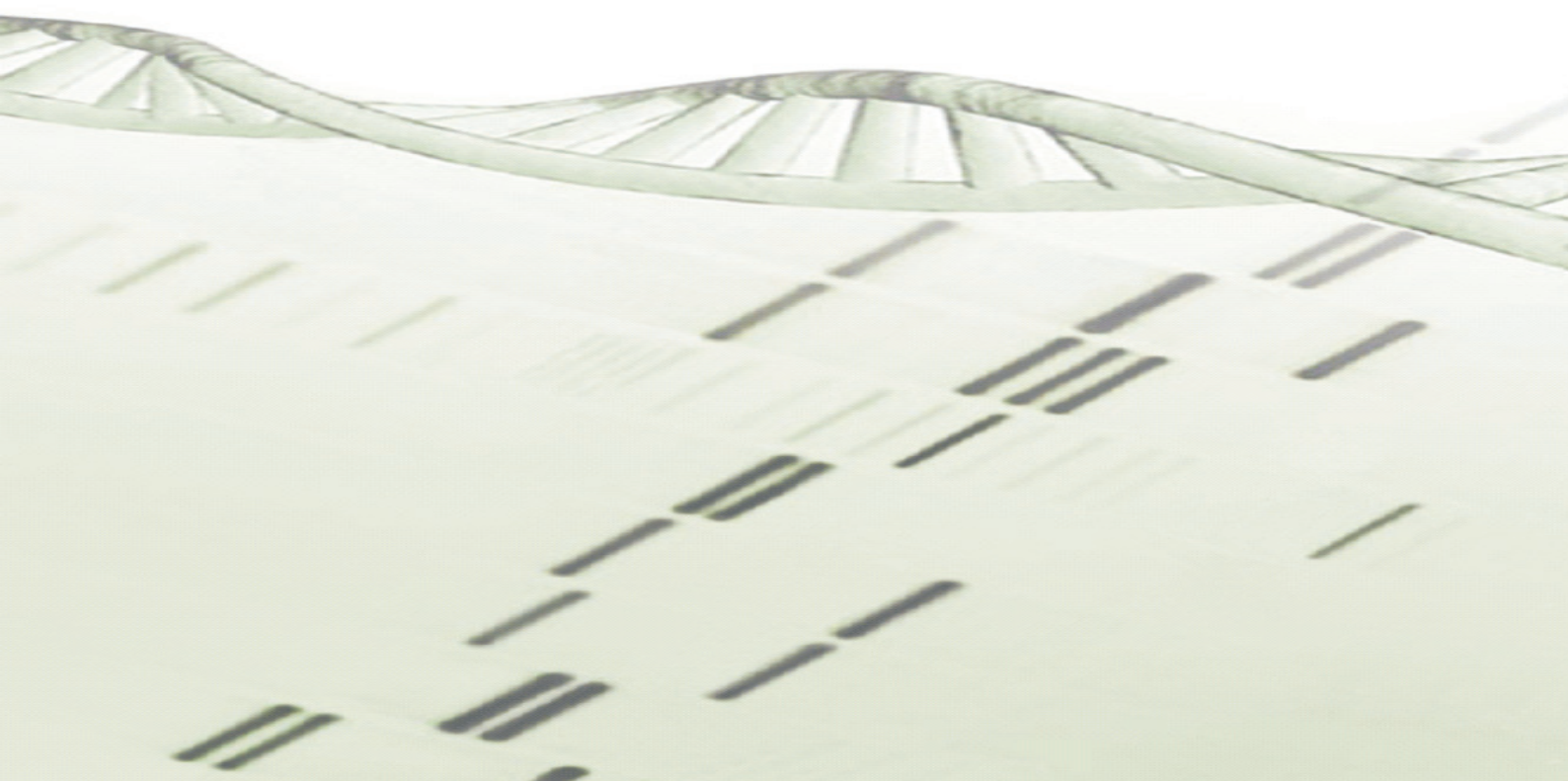
3.2.1. Extracção de DNA Genómico	30
3.2.2. Genotipagem do Polimorfismo <i>EGF+61G>A</i>	30
3.2.3. Genotipagem do Polimorfismo <i>TGFB1+869T>C</i>	33
3.3. Análise Estatística	34
4. Resultados	37
4.1. Associação dos Polimorfismos <i>EGF+61G>A</i> e <i>TGFB1+869T>C</i> na Susceptibilidade e Agressividade de Cancro da Próstata	37
4.2. Distribuição das Frequências Genotípicas dos Polimorfismos <i>EGF+61G>A</i> e <i>TGFB1+869T>C</i> em Populações Controlo	43
4.3. Associação dos Polimorfismos <i>EGF+61G>A</i> e <i>TGFB1+869T>C</i> na Resposta à Terapia de Bloqueio Androgénico	45
5. Discussão	49
5.1. Distribuição das Frequências Genotípicas dos Polimorfismos <i>EGF+61G>A</i> e <i>TGFB1+869T>C</i> em Populações Controlo	50
5.2. Associação dos Polimorfismos <i>EGF+61G>A</i> e <i>TGFB1+869T>C</i> na Susceptibilidade e Agressividade de Cancro da Próstata	52
5.3. Associação dos Polimorfismos <i>EGF+61G>A</i> e <i>TGFB1+869T>C</i> na Resposta à Terapia de Bloqueio Androgénico	55
6. Conclusões e Perspectivas Futuras	59
7. Estudo Prospectivo <i>in vitro</i>	61
8. Referências Bibliográficas	65
9. Anexos	79

Figura 1. Representação esquemática do processo de carcinogénese	2
Figura 2. Taxas de incidência de cancro da próstata por 100.000 habitantes ..	6
Figura 3. Representação esquemática das zonas que constituem a próstata ..	7
Figura 4. Mecanismo de regulação da testosterona	10
Figura 5. Activação da via de sinalização mediada pelos androgénios	11
Figura 6. Mecanismos de desenvolvimento de resistência à terapia de bloqueio androgénico (TBA)	13
Figura 7. Complexificação e interacção das vias de sinalização intracelulares nos Vertebrados no decurso do processo natural evolutivo	14
Figura 8. Alteração da activação de vias de sinalização intracelulares durante a progressão tumoral de tumores prostáticos	15
Figura 9. Localização do gene <i>EGF</i> no cromossoma 4	16
Figura 10. Via de sinalização intracelular activada pelo EGF	17
Figura 11. Percentagem de expressão do receptor EGFR em diferentes modelos tumorais	18
Figura 12. Agentes de terapia dirigida e respectivo alvo, usados em diferentes modelos tumorais	19
Figura 13. Localização do gene <i>TGFB1</i> no cromossoma 19	19
Figura 14. Via de sinalização intracelular activada pelo TGF β 1	20
Figura 15. Influência do TGF β 1 no ciclo celular	22

Figura 16. Terapias dirigidas e respectivo alvo, na via de sinalização mediada pelo TGF β 1	23
Figura 17. Gel de agarose a 1,5% (p/v), mostrando a banda de 242 pb que corresponde à região de <i>EGF+61G>A</i> amplificada por PCR	31
Figura 18. Gel de agarose a 3% (p/v), após PCR-RFLP, observando-se os 3 genótipos possíveis do polimorfismo <i>EGF+61G>A</i>	32
Figura 19. Representação de um “Real-Time PCR” para o polimorfismo <i>TGFB1+869T>C</i>	33
Figura 20. Estudo comparativo das frequências genotípicas do polimorfismo <i>EGF+61G>A</i> em populações controlo	43
Figura 21. Estudo comparativo das frequências genotípicas do polimorfismo <i>TGFB1+869T>C</i> em populações controlo	44
Figura 22. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste Log Rank após terapia de bloqueio androgénico (TBA) em doentes com cancro da próstata: influência do polimorfismo <i>EGF+61G>A</i>	45
Figura 23. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste Log Rank após terapia de bloqueio androgénico (TBA) em doentes com cancro da próstata: influência do polimorfismo <i>TGFB1+869T>C</i>	46
Figura 24. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste Log Rank após terapia de bloqueio androgénico (TBA) em doentes com cancro da próstata: influência dos polimorfismos <i>EGF+61G>A</i> e <i>TGFB1+869T>C</i> combinados ...	47

Quadro I. Combinação dos polimorfismos <i>EGF+61G>A</i> e <i>TGF+869T>C</i> segundo um perfil genético de proliferação celular	35
Quadro II. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo <i>EGF+61G>A</i> no grupo controlo e no grupo de casos	37
Quadro III. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo <i>TGFB1+869T>C</i> no grupo controlo e no grupo de casos	38
Quadro IV. Distribuição das frequências genótípicas dos diferentes perfis de proliferação celular, definidos com base no agrupamento dos polimorfismos <i>EGF+61G>A</i> - <i>TGFB1+869T>C</i> , e respectivo “odds ratio” (OR)	39
Quadro V. Risco para os portadores do alelo G do polimorfismo <i>EGF+61G>A</i> no momento do diagnóstico apresentarem doença avançada, doença metastática ou grau de Gleason \geq 7	40
Quadro VI. “Odds ratio” (OR) e respectivos intervalos de confiança para os portadores T serem diagnosticados com doença agressiva (doença avançada, metástases, Gleason \geq 7) por comparação com o grupo controlo	41
Quadro VII. Risco para os portadores do perfil genético de alta proliferação no momento do diagnóstico apresentarem doença agressiva (doença avançada, metástases, Gleason \geq 7) por comparação com o grupo controlo	42
Quadro VIII. Caracterização genotípica das células de cancro da próstata PC-3	62

Resumo



O cancro da próstata (CaP) é a segunda neoplasia maligna mais frequente no homem. Na sua etiologia encontram-se envolvidos factores ambientais, hormonais e genéticos. A terapia de bloqueio androgénico (TBA), que consiste na supressão da produção endógena e da acção dos androgénios é frequentemente utilizada em estadios avançados da doença. Contudo, uma percentagem significativa de doentes desenvolve resistência à TBA, resultando em cancro da próstata androgénio-independente (CaPAI). Este é uma forma letal de CaP, que possui elevado potencial de progressão e metastização e, actualmente, com limitadas opções terapêuticas. A progressão destes tumores poderá ser estimulada pela acção autócrina e parácrina de factores de crescimento responsáveis pela activação de cascatas de sinalização que promovem a proliferação, sobrevivência e migração celular. A acção de ligandos, como o factor de crescimento epidérmico (EGF) e o factor de crescimento de transformação beta 1 (TGF β 1), representam potenciais vias alternativas implicadas no processo de desenvolvimento de androgénio-independência (AI).

O EGF e o TGF β 1 possuem um papel central na proliferação celular, com acções antagónicas. O EGF é responsável pela activação de vias de sinalização que culminam na proliferação e tumorigénese de células epiteliais, enquanto que o TGF β 1 desempenha importantes funções na regulação do ciclo celular, sendo responsável pela sua paragem em G1, inibindo conseqüentemente o crescimento celular. Modificações no microambiente tumoral devido à variação na concentração relativa de EGF e TGF β 1, por influência dos polimorfismos funcionais *EGF+61G>A* e *TGFB+869T>C* poderão condicionar a proliferação tumoral.

No presente trabalho foi realizado um estudo do tipo caso-controlo, com o objectivo de analisar a influência dos polimorfismos funcionais *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* na susceptibilidade para o desenvolvimento de CaP e um estudo de sobrevivida retrospectivo para avaliar a resposta dos doentes com CaP à TBA.

Foram analisadas amostras de DNA de quatrocentos e trinta e seis (436) homens, dos quais cento e vinte e três (123) apresentavam diagnóstico histopatológico de CaP e trezentos e treze (313) sem doença oncológica. A análise dos polimorfismos funcionais *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* foi realizada por PCR-RFLP e "Real-time PCR", respectivamente.

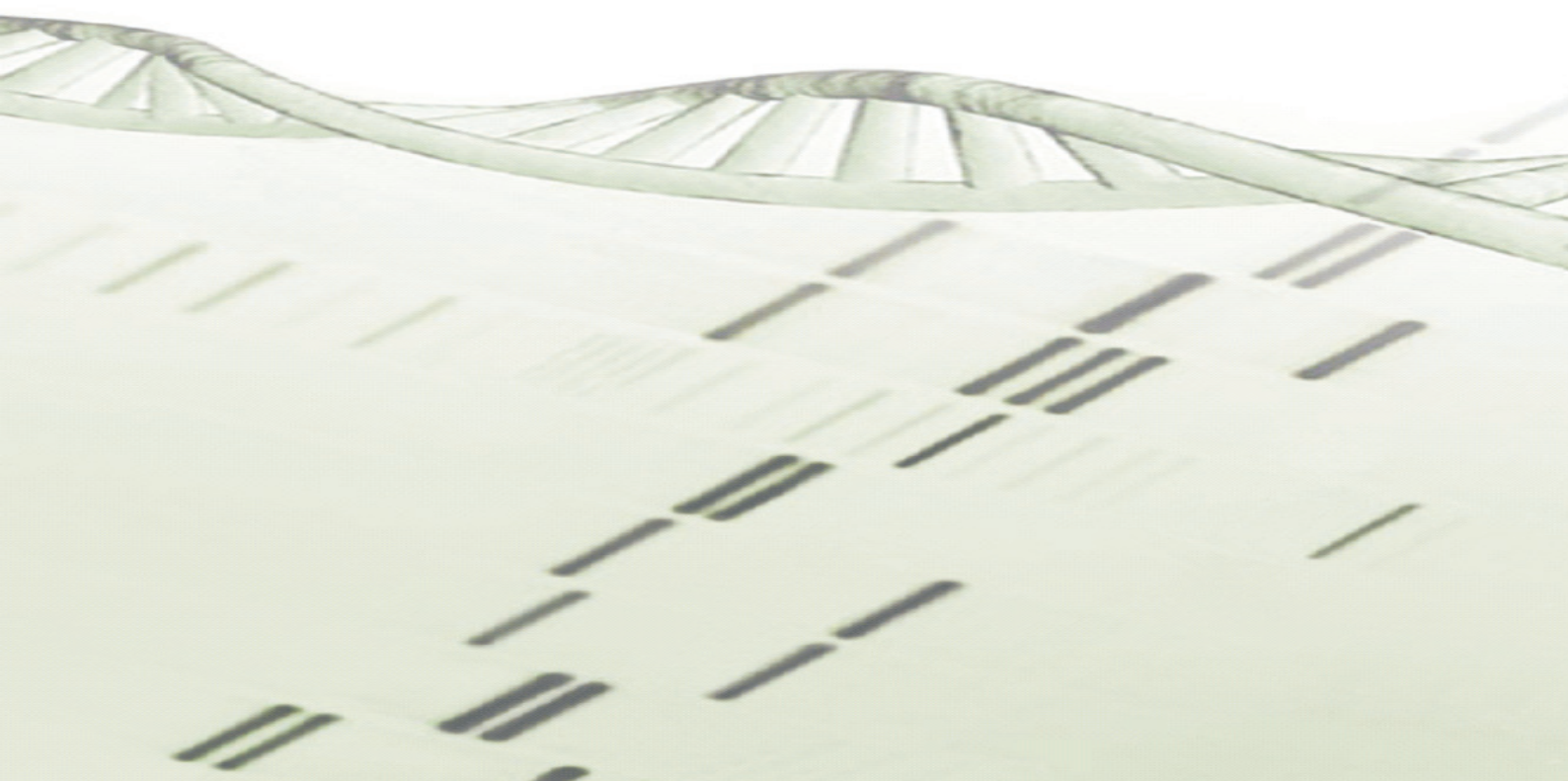
Relativamente ao polimorfismo *EGF+61G>A*, os resultados mostram que os portadores do alelo G (modelo recessivo funcional) apresentam risco aumentado para CaP (OR=1.81, *P*=0.010) e para no momento do diagnóstico apresentarem doença com

fenótipo mais agressivo, isto é, doença avançada, metastização à distância e Gleason \geq 7 (OR=1.74, $P=0.021$; OR=2.33, $P=0.038$; OR=2.76, $P=0.002$, respectivamente). Quanto ao polimorfismo funcional *TGFB1+869T>C* não se verificaram diferenças com significado estatístico. Contudo, a análise da combinação dos polimorfismos funcionais dos genes *EGF* e *TGFB1*, segundo um perfil genético de proliferação celular, revelou que os portadores de um perfil de média e alta proliferação têm risco aumentado para o desenvolvimento de CaP comparativamente com os portadores de um perfil de baixa proliferação (OR= 4.97, $P=0.019$; OR=5.68, $P=0.010$, respectivamente). Os portadores do perfil genético de alta proliferação têm risco aumentado para apresentar Gleason \geq 7 no momento do diagnóstico (OR=1.83, $P=0.030$).

A análise univariada do intervalo livre de doença (ILD) até AI em doentes submetidos a TBA segundo o método de Kaplan-Meier, demonstrou que o tempo até recidiva e AI era inferior nos portadores G, comparativamente aos homozigóticos AA, relativamente ao polimorfismo *EGF+61G>A* ($P=0.018$). Os portadores de um perfil de alta proliferação apresentam também um ILD significativamente inferior aos portadores de baixa/média proliferação, desenvolvendo AI mais cedo (HR=3.0, $P=0.019$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, entre as curvas de sobrevivência dos homozigóticos C *versus* portadores T, relativamente ao polimorfismo *TGFB1+869T>C* ($P=0.452$).

A avaliação do perfil genético individual relativamente aos polimorfismos funcionais *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* poderá contribuir para a compreensão de eventuais mecanismos de regulação e desenvolvimento tumoral de CaP e o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de resposta à TBA.

Abstract



Prostate Cancer (PC) is the second most common cancer affecting men in the western world. Environmental, hormonal and genetic factors are involved in its aetiology. Androgen blockade therapy (ABT), which consists in the suppression of androgens production and action, is frequently used in advanced stages, albeit most men will eventually fail this therapy and die from recurrent androgen independent prostate cancer (AIPC). The AIPC is a lethal form of PC with high potential of progression and metastization, with limited therapeutic options. Its progression can be stimulated through autocrine and paracrine mechanisms mediated by growth factors. These growth factors can activate several signalling pathways inducing proliferation, survival and migration pathways. Growth factors such epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) are potential alternative pathways involved in the progression to androgen-independence (AI).

EGF and TGF β 1 are key players, with opposite roles in cell proliferation. While EGF activates several intracellular pathways leading to proliferation and tumorigenesis of epithelial cells, TGF β 1 plays an important role in cell cycle regulation arresting it at G1 phase, thereby inhibiting epithelial prostate cell growth. Changes in tumoral microenvironmental can be the consequence of functional polymorphisms like *EGF+61G>A* and *TGFB1+869T>C*, which can modify the relative concentration of EGF and TGF β 1 and tumor proliferation.

The aim of this study was to analyse the influence of *EGF+61G>A* and *TGFB1+869T>C* polymorphisms in PC susceptibility, aggressiveness and the response to ABT.

We conducted a case-control study with four hundred and thirty six (436) men. One hundred and twenty three (123) men with histopathological diagnose of PC and three hundred and thirteen (313) men without neoplastic disease. The *EGF+61G>A* and *TGFB1+869T>C* polymorphisms were detected through PCR-RFLP and Real-Time PCR, respectively.

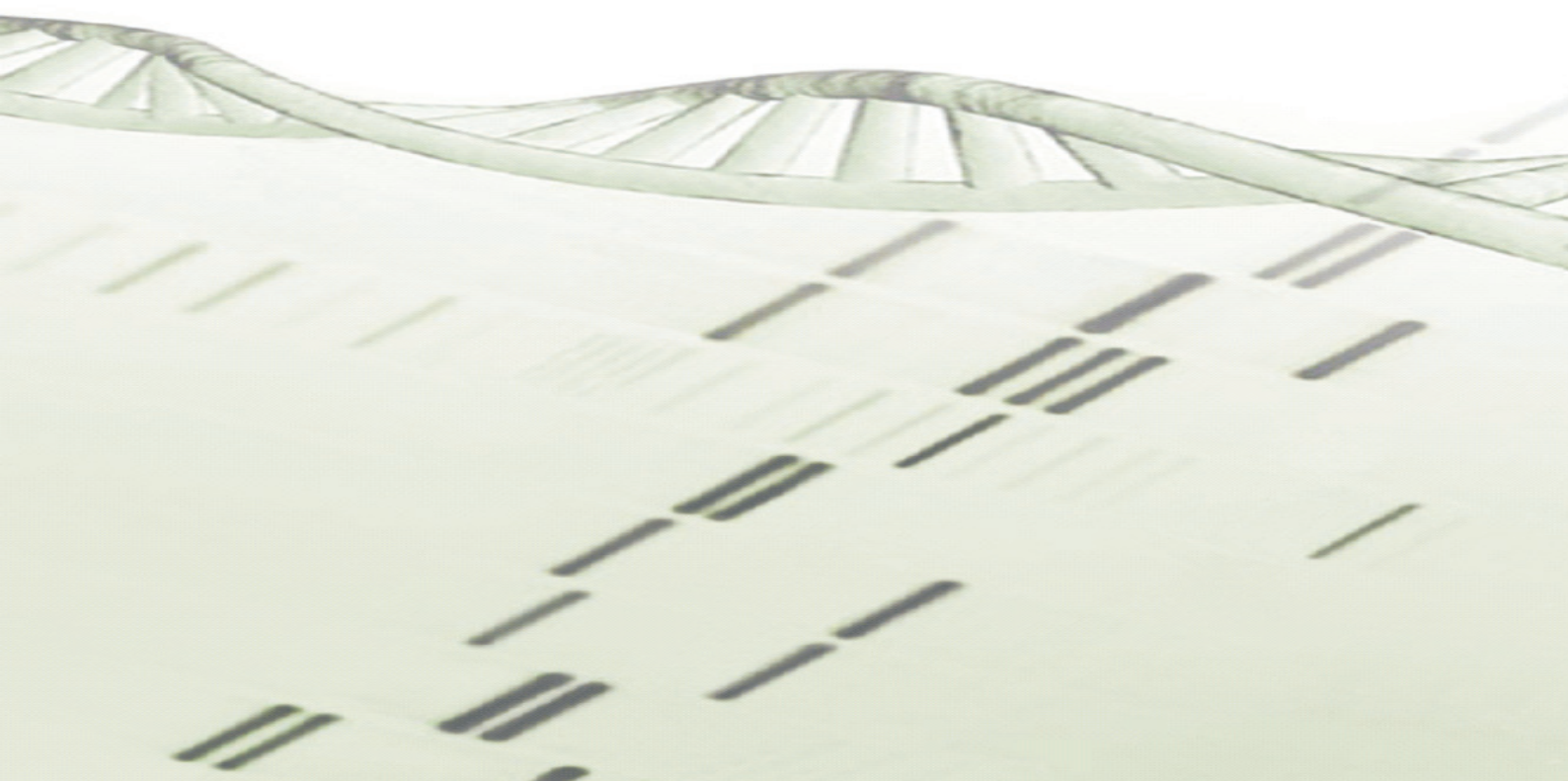
Concerning the *EGF+61G>A* polymorphism, results show that G carriers have a higher risk to develop PC (OR=1.81, $P=0.010$) and for being diagnosed with an aggressive disease phenotype (advanced disease, metastization and Gleason \geq 7) (OR=1.74, $P=0.021$; OR=2.33, $P=0.038$; OR=2.76, $P=0.002$, respectively). The analysis of *TGFB1+869T>C* polymorphism showed lack of statistical significance. However, the combined analysis of *EGF* and *TGFB1* polymorphisms according to a functional proliferative genetic profile, showed that the intermediate and high proliferation genetic

profile carriers have a higher risk to develop PC (OR= 4.97, $P=0.019$; OR=5.68, $P=0.010$, respectively). High proliferative genetic profile carriers have higher risk for being diagnosed with Gleason \geq 7 (OR=1.83, $P=0.030$).

Univariate analysis of disease free interval (DFI) until AI in patients submitted to ABT according to Kaplan-Meier method show that the time to AI was lower in G carriers when compared to A homozygous for *EGF+61G>A* ($P=0.018$). The high proliferative genetic profile carriers have a significantly lower ILD than low/median proliferative genetic profile carriers, developing AI earlier than the others (HR=3.0, $P=0.019$). Survival curves show no evidence of differences between C homozygous and T carriers for *TGFB1+869T>C* polymorphism ($P=0.452$).

The evaluation of individual genetic profile according to the *EGF+61G>A* and *TGFB1+869T>C* functional polymorphisms can elucidate us about mechanisms involved in tumoral regulation and development as well as the molecular mechanisms involved in ABT response.

Résumé



Le cancer de la prostate (CaP) est le second néoplasme maligne plus fréquent chez l'homme. Dans la étiologie se trouvent d'engagés facteurs environnementaux, hormonaux et génétiques. La thérapie de bloque androgénique (TBA), qui consiste à la suppression de la production endogène et de l'action des androgènes est fréquemment utilisé dans des stades avancés de la maladie. Néanmoins, un pourcentage significatif de malades développe résistance à TBA, en résultant dans cancer de la prostate androgène-indépendance (CaPAI), qui est une forme létale de CaP, qui possède élevé potentiel de progression et métastases du cancer, et à l'heure actuelle avec limitée des options thérapeutiques. La progression de ces tumeurs pourra être stimulée par l'action autocrine et paracrine de facteurs de croissance, responsables par l'activation de cascades de signalisation qui promeuvent la prolifération, la survie et la migration cellulaire. L'action de ligands comme le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de croissance de transformation bêta 1 (TGF β 1), représentent potentielles manières alternatives impliquées dans le processus de développement d'androgène-indépendance (AI).

EGF et TGF β 1 possèdent un papier central dans la prolifération cellulaire, avec des actions antagoniques. EGF est responsable de l'activation de manières de signalisation qui culminent dans la prolifération et la tumorigénese de cellules épithéliales, tandis que TGF β 1 joue d'importantes fonctions dans le règlement du cycle cellulaire, en étant responsable de son arrêt dans G1, en inhibant en conséquence la croissance cellulaire. Modifications dans le micron-environnement tumoral dû à la variation dans la concentration relative de EGF et TGF β 1, par influence des polymorphismes fonctionnels *EGF+61G>A* et *TGFB+869T>C* pourront conditionner la prolifération tumorale.

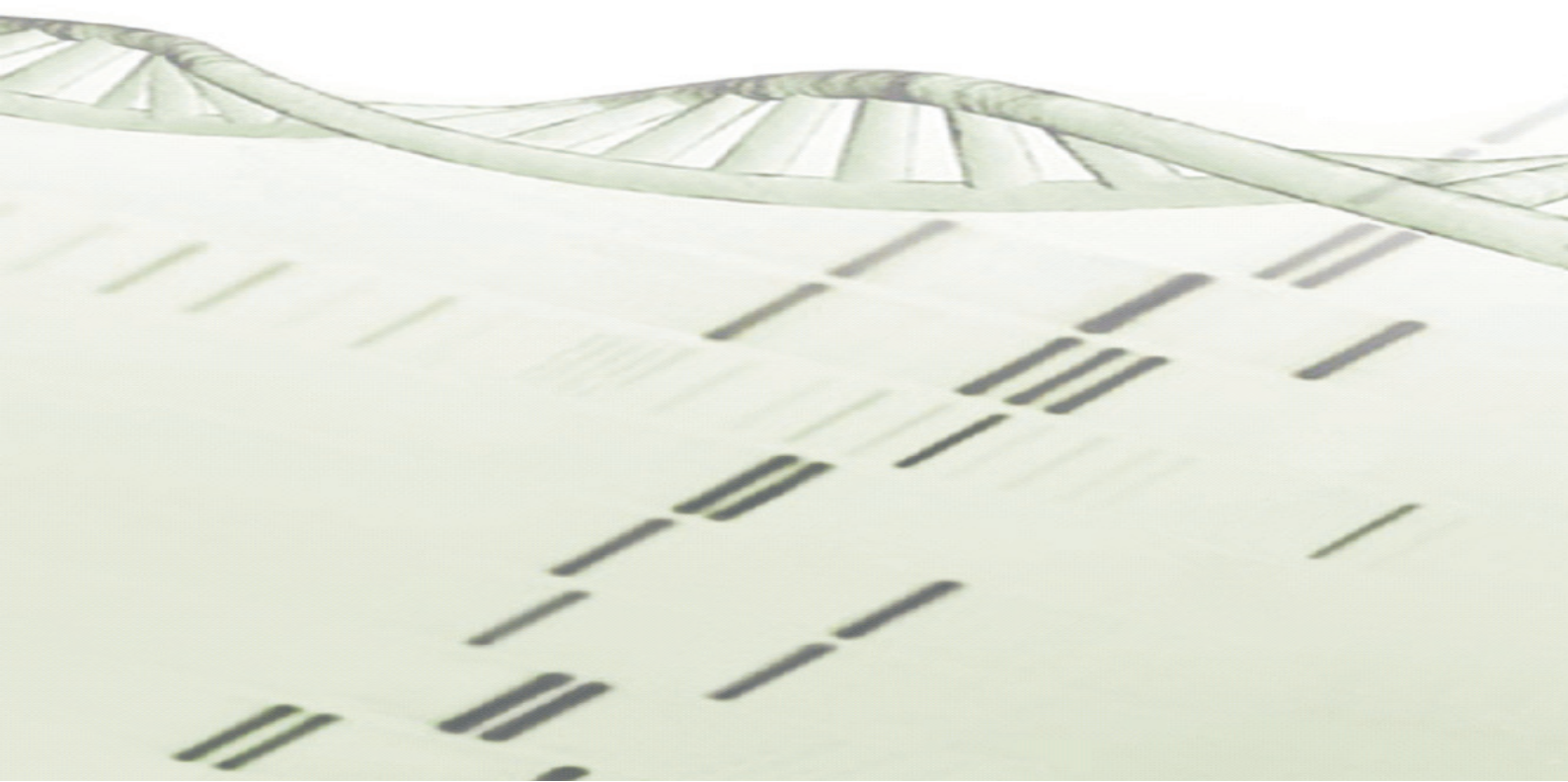
Dans présent travail a été réalisée une étude du type cas-contrôle, avec l'objectif comment analyser de l'influence des polymorphismes fonctionnels *EGF+61G>A* et *TGFB1+869T>C* dans la susceptibilité pour le développement de CaP et une étude de survie rétrospective pour évaluer la réponse des malades avec CaP à TBA. Ont été analysés des échantillons de DNA de quatre cents et trente et six (436) hommes, desquels cent et vingt et trois (123) présentaient diagnostic histopathologique de CaP et trois cent et treize (313) sans maladie oncologique. L'analyse des polymorphismes fonctionnels *EGF+61G>A* et *TGFB1+869T>C* a été réalisé par PCR-RFLP et "Real-time PCR", respectivement.

À l'égard du polymorphisme *EGF+61G>A*, les résultats montrent que les transporteurs de l'allèle G (modèle récessif fonctionnel) présentent risque augmenté pour CaP (OR=1.81, $P=0.010$) et pour au moment du diagnostic présenter maladie avec phénotype plus agressive, ceci est, maladie avancée, métastases du cancer à la distance et Gleason ≥ 7 (OR=1.74, $P=0.021$; OR=2.33, $P=0.038$; OR=2.76, $P=0.002$, respectivement). Combien au polymorphisme fonctionnel *TGFB1+869T>C* ne se sont pas vérifiées des différences avec signification statistique. Néanmoins, l'analyse de la combinaison des polymorphismes fonctionnels des gènes *EGF* et *TGFB1*, selon un profil génétique de prolifération cellulaire, il a révélé que les transporteurs d'un profil de moyenne et élevée prolifération ont risque augmenté pour le développement de CaP comparativement avec les transporteurs d'un profil de basse prolifération (OR= 4,97, $P=0.019$; OR=5.68, $P=0.010$, respectivement). Les transporteurs du profil génétique de haute prolifération ont risque augmenté pour présenter Gleason ≥ 7 au moment du diagnostic (OR=1.83, $P=0.030$).

L'analyse univariés de l'intervalle libre de maladie (ILD) jusqu' à androgène-indépendance (AI) dans des malades soumis TBA selon la méthode de Kaplan-Meier, a démontré que le temps jusqu'à récurrence et AI était inférieur nous porteuse G, comparativement aux homozygote AA, à l'égard du polymorphisme *EGF+61G>A* ($P=0.018$). Les transporteurs d'un profil de haute prolifération présentent aussi ILD significativement inférieure aux transporteurs basse/de moyenne prolifération, en se développant AI plus tôt (HR=3.0, $P=0.019$). Elles n'ont pas été trouvées des différences statistiquement significatives, entre les courbes de survie des homozygote C contre transporteurs T, à l'égard du polymorphisme *TGFB1+869T>C* ($P=0.452$).

L'évaluation du profil génétique individuel à l'égard des polymorphismes fonctionnels *EGF+61G>A* et *TGFB1+869T>C* il pourra contribuer a la compréhension d'éventuels mécanismes de règlement et de développement tumoral de CaP et à la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de réponse à TBA.

1. Introdução



1.1. Cancro: Conceitos Gerais

O cancro é actualmente, um importante problema de saúde pública mundial ^[1,2]. De acordo com os dados mundiais de incidência e mortalidade, no ano de 2002 foram diagnosticados 10,9 milhões de novos casos de cancro e registadas cerca de 6,7 milhões de mortes por cancro ^[3].

Atendendo à relação entre a esperança média de vida e o risco para cancro, usando como referência a população mundial do ano 2000, estima-se que em 2015 haja um aumento significativo da incidência de cancro, uma vez que o número de indivíduos de 65 e 80 anos de idade será 22% e 50% superior, respectivamente ^[2]. Desta forma, admite-se que as taxas de incidência de cancro poderão acompanhar o aumento da esperança média de vida.

O cancro é uma doença heterogénea, com diferentes etiologias, história natural e tratamento que se desenvolve através da interacção entre factores ambientais e genéticos ^[4]. Trata-se de uma doença multifactorial complexa cujo processo de desenvolvimento é lento e envolve a ocorrência de múltiplos eventos sequenciais.

No cancro observa-se uma proliferação celular de novo, podendo formar-se uma massa identificável (tumor) capaz de invadir os tecidos adjacentes e metastizar, isto é, disseminar e crescer em locais distantes da sua origem ^[5].

Dadas as inúmeras questões que permanecem sem resposta face ao cancro, este é encarado como um desafio, tanto para os que estão envolvidos no seu tratamento clínico, como para todos os que se dedicam a estudar e caracterizar os mecanismos moleculares subjacentes ao seu desenvolvimento.

1.2. Oncobiologia Molecular

1.2.1. Carcinogénese

Em consequência do processo de adaptação dos indivíduos ao meio em que se encontram inseridos, estes possuem capacidade de reparar os danos provocados por diversos tipos de agressões que vão vivenciando ao longo da vida. O indivíduo e, conseqüentemente, as células que constituem os seus tecidos, estão diariamente sujeitos a diferentes tipos de agressões, nomeadamente de origem química, física, viral

e/ou biológica, podendo estas originar diferentes danos a nível celular e, especificamente, ao nível do ácido desoxirribonucléico (DNA). Não obstante, algumas células podem perder esta capacidade de reparação e, conseqüentemente acumularem erros no seu material genético.

A carcinogénese é um processo multifactorial e multifásico, que culmina no desenvolvimento de neoplasias malignas, pela acumulação de mutações genéticas e/ou epigenéticas que poderão conduzir a mudanças na actividade génica e a fenótipos alterados sobre os quais actua a selecção ambiental e microambiental. Estas alterações genéticas conferem vantagem competitiva em relação às células normais [6]. Este processo passa por vários estadios até que se constitua um carcinoma *in situ* (CIS), podendo ser dividido em três fases consecutivas: iniciação, promoção e progressão (Figura 1) [6].

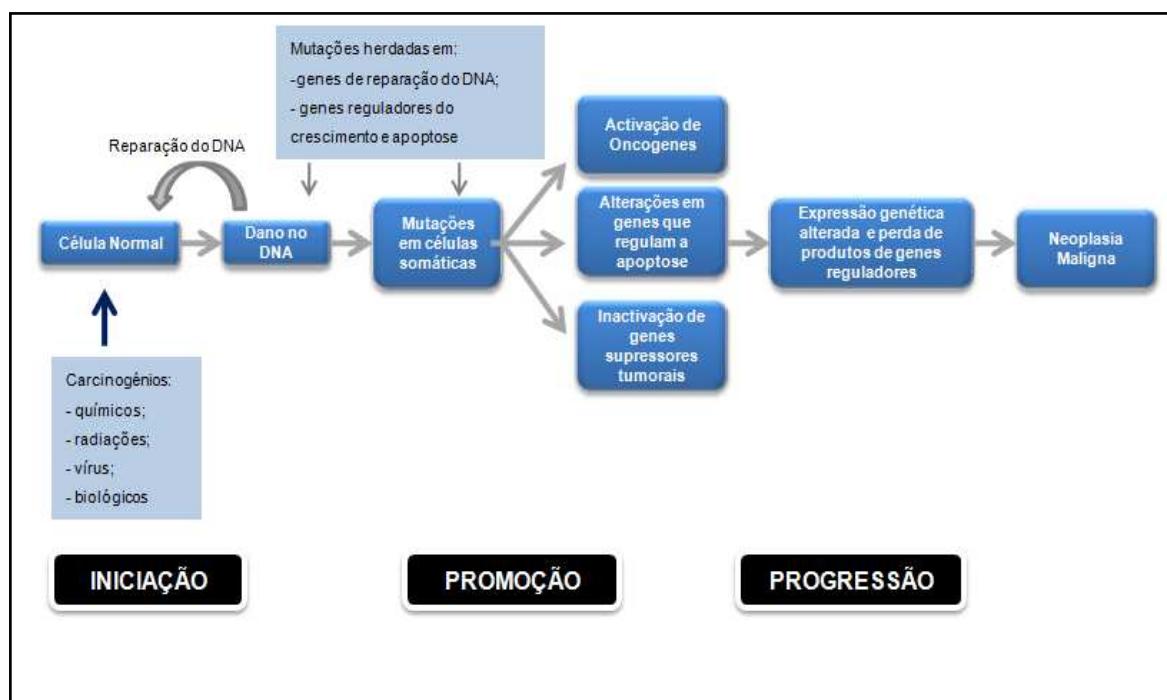


Figura 1. Representação esquemática do processo de carcinogénese (adaptado de Kumar *et al.*, 2003 [6]).

A iniciação é uma fase que se caracteriza por uma alteração no material genético de uma célula normal, por acção de um agente carcinogénico. Caso a célula não tenha capacidade de reparar o dano sofrido, vai ocorrer uma acumulação sucessiva de

alterações genéticas que conferem vantagem selectiva à célula “iniciada” – fase de promoção. A acumulação sequencial de alterações genéticas em genes responsáveis pelo controlo da proliferação celular, da morte celular programada e da manutenção da integridade do genoma, culmina na expansão clonal da célula “iniciada”. A fase de progressão é uma fase irreversível, em que o processo evolui até ao aparecimento das primeiras manifestações clínicas da doença. A progressão do cancro caracteriza-se pela inactivação de determinados genes e sobre-expressão de outros, dando origem a células independentes da regulação local e central do organismo, que proliferam sem inibição.

O processo de carcinogénese possui paralelismos com o processo de selecção Darwiniano, em que o desenvolvimento neoplásico se rege pelos princípios de Darwin: expansão clonal, diversificação genética e pressão selectiva que origina sub- clones que vão sofrendo mutações sequenciais ^[7].

Os genes mais frequentemente envolvidos na origem das neoplasias malignas são: proto-oncogenes, ou seja, genes que codificam produtos reguladores do crescimento celular normal e da diferenciação e cujo ganho de função promove a proliferação celular, sendo necessário apenas a modificação de um alelo para ocorrer alteração do fenótipo celular; os genes supressores tumorais, que codificam proteínas que normalmente suprimem a proliferação celular e que por perda de função promovem a proliferação celular, sendo necessário ocorrer mutações nos dois alelos para ocorrer alteração do fenótipo celular; e os genes envolvidos na reparação do DNA, no controlo do ciclo celular e na angiogénese ^[8].

Em consequência do processo de carcinogénese, a células neoplásica evidencia alterações das funções biológicas comparativamente com as células normais, de que são exemplos o aumento da proliferação celular, a menor diferenciação e/ou especialização nas suas funções, a instabilidade genética, a capacidade de migração e invasão dos tecidos adjacentes, a capacidade de angiogénese e a resistência à apoptose ^[9]. Algumas dessas alterações poderão ser transmitidas de geração em geração, através da linhagem germinativa do indivíduo, originando os cancros familiares, enquanto que a maioria das neoplasias surgem de modo esporádico, na linhagem somática de tipos específicos de células, originando os cancros esporádicos.

1.2.2. Variabilidade Genética Individual: Repercussão no Microambiente Tumoral

Devido ao carácter multifactorial das neoplasias malignas, o seu desenvolvimento é condicionado pela interacção entre o meio ambiente em que o hospedeiro se encontra e a variabilidade genética individual deste.

A descodificação do genoma humano permitiu constatar que diferenças nas sequências de DNA podem explicar diferentes susceptibilidades para o desenvolvimento neoplásico e diferentes padrões de desenvolvimento tumoral, tendo esta variabilidade implicações ao nível do tratamento e prognóstico ^[10].

As variações no DNA existentes nos indivíduos de uma população cuja variante menos frequente está presente em pelo menos 1% dessa população designam-se polimorfismos ^[11]. A maioria dos polimorfismos, ocorre em genes envolvidos no controlo da proliferação e diferenciação celular, na reparação de DNA e na manutenção da integridade do genoma, bem como em moléculas envolvidas no metabolismo de diferentes xenobióticos.

Os polimorfismos mais comuns são caracterizados pela alteração de apenas um nucleótido, na sequência de DNA, e designam-se por “Single Nucleotide Polymorphisms” (SNP’s) ^[12].

Os SNP’s são a principal fonte de variabilidade individual, pelo que cada indivíduo é portador de um vasto grupo de polimorfismos, o que lhe confere um património genético único. Contudo, a distribuição da frequência dos SNP’s apresenta variações dentro de uma mesma população, para além de variações inter-populacionais. Dado que o risco para cancro parece ser influenciado pelos padrões de SNP’s que cada indivíduo possui em determinados genes-chave de susceptibilidade ^[13], o estudo de polimorfismos em genes-alvo proporcionará a definição de grupos de risco para o desenvolvimento neoplásico e de grupos com significado prognóstico.

O indivíduo como portador de um conjunto de polimorfismos variáveis apresentará um perfil de carcinogénese singular. Alguns desses polimorfismos podem ser caracterizados como variantes genéticas funcionais, sendo a sua ocorrência responsável por padrões de expressão genética/função alterados. Estes, por originarem diferenças na expressão génica e/ou diferenças na produção adequada da respectiva proteína, terão a capacidade de determinar o microambiente tumoral que, por sua vez, exercerá influência no processo de desenvolvimento tumoral.

Entende-se por microambiente tumoral o conjunto de todos os elementos não-epiteliais adjacentes às células tumorais incluindo fibroblastos, células imunitárias, matriz extracelular e vasos sanguíneos ^[14]. Actualmente, admite-se que o mesmo não desempenha apenas funções de suporte, como também a capacidade de contribuir para o desenvolvimento e progressão tumoral, por interacção mediada por moléculas secretadas, de que são exemplo os factores de crescimento.

Os factores de crescimento são moléculas de comunicação entre as células, que asseguram o equilíbrio funcional de todos os sistemas. A ocorrência de polimorfismos funcionais nos genes que os codificam poderá ser responsável pela quebra do estado de homeostasia, devido à modificação da quantidade e qualidade destes factores que poderão influenciar o desenvolvimento e/ou progressão tumoral.

Assim, e reforçando o carácter singular do indivíduo conferido pelo conjunto de polimorfismos, torna-se necessário a caracterização dos indivíduos a nível molecular, bem como a análise/consequências destas variantes genéticas no cancro.

1.3. Cancro da Próstata

1.3.1. Epidemiologia e História Natural da Doença

O cancro da próstata (CaP) é a segunda neoplasia maligna mais frequente no homem ^[15]. Estima-se que, no ano de 2002, foram diagnosticados 679.000 novos casos, representando esta frequência 11,7% do total de todos os novos casos de cancro registados a nível mundial. Neste ano, ocorreram 221.002 mortes por CaP (5,8% de todas mortes por cancro) ^[3].

Em 2000, o CaP foi a segunda neoplasia mais frequente no género masculino em Portugal, verificando-se uma taxa de incidência de 53.0 por 100.000 habitantes (população Europeia) ^[16]. A análise de dados de mortalidade entre a década de oitenta e a década de noventa do século XX, revela um aumento de 3.6% da taxa de mortalidade por CaP ^[16]. No ano de 2003 em Portugal, o CaP foi a neoplasia com maior taxa de incidência em homens com idade superior a 60 anos ^[17].

Relativamente às taxas de incidências de CaP verifica-se uma grande heterogeneidade a nível mundial, o que revela grandes diferenças inter-populacionais. As taxas de incidência mais elevadas observam-se nas populações Afro-americanas e

de países ocidentais desenvolvidos, enquanto que as mais baixas foram registadas em populações Asiáticas ^[3,18,19] (Figura 2).

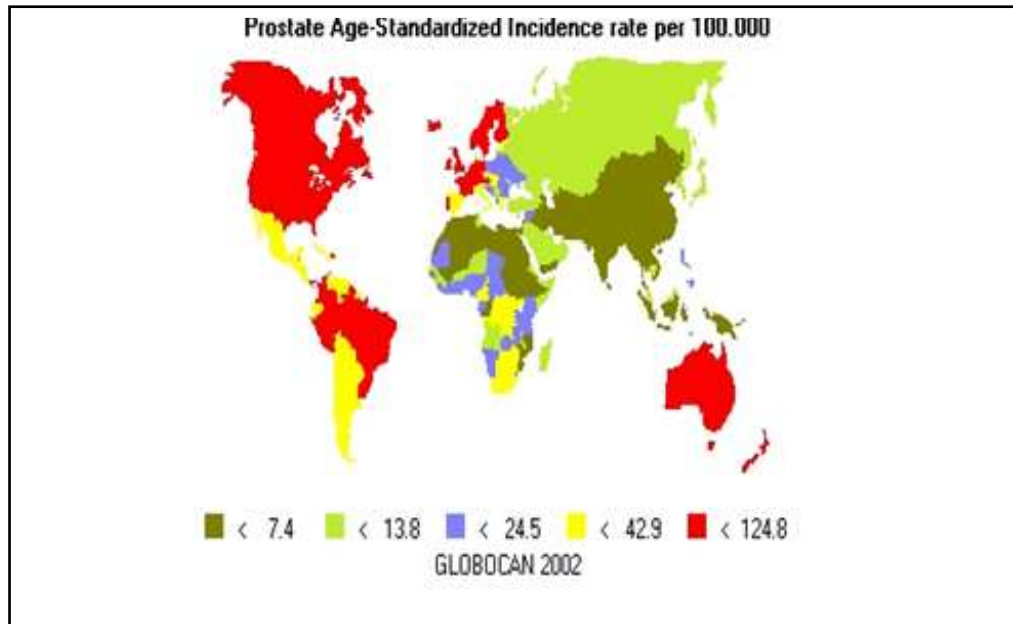


Figura 2. Taxas de incidência de cancro da próstata por 100.000 habitantes (Globocan 2002, IACR).

O CaP difere de outros tumores sólidos no que diz respeito à prevalência latente, ou seja, o número de homens com CaP excede em muito o número de homens diagnosticados com a doença e/ou que morrem em consequência desta. Estudos com base em autópsias revelam que 30-40% dos homens com idade igual a 60 anos apresentam células tumorais prostáticas, aumentando para 60-70% a presença destas quando a idade se aproxima dos 80 anos ^[20,21].

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino, localizada abaixo da bexiga, envolvida por uma cápsula, consistindo num epitélio glandular embebido num estroma fibromuscular. O epitélio glandular da próstata é composto por duas camadas histologicamente distintas: a camada luminal e a camada basal. A primeira é constituída por células responsáveis pela produção de antígeno específico da próstata (PSA) o lhe confere a capacidade secretora. A camada basal é formada por células epiteliais cubóides, na qual residem nichos de células estaminais responsáveis pelo desenvolvimento de células epiteliais prostáticas ^[22].

A próstata 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 3) [23].

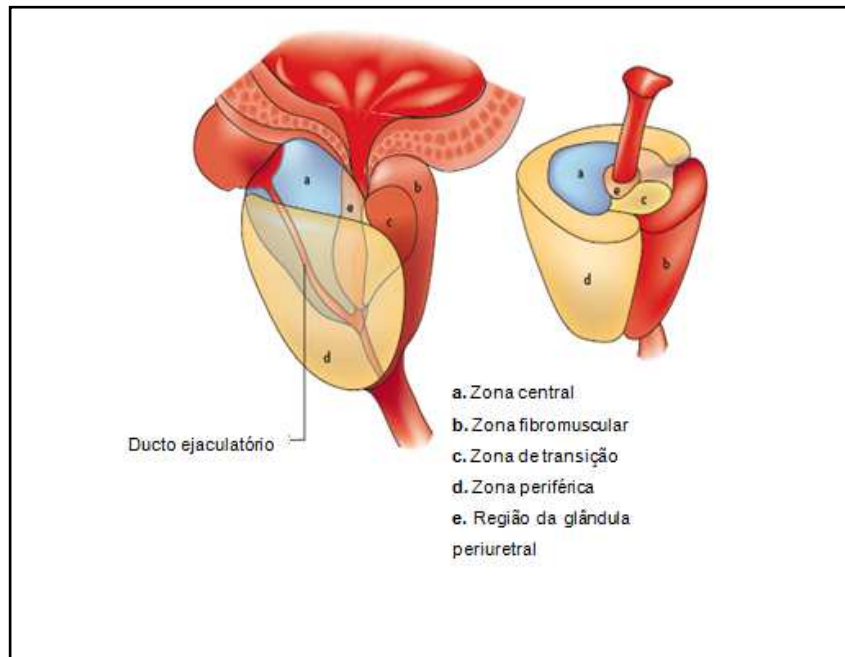


Figura 3. Representação esquemática das zonas que constituem a próstata (adaptado De Marzo *et al.*, 2007 [24]).

Atendendo ao carácter glandular deste órgão, a maioria das neoplasias que nele ocorrem são adenocarcinomas e têm origem na zona periférica [15, 22].

Na etiologia do CaP parecem estar envolvidos diversos factores, nomeadamente hormonais, ambientais, do hospedeiro e genéticos. Todavia, os mecanismos de carcinogénese desta neoplasia permanecem por esclarecer.

O desenvolvimento de CaP está fortemente associado a factores do indivíduo como idade, etnia, património genético e história familiar da doença [18,25,26]. Outros factores, como os hábitos alimentares, a prática de exercício físico, factores sexuais e de inflamação, podem igualmente estar implicados na carcinogénese de tumores prostáticos.

No que respeita à idade, alguns estudos evidenciam que 30% dos homens com idade superior a 50 anos têm CaP enquanto que, outros estudos, revelam um aumento

da prevalência em homens com 40 anos e com mais de 80 anos de idade de 12% para 43%, respectivamente ^[15].

Trabalhos dedicados à importância dos factores ambientais no desenvolvimento de CaP, demonstraram a existência de risco acrescido para o desenvolvimento da neoplasia prostática aquando do aumento da ingestão de gorduras de origem animal em países desenvolvidos ^[27,28,29]. Estas evidências têm por base estudos sobre migração de populações nos quais se verificou que indivíduos que migram de países cuja taxa de incidência de CaP é baixa para países em que esta é elevada têm um risco aumentado para desenvolverem CaP. Mais ainda, constatou-se em populações emigrantes que, ao fim de uma ou duas gerações no país de acolhimento, estas apresentam uma taxa de incidência semelhante à do país de acolhimento. Exemplo disto é o caso de indivíduos de origem Chinesa, Japonesa ou Coreana que, passado algum tempo após emigração para os Estados Unidos da América, passam a apresentar taxas de incidência de CaP similares às apresentadas pelos Americanos ^[15,30,31,32].

Como anteriormente referido, a história familiar da doença é um importante factor de risco para o desenvolvimento de CaP. Desta forma, homens cujos familiares em primeiro grau tiveram a doença, apresentam um risco de desenvolverem CaP duas vezes superior, quando comparados com homens sem história familiar de doença ^[26,33,34,35]. Contudo, apenas uma pequena percentagem (10-15%) de CaP pode ser considerada como hereditária ^[18].

Apesar do contributo de várias áreas da investigação, permanecem por descobrir quais os factores de risco ambientais, genéticos e biológicos que permitem explicar a heterogeneidade verificada nas taxas de incidência de CaP a nível mundial, sugerindo que outros factores, nomeadamente a variabilidade individual e populacional, possam influenciar a susceptibilidade para o desenvolvimento desta neoplasia.

A descoberta do PSA como biomarcador foi um marco histórico a nível clínico, dada a sua utilidade na detecção precoce de CaP, tendo permitido a organização de programas de rastreio da doença ^[36,37]. Após a sua descoberta verificou-se um aumento significativo das taxas de incidência e de mortalidade de CaP. Contudo, este aumento pode ser o reflexo do aumento das medidas de vigilância e não necessariamente resultante do aumento real do número de novos casos. Nos EUA, por exemplo, verificou-se, no início da década de noventa, um aumento das taxas de incidência em consequência da introdução generalizada do teste do PSA como método de rastreio ^[3,38].

Apesar do teste do PSA ser aceite como um biomarcador de patologia prostática ainda existe alguma controvérsia quanto à sua utilização, devido principalmente à sua inespecificidade. O PSA é libertado no soro pelo tecido prostático tanto em situações benignas como em situações malignas ^[37]. Assim, este método de diagnóstico deve ser aliado a outros e, por este motivo, deve ser sempre considerado como um método auxiliar de diagnóstico. Como métodos de rastreio de CaP encontram-se o toque rectal e o doseamento sérico do PSA. A biópsia em sextante guiada por ecografia transrectal da próstata, associada ao doseamento sérico do PSA, constitui um bom meio de diagnóstico desta neoplasia, especialmente em fases assintomáticas da mesma ^[39].

O CaP apresenta uma grande variabilidade quanto ao seu comportamento biológico. Todavia, os tumores possuem características que ajudam a prever a agressividade da doença, nomeadamente, a dimensão/volume do tumor inicial e o grau histológico (classificação de Gleason). A extensão local e a disseminação à distância são características úteis para o estadiamento.

A classificação de Gleason mede o grau de semelhança entre o tumor e a glândula prostática a partir da qual se desenvolveu o tumor, podendo o “score” variar entre 2 e 10 ^[40-42]. Quanto maior o grau de Gleason de um tumor, maior a probabilidade de possuir comportamento agressivo.

Os tumores de grau 2/3/4 são caracterizados como tumores bem diferenciados; os tumores de grau 5/6 são definidos como moderadamente diferenciado; os tumores de grau 7 são considerados tumores de fenótipo mais agressivo do que um tumor moderadamente agressivo mas menos letal do que tumores pouco diferenciados; os tumores de grau 8/9/10 são tumores pouco diferenciados, sendo caracterizados como muito agressivos e que frequentemente apresentam capacidade de metastização.

A par do diagnóstico histopatológico, o estadiamento clínico estabelecido aquando do diagnóstico constitui um dos passos mais importantes para orientação da terapêutica. Este consiste no agrupamento dos casos em categorias, tendo por base a extensão da doença, sendo esta uma descrição detalhada do grau de disseminação da doença a partir do órgão de origem. Actualmente o sistema de estadiamento mais utilizado é o sistema de estadiamento TNM ^[43]. A componente T corresponde ao tamanho e extensão local do tumor, a componente N à metastização glanglionar regional e a componente M à metastização à distância.

Indivíduos diagnosticados em estadios iniciais de desenvolvimento de CaP são geralmente submetidos a cirurgia (prostatectomia radical) e/ou radioterapia ^[22,44], com

intenção curativa. Indivíduos com tumores prostáticos em estadios avançados são habitualmente submetidos a terapia de bloqueio androgénico (TBA), que consiste na supressão da produção endógena e acção dos androgénios ^[44,45], já que os androgénios e receptores de androgénios (AR) são importantes reguladores da proliferação e desenvolvimento das neoplasias prostáticas ^[46-48].

1.3.2. Mecanismos de Desenvolvimento de Androgénio-independência

Os androgénios são hormonas importantes para o crescimento da próstata. O principal androgénio masculino em circulação é a testosterona, produzida principalmente nas células de Leydig nos testículos (90%) e parcialmente na glândula supra-renal (10%) ^[44]. Em situações normais os níveis de testosterona são controlados por um mecanismo de “feedback” negativo estabelecido entre o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas ^[49] (Figura 4).

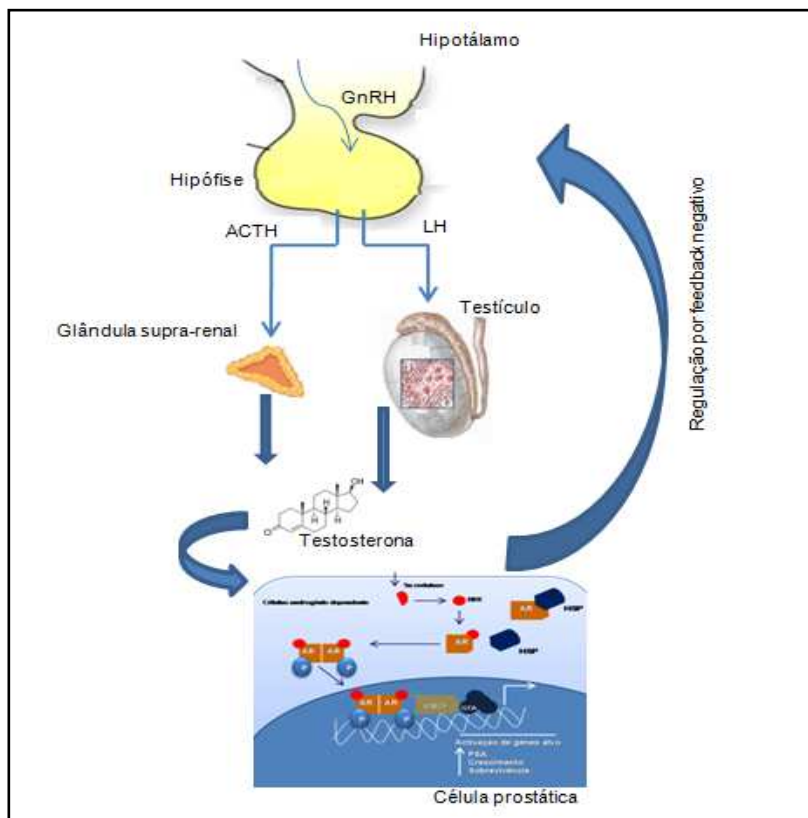


Figura 4. Mecanismo de regulação da testosterona (adaptado de Tilbrook *et al.*, 2001 ^[49]).

A testosterona circulante encontra-se principalmente ligada à albumina e à globulina de ligação à hormona sexual (SHBG) e parcialmente dissolvida no soro. Quando a testosterona livre contacta com as células prostáticas, é convertida, por acção da enzima 5 α -redutase, em dihidrotestosterona (DHT). A DHT é uma hormona mais activa do que a testosterona, apresentando uma afinidade cinco vezes superior para o AR^[50].

Após a ligação da DHT ao receptor intracelular de androgénios, ocorre activação da via de sinalização intracelular que culmina na activação da transcrição de genes-alvo, envolvidos em importantes mecanismos celulares de crescimento e sobrevivência celular (Figura 5).

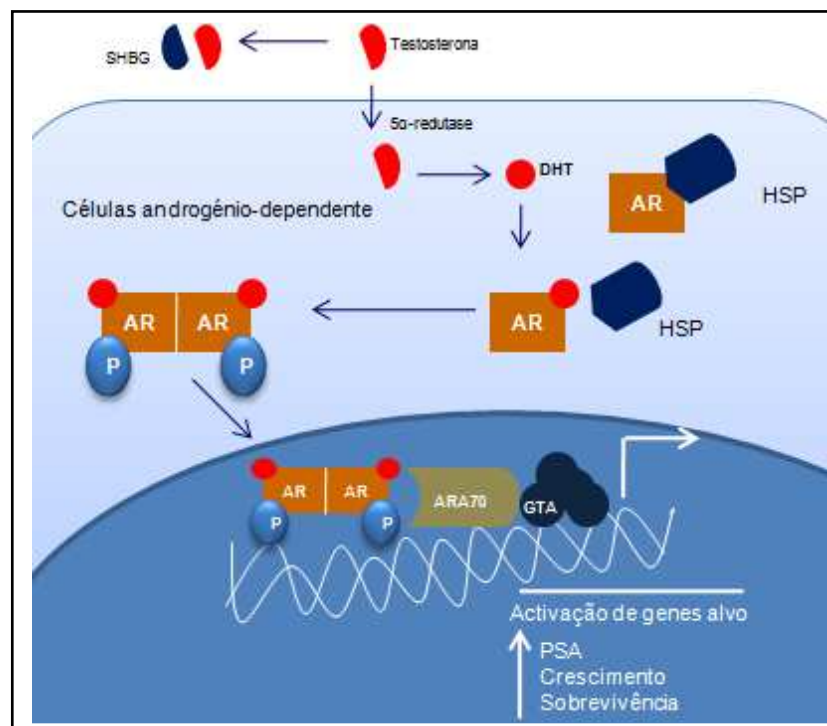


Figura 5. Activação da via de sinalização mediada pelos androgénios (Feldman *et al.*, 2001^[50]).

O desenvolvimento de CaP é dependente da relação criada entre os níveis da proliferação celular e a taxa de apoptose, sendo os androgénios os principais reguladores desta relação, estimulando a proliferação celular e inibindo a apoptose^[50]. Assim, quando os indivíduos são submetidos a TBA verifica-se, inicialmente, uma

regressão tumoral, pois na ausência de androgénios a proliferação celular é baixa e a taxa de apoptose celular elevada.

A TBA consiste na utilização de fármacos ou procedimentos cirúrgicos com o intuito de bloquear o acesso das células tumorais prostáticas a androgénios, uma vez que estes são necessários para a proliferação e diferenciação de células cancerígenas prostáticas. Esta abordagem terapêutica inclui todo o tipo de tratamentos que têm como objectivo principal controlar o crescimento tumoral por regulação hormonal ^[51].

Dois dos principais tipos de terapia de bloqueio androgénico utilizados actualmente consistem na utilização de antiandrogénios e na utilização de agonistas da hormona libertadora da hormona luteinizante (aLHRH). Os antiandrogénios vão competir especificamente ao nível dos AR na célula alvo. Inibindo o crescimento da próstata e vesículas seminais no carcinoma da próstata inoperável. Os aLHRH, têm uma acção central ao nível da hipófise, regulando negativamente os receptores da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) na hipófise, conduzindo à supressão da libertação da hormona luteinizante (LH) e consequentemente à inibição da secreção de testosterona a nível dos testículos ^[52].

Embora a ablação androgénica inicialmente provoque remissão da doença, uma elevada percentagem de doentes com CaP evoluem para uma fase denominada de hormono-resistência ou androgénio-independência (AI), deixando de responder à TBA, desenvolvendo cancro da próstata androgénio-independente (CaPAI).

O CaPAI é uma forma letal de CaP, apresentando elevado potencial de progressão e metastização ^[44]. Devido à limitação terapêutica actualmente existente para o seu tratamento, permanece associado a uma elevada mortalidade e morbilidade. Factores de susceptibilidade genética, nomeadamente variantes genéticas no DNA poderão ser fortes candidatos a explicar o motivo pelo qual a maioria dos doentes progridem para CaPAI.

Foram descritas várias vias através das quais o CaPAI parece desenvolver-se ^[50,53]. Estas vias permitem interpretações sobre os mecanismos de acção dos androgénios, bem como mecanismos alternativos pelos quais as células tumorais *per se* e/ou por influência do microambiente envolvente proliferam e metastizam ^[47], resultando em resistência à TBA. Vários modelos explicativos foram propostos para explicar o desenvolvimento deste fenótipo: o modelo da hipersensibilidade a androgénios; o modelo da via promíscua; o modelo da activação da via dos androgénios independente

do ligando; o modelo da selecção clonal e o modelo da activação de vias de proliferação alternativas (Figura 6).

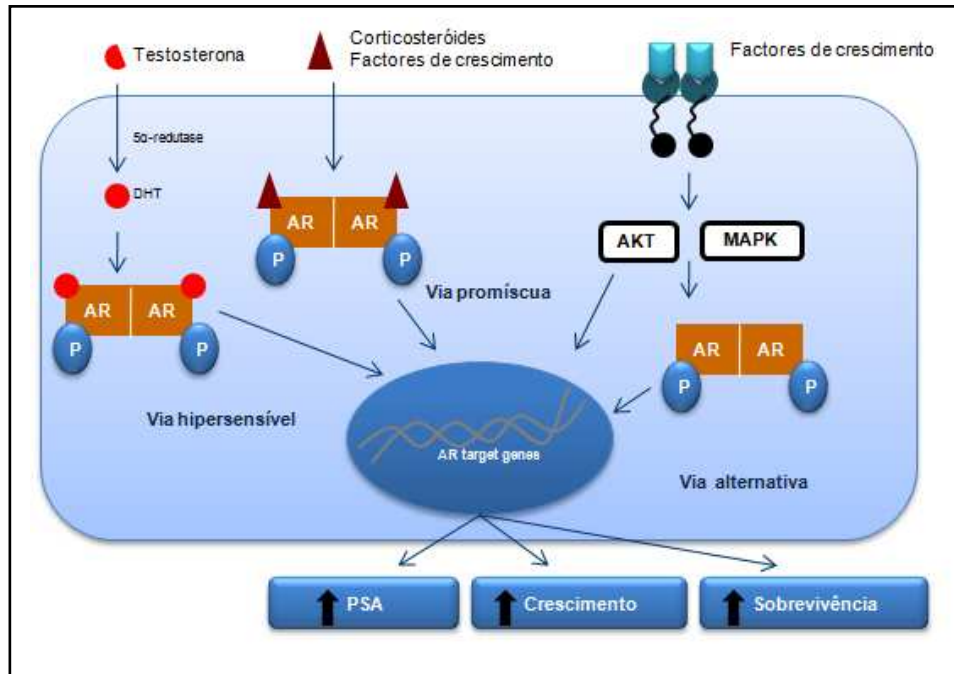


Figura 6. Mecanismos de desenvolvimento de resistência à terapia de bloqueio androgénico (TBA) (adaptado de Feldman *et al.*, 2001 ^[50]).

No modelo de hipersensibilidade a androgénios, as células vão adquirir a capacidade de responder a ínfimas quantidades de androgénios que ainda permanecem no meio mesmo durante a TBA. O facto de em aproximadamente 30% dos tumores AI ser detectada amplificação génica do *AR* ^[54,55], e consequentemente aumento de expressão do receptor, suportam esta hipótese. Contudo, esta alteração não se observa nas células tumorais iniciadoras, sugerindo a selecção de outro tipo de células. De facto, indivíduos com sobre-expressão de *AR* apresentam intervalo livre de doença à TBA superior. Como resposta adaptativa à TBA as células tumorais da próstata podem também desenvolver maior estabilidade e sensibilidade do *AR* ^[56], bem como maior da taxa de conversão de testosterona em DHT ^[50].

Segundo o modelo promiscuo, a célula tumoral vai adquirir modificações no seu genoma, essencialmente mutações “missense”, que nalguns casos se traduzem em perda da especificidade do *AR* para o ligando, podendo assim o *AR* ser activado por

outros ligandos, como os factores de crescimento ^[51]. Assim, durante a TBA, a activação da cascata de sinalização mediada pelos androgénios não fica comprometida pela sua baixa concentração.

Durante o processo evolutivo, as células, como forma de se adaptarem e sobreviverem às condições microambientais foram desenvolvendo uma complexa rede de interacções de vias de sinalização. A linearidade característica das vias de sinalização primordiais foi substituída por uma complexa rede de interacção entre as diversas vias de sinalização intracelulares ^[57] (Figura 7).

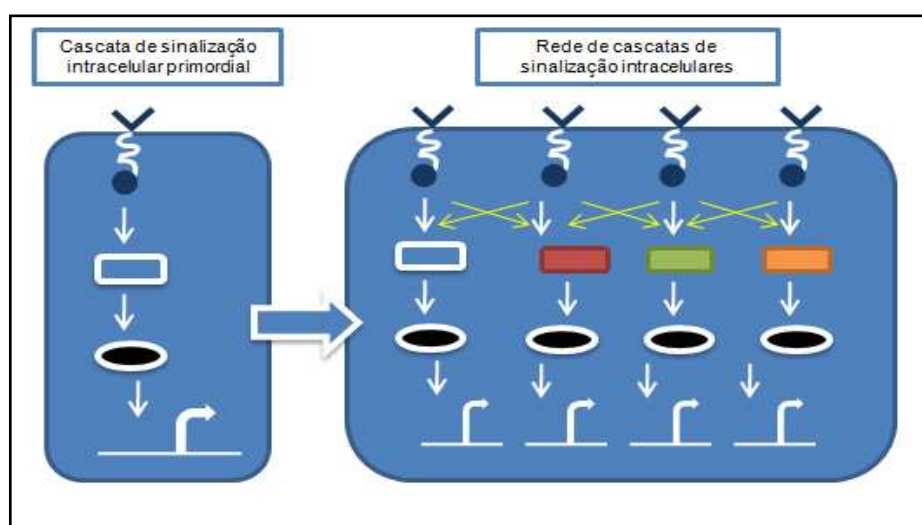


Figura 7. Complexificação e interacção das vias de sinalização intracelulares nos Vertebrados no decurso do processo natural evolutivo (adaptado de Amit *et al.*, 2007 ^[57]).

Esta interacção possibilita a activação da via de sinalização mediada pelos androgénios por outras vias de sinalização. Factores de crescimento, como o factor de crescimento epidérmico (EGF) podem ligar-se ao seu receptor transmembranar desencadeando a activação da correspondente via de sinalização intracelular. Contudo, ainda não se excluiu a hipótese de algum mediador de sinal do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) poder interagir com a via de sinalização mediada dos androgénios ^[58]. Os estudos de Ye e colaboradores ^[59] mostraram que existe uma relação de “feedback” positivo entre a transcrição de genes induzidos pelos androgénios e a transdução de sinal via EGF, podendo um estimular a síntese de receptores do outro.

Segundo o modelo de selecção clonal, no microambiente celular existem diferentes populações de células, umas androgénio dependentes (AD) e outras AI. Durante a TBA, as células AI adquirem vantagem competitiva, já que o seu crescimento/proliferação não fica comprometido.

Vários estudos sugerem a influência de factores de crescimento na evolução para AI [50,53]. O EGF, o factor de crescimento de transformação beta 1 (TGF β 1) e respectivos receptores parecem estar envolvidos no processo de desenvolvimento de AI [60,61].

No processo de desenvolvimento de AI, as células são expostas a modificações no seu microambiente, ocorrendo significativas alterações em importantes vias de sinalização que medeiam a proliferação/inibição celular. O crescimento do tumor prostático na ausência de androgénios, poderá dever-se à activação de vias de sinalização intracelulares alternativas, especialmente a via de sinalização ErbB/HER, que implicam o EGF como ligando [50]. A célula como resposta ao novo microambiente redirecciona o seu programa de proliferação celular, não ficando assim a proliferação comprometida pela TBA. Durante a aquisição de AI, verifica-se alteração do padrão de expressão de moléculas chave que regulam importantes processos celulares, como estimulação/inibição da proliferação celular e angiogénese. De entre estes realçam-se a sobre-expressão do *EGF* e do seu receptor (*EGFR*), sobre-expressão do factor de crescimento do endotélio vascular (*VEGF*), sub-expressão do receptor do factor de crescimento de transformação beta 1 do tipo I (T β RI) [62] (Figura 8).

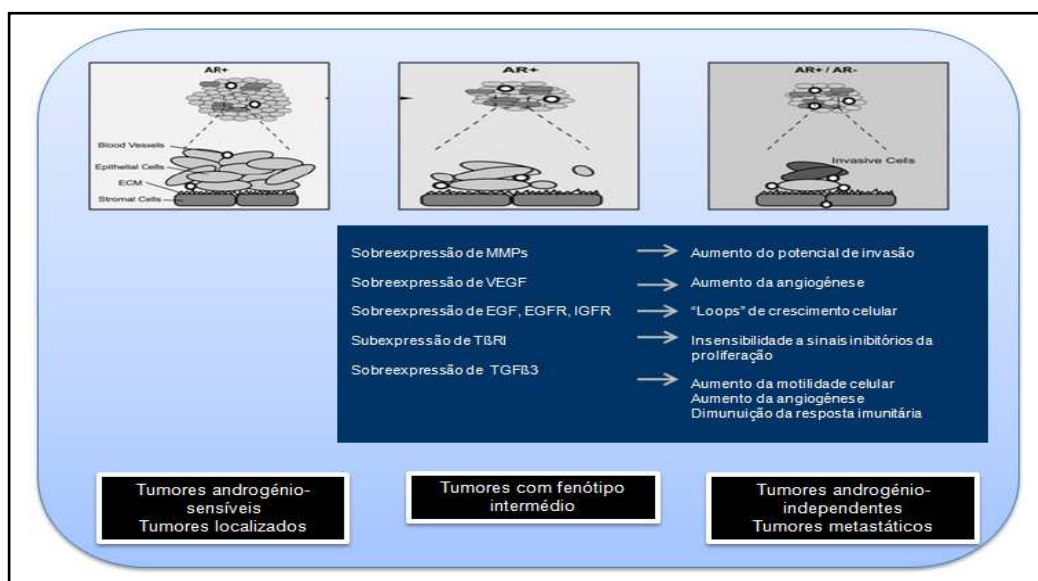


Figura 8. Alteração da activação de vias de sinalização intracelulares durante a progressão tumoral de tumores prostáticos (adaptado de Lee *et al.*, 2004 [62]).

1.4. Factor de Crescimento Epidérmico

A comunicação intercelular ocorre, entre outras moléculas, através de factores de crescimento, que actuam de forma parácrina, autócrina ou pela circulação assegurando que o crescimento celular se processe de acordo com as necessidades fisiológicas. Contudo, na célula tumoral verifica-se uma proliferação descontrolada, desregulando o equilíbrio intercelular.

O EGF é codificado pelo gene *EGF* localizado no cromossoma 4q25-27 (Figura 9). É uma proteína com um papel central na proliferação celular, como mitogénio em células epiteliais e na tumorigénese [63,64].

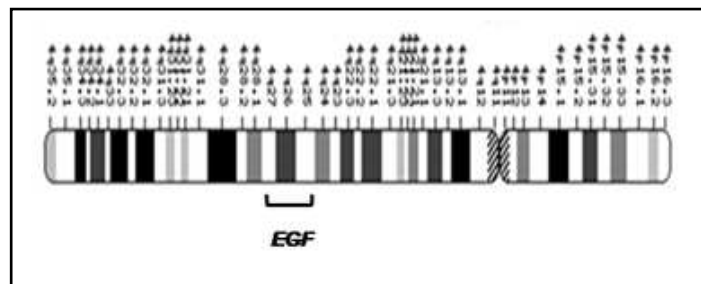


Figura 9. Localização do gene *EGF* no cromossoma 4 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

O EGF é um ligando importante de um complexo mecanismo de transdução de sinal, que em conjunto com o receptor transmembranar (EGFR) modelam o crescimento celular [65]. O receptor membranar EGFR pertence à família de receptores ErbB e compreende 4 membros: EGFR (ErbB1/HER), ErbB2 (Neu/HER2), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). Estes receptores têm em comum um domínio extracelular rico em resíduos de cisteína, um domínio transmembranar, e um domínio intracelular com actividade cínase de resíduos de tirosina [66].

Quando o EGF se liga ao EGFR, o receptor sofre dimerização, ligando-se a outro receptor da família ErbB, formando homo ou heterodímeros funcionais. Após a dimerização ocorre uma fosforilação cruzada dos domínios intracelulares, e conseqüentemente, activação da cascata de sinalização. Após a estimulação de diferentes proteínas adaptadoras no citoplasma, ocorre a estimulação de diferentes cascatas de sinalização: a via de sinalização de cinases de proteínas activadas por

mitogénios (MAPK); a via da cinase de fosfatidilinositol 3-OH (PI3K); a via da cinase activada por mitogénios (Akt) ^[67] (Figura 10).

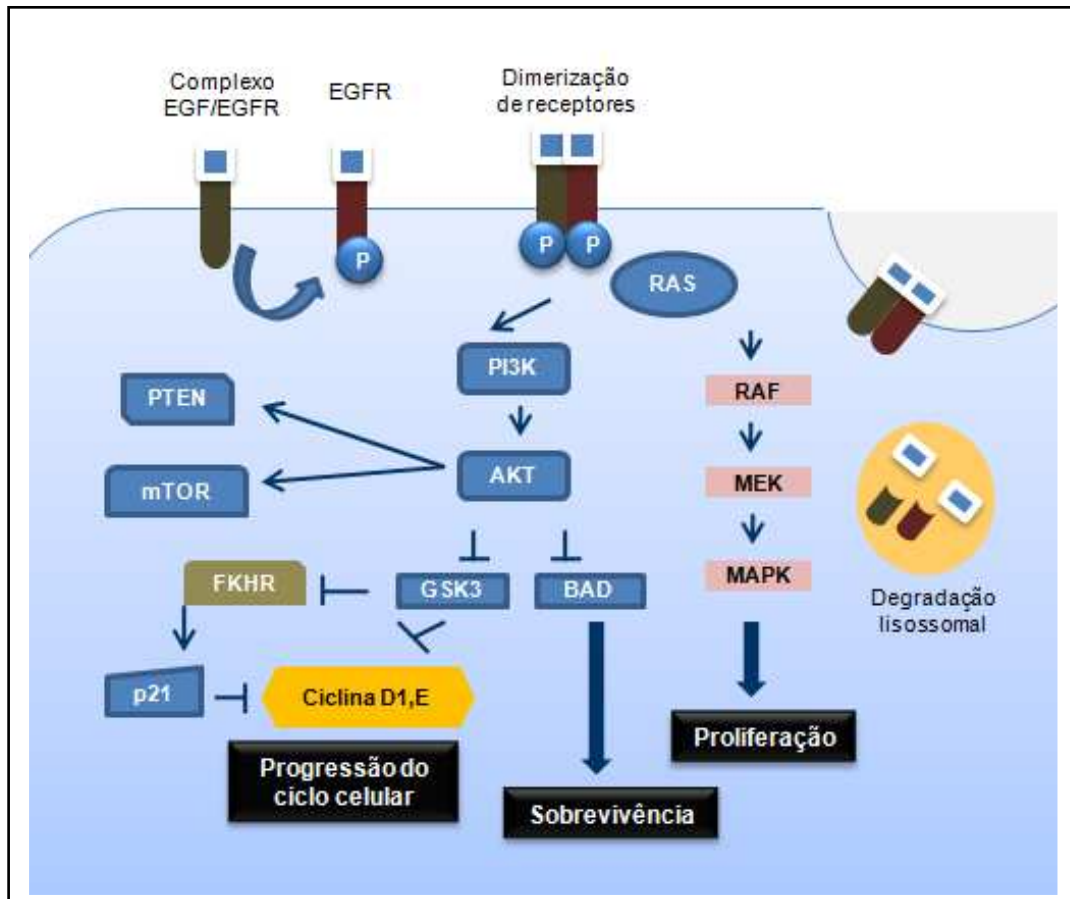


Figura 10. Via de sinalização intracelular activada pelo EGF (adaptado de Yarden *et al.*, 2001 ^[67]).

MAPK: cinases de proteínas activadas por mitogénios; PI3K: cinase de fosfatidilinositol 3-OH; AKT: cinase activada por mitogénios.

A activação da via EGF/EGFR induz a expressão de genes que implicam alterações fisiológicas com impacto na proliferação celular, sobrevivência, angiogénese e metastização ^[68].

Actualmente admite-se que o receptor transmembranar EGFR participe na patogénese de diversas neoplasias. Está descrito em tumores um aumento da expressão dos ligandos, assim como uma sobre-expressão de EGFR ^[69]. A sobre-expressão de EGFR poderá induzir a transformação neoplásica na presença de níveis

apropriados de ligandos ^[70]. O EGFR e seus ligandos encontram-se frequentemente expressos na maioria dos carcinomas (Figura 11) ^[71].

Tipo de Neoplasia	EGFR(%)
Próstata	40-80
Pulmão	40-80
Mama	14-91
Estômago	33-74
Colón	25-77
Esófago	43-89
Fígado	47-68
Pâncreas	30-50
Rim	50-90
Bexiga	35-86
Ovário	35-70
Cabeça e Pescoço	36-100

Figura 11. Percentagem de expressão do receptor EGFR em diferentes modelos tumorais (adaptado de Normanno *et al.*, 2003 ^[71]).

Devido às funções que a via de sinalização EGF/EGFR assume no desenvolvimento e/ou progressão de neoplasias malignas, nos últimos anos tem-se assistido ao desenvolvimento de terapias direccionadas a alvos específicos desta via. Em alguns tipos de cancro tem-se recorrido ao uso de anticorpos monoclonais anti-EGFR e/ou inibidores do domínio de cinase de resíduos de tirosina do EGFR com o intuito de atrasar a progressão da doença, estando algumas destas terapias em utilização clínica e outras em diferentes fases de ensaios clínicos (Figura 12) ^[57]. Actualmente admite-se que o sucesso destas terapias dirigidas a alvos específicos da via EGF/EGFR passará pela administração combinada de anticorpos monoclonais anti-EGFR e inibidores do domínio de cinase de resíduos de tirosina do EGFR.

Alvo molecular	Nome do agente terapêutico	Descrição	Tipo de cancro	Status de aprovação
EGFR	Cetuximab (Erbixux)	Anticorpo quimérico	Cancro colo-rectal	Aprovado (2004)
EGFR	Panitumumab (ABX-EGF)	Anticorpo humano	Cancro colo-rectal	Aprovado (2006)
EGFR	Matuzumab (EMD 720000)	Anticorpo humanizado	Cancro do pulmão	Fase II
EGFR	Gefitinib (Iressa)	TKI	Cancro pulmão não pequenas células (CPNPC)	Aprovado (2005)
EGFR	Erlotinib (Tarceva)	TKI	CPNPC, cancro do pâncreas	Aprovado (2004)
EGFR e HER2	Lapatinib (Tykerb)	TKI	Cancro da mama	Aprovado (2007)
EGFR, HER2, VEGF	AEE-788	TKI	Glioblastoma	Fase I

Figura 12. Agentes de terapia dirigida e respectivo alvo, usados em diferentes modelos tumorais (adaptado de Amit *et al.*, 2007 ^[57]).

1.5. Factor de Crescimento de Transformação Beta 1

O factor de crescimento de transformação beta (TGF β) pertence a uma família de citocinas altamente conservadas entre os mamíferos, encontrando-se envolvido numa grande variedade de funções desde o desenvolvimento embrionário à homeostasia dos tecidos adultos. O TGF β apresenta 3 isoformas TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3, codificadas por diferentes genes, sendo o TGF β 1 a isoforma mais abundantemente expressa ^[72].

O TGF β 1 é codificado pelo gene *TGFB1* localizado no cromossoma 19q13.1 (Figura 13).

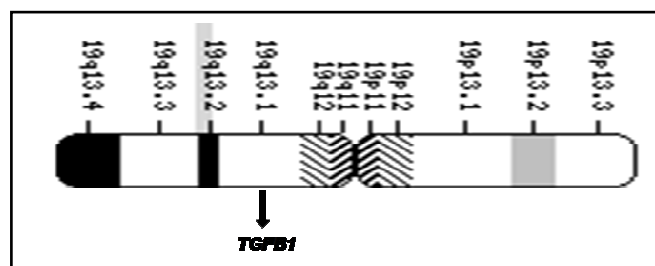


Figura 13. Localização do gene *TGFB1* no cromossoma 19 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

O TGF β 1 encontra-se envolvido em importantes processos de regulação intracelular: divisão celular, diferenciação, motilidade, adesão, apoptose, migração celular e vigilância imunológica. Uma das principais funções do TGF β 1 é a inibição do crescimento e proliferação celular [73].

O TGF β 1 apresenta a capacidade de ligar-se a um complexo de receptores, formado pelo T β RI e pelo receptor do tipo II (T β RII). Após ligação do TGF β 1 ao T β RII, ocorre fosforilação do domínio cínase do receptor do tipo I e posterior activação do mesmo. Com a activação do T β RI, a via de sinalização é activada. Este receptor fosforila um complexo formado pelas proteínas intracelulares SMAD2/3. Este complexo quando fosforilado liga-se à SMAD4, sendo o complexo formado translocado para o núcleo. O complexo SMAD2/3/4 regula a transcrição de vários genes alvo por interacção com outros co-factores. As proteínas SMAD6 e SMAD7 têm a capacidade de inibir todo este processo interagindo directamente com o T β RI prevenindo a fosforilação do complexo formado pelas SMAD2/3. A expressão de SMAD7 pode ser activada pela sinalização da via EGF/EGFR (Figura 14).

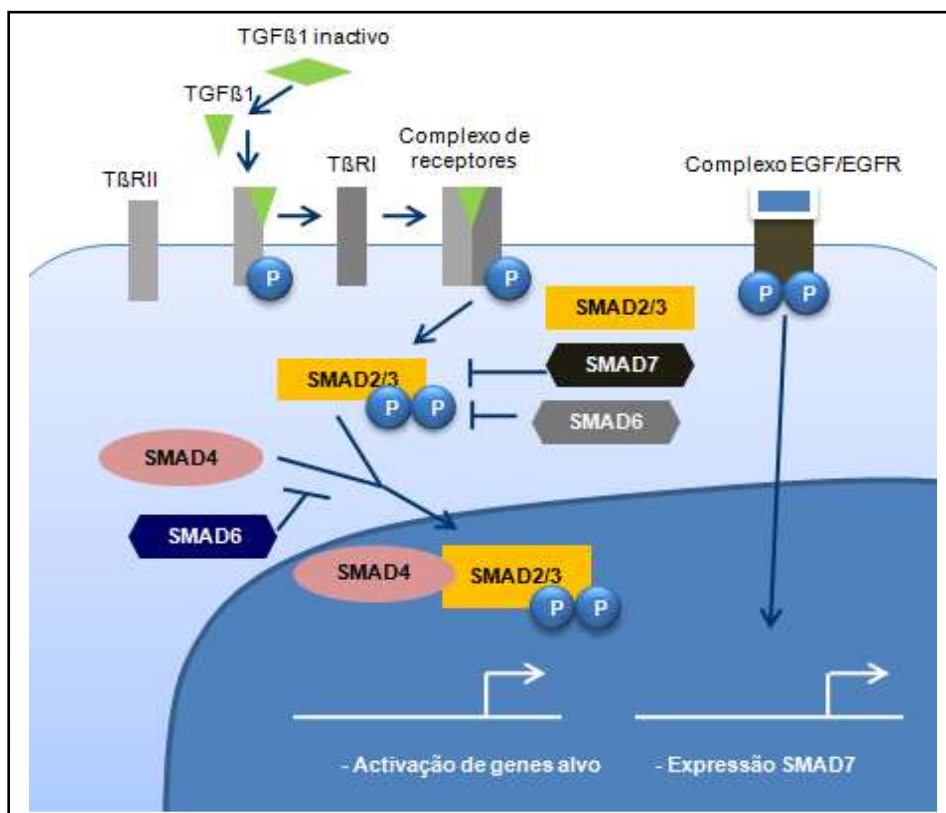


Figura 14. Via de sinalização intracelular activada pelo TGF β 1 (adaptado de Kaklamani *et al.*, 2004 [72]).

Um dos principais alvos da via de sinalização TGF β 1 é a paragem do ciclo celular, nomeadamente na passagem da fase G1 para S. A passagem de G1-S é controlada por duas famílias de proteínas: as ciclinas e as cinases dependentes de ciclina (CDKs). Na transição G1-S existe um importante “checkpoint” que, uma vez ultrapassado, compromete as células a transitar para a fase S e, subsequentemente a dividirem-se. A passagem deste “checkpoint” requer que a ciclina D se ligue a CDK4 e a CDK6 e a ciclina E se ligue a CDK2. Estas ligações são reguladas pelo TGF β 1 por 2 principais mecanismos: activação da transcrição dos inibidores de cinases dependentes de ciclina p15, p21 e p27 ^[74], e supressão da expressão de factores de transcrição como o c-myc.

O TGF β 1 regula também a activação da p53. A activação de p53 induz a transcrição de p21, que inibe a formação do complexo ciclina E/CDK2 e que, associada à p15, inibe o complexo ciclina D/CDK4. A inibição deste complexo previne a hiperfosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), que num estado de hipofosforilação impede a replicação celular, sequestrando também o factor de transcrição E2F. Devido ao desencadeamento de todo este complexo sistema de inibição, o TGF β 1 contribui para a paragem do ciclo celular na fase G1, inibindo consequentemente o crescimento de tecidos epiteliais (Figura 15) ^[75].

Durante o desenvolvimento tumoral o TGF β 1 parece possuir um papel duplo, isto é, comporta-se como supressor tumoral nas fases iniciais do desenvolvimento do tumor e promove o desenvolvimento deste em fases mais avançadas, favorecendo assim a motilidade e invasividade ^[76,77]. O aumento da expressão de proteases e plasmina pelas células tumorais altera a activação do TGF β 1 e a degradação da matriz extracelular com consequente libertação de TGF β 1. Todas estas alterações resultam num microambiente que promove o crescimento, invasão, angiogénese tumoral e supressão imunitária, com diminuição do número de células “natural killer” (NK), células B e células T ^[78].

O seu papel na promoção do desenvolvimento tumoral poderá ser desencadeado pela ocorrência de mutações em importantes elementos da via de sinalização como o T β RII, ou mesmo devido à perda de expressão deste receptor ^[79,80].

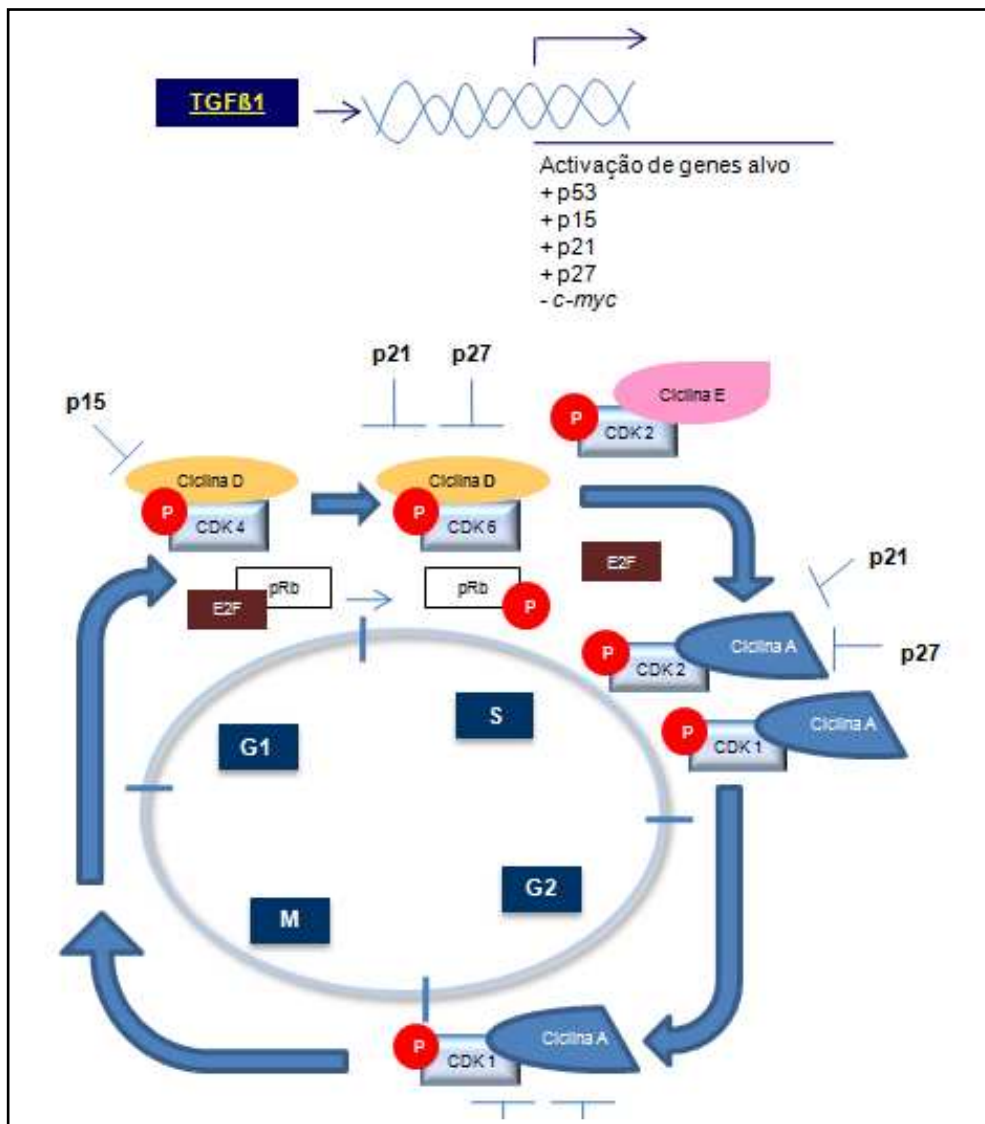


Figura 15. Influência do TGFβ1 no ciclo celular (adaptado de Elliott *et al.*, 2005^[81]).

Muitos tumores apresentam uma expressão aumentada de TGFβ1, sabendo-se que níveis aumentados em circulação estão associados a pior prognóstico^[82]. O desenvolvimento de terapias anti-TGFβ1 poderá ser uma abordagem promissora no tratamento de cancro, contudo deverá ser sempre contextualizada com o carácter bifuncional do TGFβ1 e adaptado à fase e estadió da doença (Figura 16)^[83].

Alvo Terapêutico	Nome do agente terapêutico	Descrição	Status de aprovação
TGF β 2	AP-12009	Oligonucleótido	Fase II
TGF β 1	AP-11014	Oligonucleótido	Pré-clínico
TGF β 2	Lerdelimumab (CAT 152)	Anticorpo	Fase III
TGF β 1	Metelimumab (CAT 192)	Anticorpo	Fase II
TGF β R	Soluble TBR2-Fc	Proteína solúvel estabilizada	Pré-clínico
Domínio cinase TGF β R1	Lys550410 Lys580276 Lys364947 Lys2109761	Molécula inibidora	Pré-clínico
Domínio cinase TGF β R1	LY2157299	Molécula inibidora	Fase I
Domínio cinase TGF β R1	SB-505124 SB-431542	Molécula inibidora	Pré-clínico
Domínio cinase TGF β R1	SD-208	Molécula inibidora	Pré-clínico
SMADs	Trx-xFoxH1b Trx-Lef1	Péptido	Pré-clínico

Figura 16. Terapias dirigidas e respectivo alvo, na via de sinalização mediada pelo TGF β 1 (adaptado de Saunier *et al.*, 2006 ^[83]).

1.6. Polimorfismos Funcionais nos Genes *EGF* e *TGFB1*

Factores de crescimento como o EGF e TGF β 1 contribuem para a modulação do microambiente tumoral. A diferente biodisponibilidade destes ligandos e interações entre as respectivas vias de sinalização podem condicionar a progressão tumoral. Variantes funcionais nos genes que codificam estes factores de crescimento poderão contribuir para a compreensão dos diferentes padrões de desenvolvimento tumoral e resposta à TBA.

Estudos prévios demonstraram a existência de um polimorfismo localizado no locus +61 do gene *EGF*, o qual implica uma transição G>A (guanina→adenina) na região promotora do gene *EGF* (SNP ID: rs4444903) ^[84]. Esta transição influencia significativamente os níveis de expressão de EGF, estando a variante G associada a um aumento da biodisponibilidade de EGF no sangue, células tumorais de gliomas e células

de cancro de mama ^[84,85,86]. Sabendo-se que o EGF é expresso em células tumorais da próstata ^[59] e em células de sangue periférico ^[84], é plausível que os portadores do alelo G, associado a maior expressão de EGF ^[84,86], estejam expostos a níveis mais elevados do ligando, com repercussão eventual no tumor por via parácrina e/ou autócrina. Vários estudos de epidemiologia molecular, associam a presença do alelo G a um aumento do risco de desenvolvimento de melanoma, glioma, e cancro gástrico ^[84,86,87].

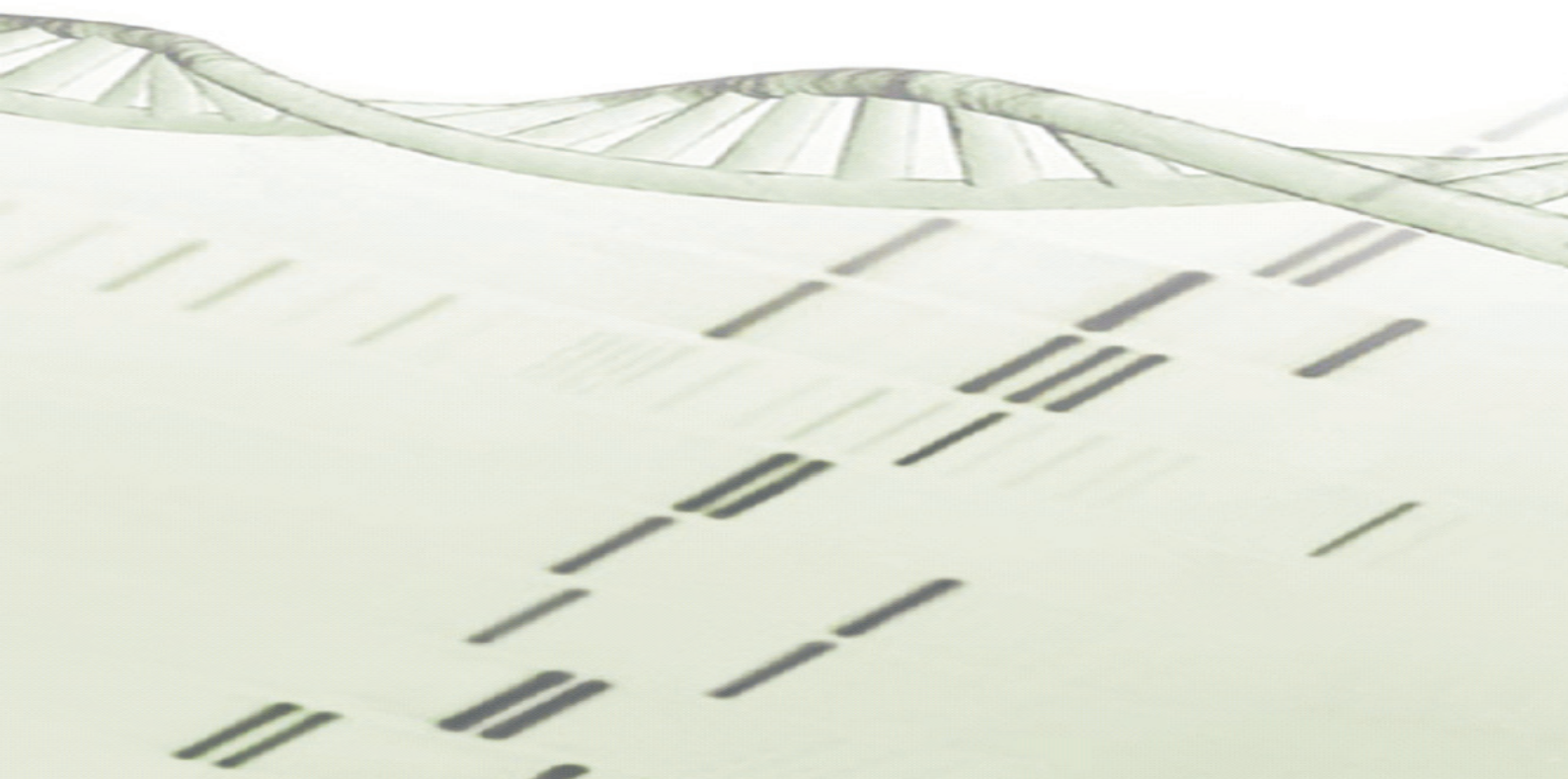
Dos vários polimorfismos descritos no gene *TGFB1*, a variante genética funcional *TGFB1+869T>C* (SNP ID: rs1982073), localizada no locus +29 do codão 10 do exão 1 do gene *TGFB1*, consiste na transição de uma timina (T) por uma citosina (C) esta alteração resulta numa substituição aminoacídica leucina (Leu)→prolina (Pro) e está associada a diferentes níveis séricos de TGFβ1 ^[88], a variante Pro/Pro tem sido associada a um aumento dos níveis séricos de TGFβ1 ^[89,90]. Sendo o TGFβ1 produzido pelas células do estroma da próstata, indivíduos portadores desta variante genética, podem apresentar no microambiente tumoral uma maior concentração de TGFβ1, logo poderão estar mais protegidos em fases iniciais do desenvolvimento tumoral.

Uma vez que ambos os factores de crescimento condicionam o microambiente tumoral, por proporcionarem potencialmente diferentes intensidades de activação das respectivas vias de sinalização e por estas poderem interagir entre si, é necessário compreender de que forma as variantes genéticas funcionais nestes genes, condicionam a susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro da próstata e como influenciam a resposta à TBA individualmente e em combinação segundo categorias de acordo com a sua consequência funcional na proliferação celular.

Até ao momento, ainda não foram desenvolvidos trabalhos que relacionassem o desenvolvimento de CaP e CaPAI com o polimorfismo funcional no gene *EGF*, bem como a influência deste em conjunto com o polimorfismo funcional *TGFB1+869T>C*. Atendendo à importante função que a via de sinalização EGF/EGFR assume, com especial relevância no desenvolvimento de tumores AI com a activação de cascatas proliferativas alternativas e à possível interacção/inibição da via de sinalização mediada pelo TGFβ1, reveste-se de particular interesse analisar se estas variantes se encontram relacionadas com uma susceptibilidade diferencial para o desenvolvimento de CaP e de que modo poderão influenciar o intervalo livre de doença (ILD), em análises isoladas e numa análise combinada, devido à possível interacção estabelecida entre ambas as vias de sinalização.

A caracterização genética individual com base nestes polimorfismos, permitirá identificar grupos de risco para a progressão da doença, estratificar grupos com significado prognóstico e definir o perfil genético de acordo com a resposta à terapia. Assim, a resposta ao tratamento de TBA em doentes diagnosticados com doença avançada, pode ser modulada por estes polimorfismos genéticos funcionais, o que permitirá desenvolver perfis moleculares farmacogenómicos com impacto no tratamento e a orientação da terapêutica dirigida a alvos específicos.

2. Objetivos



No presente trabalho foi desenvolvido um estudo do tipo caso-controlo com os seguintes objectivos:

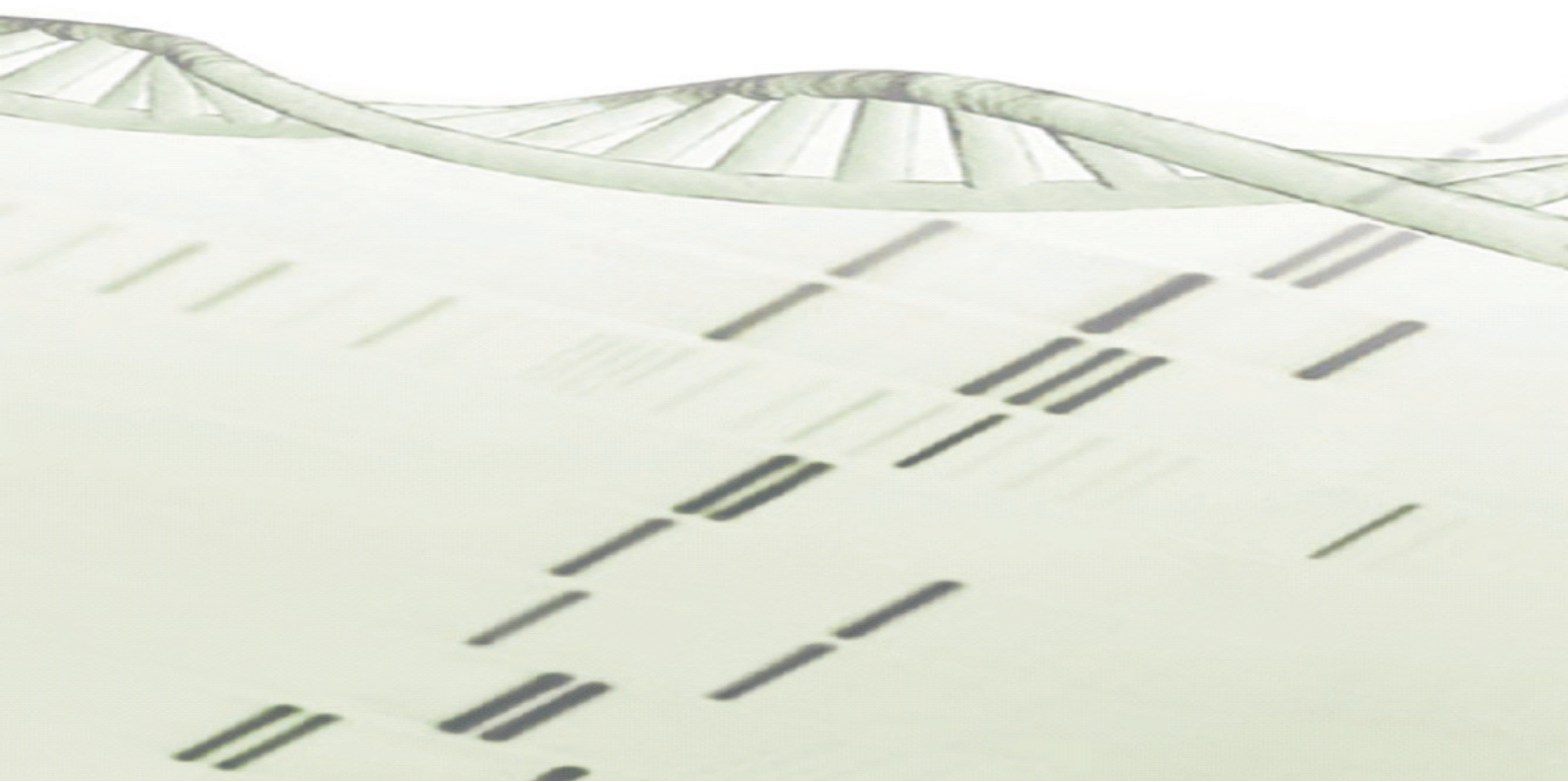
2.1. Objectivo Geral:

Compreender a relevância dos polimorfismos genéticos funcionais *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* no desenvolvimento de cancro da próstata, e a sua repercussão farmacogenómica.

2.2. Objectivos Específicos:

- Analisar a frequência dos polimorfismos genéticos funcionais *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* em indivíduos com cancro da próstata (CaP) e indivíduos sem doença oncológica conhecida e avaliar a susceptibilidade para CaP;
- Avaliar a associação dos polimorfismos estudados, individualmente e em combinação, com características clínico-patológicas dos doentes com CaP;
- Avaliar a influência dos polimorfismos *EGF+61G>A*, *TGFB1+869T>C* e sua combinação, no intervalo livre de doença em doentes submetidos a terapia de bloqueio androgénico.

3. Material e Métodos



3.1. População

O estudo das variantes genéticas funcionais nos genes *EGF* e *TGFB1*, envolvidos na oncobiologia de CaP foi realizado através de um estudo de associação, com base num estudo do tipo caso-controlo, envolvendo quatrocentos e trinta e seis (436) indivíduos do sexo masculino. Todas as amostras são provenientes de indivíduos Portugueses, e foram utilizadas com o seu conhecimento e consentimento prévio, de acordo com a declaração de Helsínquia.

Participaram no estudo cento e vinte e três (123) homens Caucasianos, com uma média de idade de 71.7 ± 7.4 anos, com diagnóstico histopatológico de CaP do Instituto Português de Oncologia do Porto e do Centro Hospitalar Central de Lisboa. O tempo médio do “follow-up” foi 37 meses (2-137 meses). Do grupo de casos em estudo, 11 (9%) apresentavam doença localizada e 112 (91%) doença avançada (invasão e extensão para além da cápsula e/ou tecido adjacente, ou envolvimento dos nódulos linfáticos regionais ou metástases à distância). Foram considerados com doença metastática os indivíduos que apresentavam metástases à distância no momento do diagnóstico (N=36, 29.3%). Todos os doentes foram submetidos a tratamento hormonal: 84.9% dos casos realizaram terapia de bloqueio total, com a administração combinada de antiandrogénios e agonistas da hormona libertadora da hormona luteinizante (aLHRH); 9.2% dos casos realizaram aLHRH e 5.9% dos casos somente antiandrogénios. O estado de androgénio-independência (AI) foi definido com base na recorrência dos valores de PSA, tendo sido definida como dois aumentos consecutivos dos valores de PSA acima de 1.0 ng.mL^{-1} , com diferença de pelo menos 0.2 ng.ml^{-1} .

No grupo controlo foram incluídos trezentos e treze (313) indivíduos do sexo masculino, com uma média de idade de 47.9 ± 12.5 anos, sem evidência de doença neoplásica, recrutados do Banco de Dadores de Sangue do Instituto Português de Oncologia do Porto.

3.2. Procedimentos Laboratoriais

Foram colhidos cerca de 8 mL de sangue venoso periférico a cada um dos participantes no estudo, através de uma técnica padronizada de colheita intravenosa.

3.2.1. Extração de DNA Genómico

O DNA foi isolado a partir de sangue periférico recorrendo ao “kit” de extração da Quiagen®, “QIAamp® DNA Blood Mini Kit” (Quiagen® 51106), no qual o DNA é extraído por um sistema de colunas de centrifugação, de acordo com as especificações do fornecedor.

Este procedimento, que utiliza a sílica para purificação dos ácidos nucleicos, consiste em três passos: adsorção, lavagem e eluição. O método de extração baseia-se na grande afinidade de ligação do DNA à sílica, que reveste as colunas de centrifugação sob a forma de membranas. Estas colunas, além da sílica, possuem resinas com partículas, em suspensão alcoólica, de elevadas concentrações de sais caotrópicos, os quais desnaturam as proteínas. Para que ocorra a adsorção, isto é, a ligação do DNA às partículas de sílica, para além do que foi referido, será necessário um baixo valor de pH. Seguem-se várias lavagens, com diversos tampões com etanol, sendo removidas as proteínas, os polissacarídeos e os sais. No final, o DNA é eluído num tampão de eluição, de baixa concentração salina, e valor de pH elevado.

3.2.2. Genotipagem do Polimorfismo *EGF+61G>A*

A caracterização genotípica dos indivíduos participantes no estudo quanto ao polimorfismo *EGF+61G>A* foi realizada por técnica de “Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism” (PCR-RFLP).

Quanto ao polimorfismo *EGF+61G>A*, o fragmento de DNA de interesse a amplificar localiza-se da região 5' UTR do gene *EGF*, esta região foi amplificada de acordo com um protocolo previamente descrito ^[85]. A região de interesse foi amplificada numa reacção com volume de 50 µL. A mistura de reacção inclui 10 µL de tampão de

3. Material e Métodos

reação (1X), uma unidade de Taq DNA Polimerase (Promega Taq DNA Polymerase), 1.5 mM de MgCl₂ (Promega Taq DNA Polymerase), 0.2 mM de dNTPs (Fermentas #RO192), 0.3 μM de cada um dos “primers” (“forward”: 5'TGT CAC TAA AGG AAA GGA GGT 3'; “reverse”: 5' TTC ACA GAG TTT AAC AGC CC 3') e a uma concentração de cerca de 90 ng de DNA por caso. As condições de amplificação utilizadas foram as seguintes: pré-desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 55°C (emparelhamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) às quais se seguiu um passo final de extensão a 72°C durante 5 minutos. No final da reação é amplificado um fragmento com 242 pb da região 5'UTR do gene *EGF*.

Para confirmação a amplificação do fragmento de DNA pretendido 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 1X (Anexo I), sendo este também utilizado como tampão de electroforese.

As amostras foram aplicadas no gel após mistura prévia com 2 μL de “DNA Loading Dye Solution (Fermentas #R0611) e foi utilizado um marcador molecular de 100 pb (Fermentas #SM0243). A visualização dos géis foi efectuada recorrendo ao transiluminador Gel DocXR (Biorad) (Figura 17)

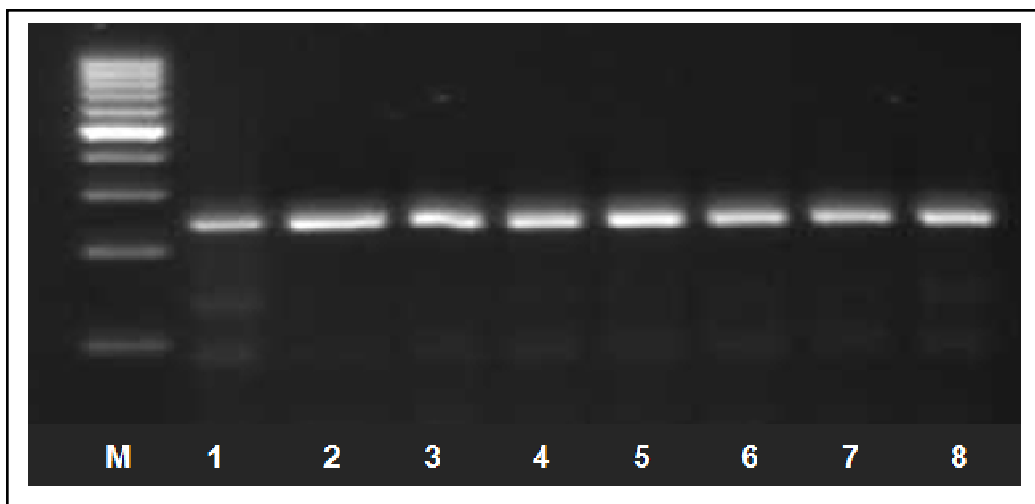


Figura 17. Gel de agarose a 1,5% (p/v), mostrando a banda de 242 pb que corresponde à região de *EGF+61G>A* amplificada por PCR (M- marcador 100 pb).

3. Material e Métodos

Para a análise do polimorfismo no gene *EGF* foram utilizados 5 µL de produto de PCR de cada amostra para restrição com a endonuclease *A**l**u**I* (Fermentas #ER00012), num volume final de reacção de 15 µL. As amostras foram incubadas a 37°C “overnight”.

O resultado da digestão do fragmento amplificado do gene *EGF* contendo o locus de interesse foi observado por electroforese em gel de agarose a 3% (p/v), corado com brometo de etídeo (10 µg/mL)

A ocorrência do polimorfismo é definida pela presença (alelo A (A)) ou ausência (Alelo G (G)) de um local adicional de restrição. A digestão do fragmento do gene *EGF* resulta em 3 padrões de bandas, permitindo identificar os diferentes genótipos do polimorfismo *EGF*+61G>A: 3 bandas de 193, 34, 15 pb respectivamente, correspondem ao alelo G; 4 bandas de respectivamente 102, 91, 34, 15 pb correspondem ao alelo A; 5 bandas de 193, 102, 91, 34, 15 pb respectivamente, correspondem a heterozigotia (Figura 18).

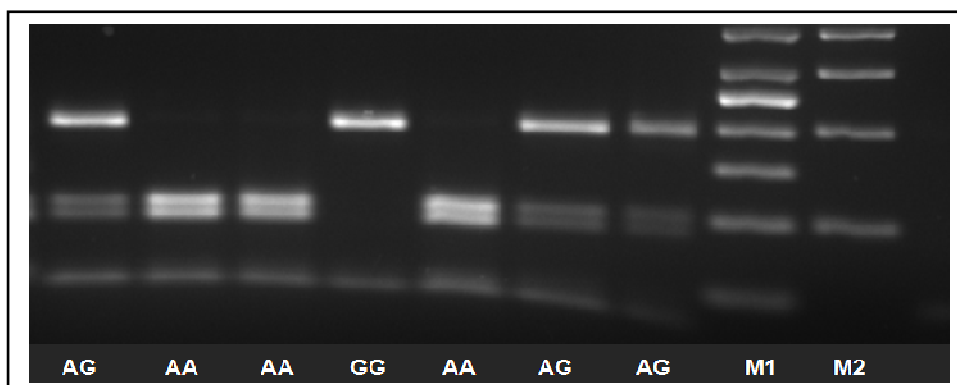


Figura 18. Gel de agarose a 3% (p/v), após PCR-RFLP, observando-se os 3 genótipos possíveis do polimorfismo *EGF*+61G>A (M1- marcador 50pb, M2- marcador 100 pb).

3.2.3. Genotipagem do Polimorfismo *TGFB1+869T>C*

A variante genética *TGFB1+869T>C* foi analisada por discriminação alélica, usando “Real-Time Polymerase Chain Reaction” (Real-Time PCR) (ABI7300). O polimorfismo foi analisado por discriminação alélica, efectuada por tecnologia “TaqMan” (Applied Biosystems) utilizando-se o “assay” C__22272997_10 em que as sondas marcadas com fluorocromos eram específicas para cada alelo: VIC- alelo T (CCCTCCGGGCTGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTACCGCTGCTGTGG), FAM-alelo C (CCCTCCGGGCTGCGGCTGCTGCCGCTGCTGCTACCGCTGCTGTGG).

A reacção de amplificação foi efectuada para um volume de 6µL/caso contendo 2.5 µL de 2x “Taqman Universal Master Mix”, 0.125 µL de 40x “Single Nucleotide Polymorphism Genotyping assay”, 2.375 µL de água, com 1 µL de DNA (~90 ng).

A amplificação foi detectada e analisada com recurso ao aparelho “Real-Time 7300 ABI” e através do “software” “7300 System Sequence Detection” (versão 1.2.3 Applied Biosystems). As condições de reacção foram as seguintes: activação da Taq DNA Polimerase a 95°C durante 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 92°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para emparelhamento dos primers e extensão (Figura 19).

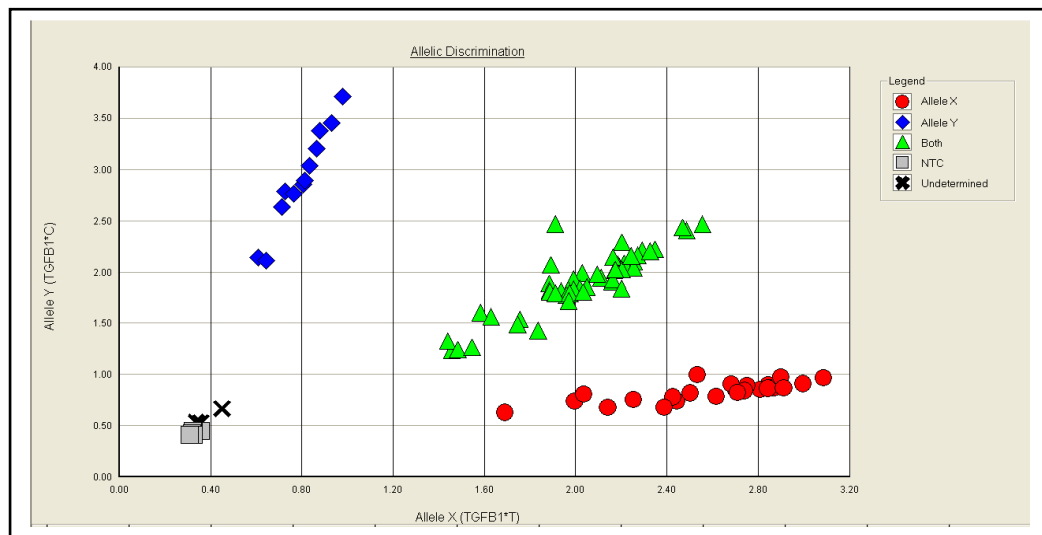


Figura 19. Representação de um “Real-Time PCR” para o polimorfismo *TGFB1+869T>C*.

(Azul: homocigóticos C; Vermelho: homocigóticos T; Verde: heterocigóticos; Cinza: controlos negativos).

3.3. Análise Estatística

A análise estatística de variáveis categóricas foi efectuada considerando as distribuições genotípicas estratificadas de acordo com os grupos (CaP, Controlos), com as características clinicopatológicas dos pacientes (grau Gleason, estadio da doença, androgénio-independência, metástases à distância). Foi usado o teste qui-quadrado de Pearson (χ^2) para análise de diferenças entre genótipos.

O risco para ser diagnosticado com CaP associado aos genótipos foi calculado através do “odds Ratio” (OR) e respectivo intervalo de confiança 95% (IC 95%). Utilizou-se o modelo recessivo para análise de risco de CaP associado aos polimorfismos *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C*, devido às repercussões funcionais previamente descritas na literatura.

A fracção de risco atribuível foi calculada usando-se a fórmula matemática $AP=PRF \times (1/OR)$. A fracção atribuível (AP) é a fracção da doença atribuída ao factor de risco, PRF é a percentagem do factor de risco nos casos e o OR é o “odds ratio”.

O intervalo livre de doença (ILD) designa-se como intervalo de tempo (em meses) entre a data de diagnóstico e o momento de AI. Foi analisado através de curvas de sobrevivência segundo o modelo univariado de Kaplan-Meier e a comparação entre genótipos medida pelo teste Log-Rank.

A análise multivariada relativamente ao risco para desenvolver AI nos doentes com CaP de acordo com os genótipos, foi efectuada através da regressão de Cox com ajustamentos para a idade (≥ 69 *versus* < 69 anos), realização de cirurgia (sim *versus* não), metastização (não metastático *versus* metastático) e tipo de tratamento hormonal (antiandrogénios *versus* aLHRH *versus* terapia combinada). O grau Gleason (2-10) foi estratificado segundo 2 grupos (< 7 *versus* ≥ 7), de acordo com a associação a doença mais agressiva.

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

Os dados foram analisados usando o “Statistical Package for Social Sciences - SPSS for Windows” (version 15.0) e foram considerados estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0.05.

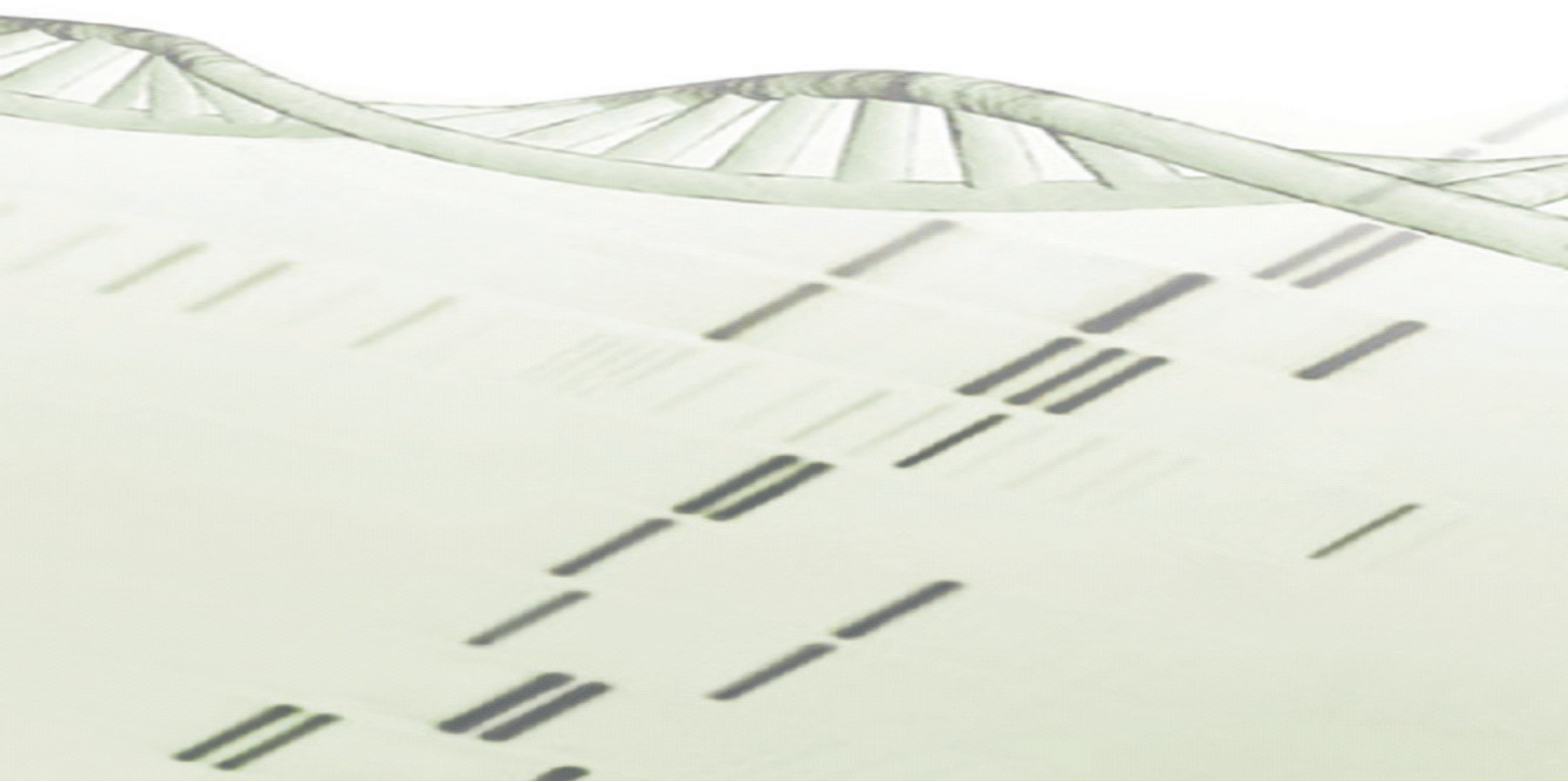
3. Material e Métodos

Com o intuito de avaliar o efeito gene-gene, definiu-se o perfil genético combinando atendendo ao fenótipo de expressão genética de *EGF* e *TGFB1* de acordo com estudos *in vitro* (Quadro I).

Quadro I. Combinação dos polimorfismos *EGF+61G>A* e *TGF+869T>C* segundo um perfil genético de proliferação celular.

Combinação	<i>EGF+61G>A</i>	<i>TGFB1+869T>C</i>	Perfil de Proliferação
AA-CC	AA	CC	Baixa Proliferação
AA-CT/TT	AA	CT/TT	Média Proliferação
AG/GG-CC	AG/GG	CC	Média Proliferação
AG/GG-CT/TT	AG/GG	CT/TT	Alta Proliferação

4. Resultados



4.1. Associação dos Polimorfismos *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* na Susceptibilidade e Agressividade de Cancro da Próstata

A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos de casos e controlos, de acordo com os genótipos, permitiu observar que as frequências genotípicas observadas eram similares às esperadas para o polimorfismo *EGF+61G>A* (casos, $P=0.400$; controlos, $P=0.820$), para o polimorfismo *TGFB1+869T>C* (casos, $P=0.198$; controlos, $P=0.807$) e para o perfil genético combinado *EGF/TGF* (casos, $P=0.835$; controlos, $P=0.069$).

A distribuição das frequências dos genótipos do polimorfismo *EGF+61G>A* entre o grupo controlo e o grupo de homens com CaP está descrita no quadro II.

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

Quadro II. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *EGF+61G>A* no grupo controlo e no grupo de casos.

	Controlos N (Frequência)	Casos N (Frequência)	OR	IC 95%	P^a
Genótipos					
AA	125 (0.40)	33 (0.27)	1.0	Referência	-
AG	123 (0.39)	58 (0.47)	1.79	1.06-3.02	0.021*
GG	65 (0.21)	32 (0.26)	1.86	1.01-3.43	0.031*
Mod. Recessivo					
AA	125 (0.40)	33 (0.27)	1.0	Referência	
Portador G	188 (0.60)	90 (0.73)	1.81	1.12-2.95	0.010
Alelos					
A	373 (0.60)	124 (0.50)			
G	253 (0.40)	122 (0.50)	1.45	1.07-1.97	0.014

OR, "odds ratio"; IC95%, intervalo de confiança a 95%; a, teste χ^2

* tendência linear para a presença de 0, 1 ou 2 alelos G ($P= 0.022$)

4. Resultados

Os portadores AG e GG apresentam risco aumentado para desenvolver CaP comparativamente com os portadores AA (OR=1.79, IC95%=1.06-3.02, $P=0.021$; OR=1.86, IC95%=1.01-3.43, $P=0.031$, respectivamente), com uma tendência linear estatisticamente significativa ($P=0.002$).

Na análise de acordo com o modelo recessivo e com o perfil fenotípico funcional, foram agrupados os genótipos (AA vs portador G), verificando-se risco aumentado para CaP nos portadores G ($P=0.010$). A comparação das frequências alélicas permitiu observar igualmente risco acrescido nos portadores G para CaP ($P=0.014$).

A fracção atribuível de risco para os indivíduos portadores do alelo G é de 40%.

No quadro III estão descritas as frequências dos genótipos do polimorfismo *TGFB1+869T>C* nos grupos controlo e de casos.

Quadro III. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *TGFB1+869T>C* no grupo controlo e no grupo de casos.

	Controlos N (Frequência)	Casos N (Frequência)	OR	IC95%	P^a
Genótipo					
CC	63 (0.20)	23 (0.81)	1.0	Referência	
CT	137 (0.44)	55 (0.46)	1.10	0.60-2.03	0.744
TT	113 (0.36)	42 (0.35)	1.04	0.55-1.97	0.891
Mod.Recessivo					
CC	63 (0.20)	23 (0.81)	1.0	Referência	
Portador T	250 (0.20)	97 (0.19)	1.06	0.61-1.87	0.822
Alelos					
C	263 (0.42)	101 (0.42)			
T	363 (0.58)	139 (0.58)	1.00	0.73-1.36	0.985

OR, "odds ratio"; IC95%, intervalo de confiança a 95%; a, teste χ^2

Não foram observadas diferenças com significado estatístico na distribuição genotípica, modelo recessivo e distribuição alélica ($P=0.891$, $P=0.822$, $P=0.985$, respectivamente), entre o grupo de CaP e o grupo controlo.

As frequências segundo o perfil genético combinado e respectivos riscos estão descritas no quadro IV. Os portadores de um perfil de média e alta proliferação apresentam risco acrescido para desenvolver CaP (OR=4.97, IC95%=1.09-31.44, $P=0.019$; OR=5.68, IC95%=1.26-37.0, $P=0.010$, respectivamente), comparativamente com o perfil de baixa proliferação. A fracção de risco atribuível para os portadores de um perfil genético de média e alta proliferação foi de 19% e 17%, respectivamente.

Quadro IV. Distribuição das frequências genotípicas dos diferentes perfis de proliferação celular, definidos com base no agrupamento dos polimorfismos *EGF+61G>A* - *TGFB1+869T>C*, e respectivo "odds ratio" (OR)

	Controlos	Casos	OR	IC95%	P^a
	N (Frequência)	N (Frequência)			
Perfil de Proliferação					
Baixa Proliferação ¹	26 (0.08)	2 (0.02)	1.0	Referência	
Média Proliferação ²	136 (0.44)	52 (0.43)	4.97	1.09-31.44	0.019
Alta Proliferação ³	151 (0.48)	66 (0.55)	5.68	1.26-37.0	0.010

OR, "odds ratio"; IC95%, intervalo de confiança a 95%; a, teste χ^2

¹ (EGF+61G>A→AA); (TGFB1+869T>C→CC)

² (EGF+61G>A→AA); (TGFB1+869T>C→CT/TT)

² (EGF+61G>A→AG/GG); (TGFB1+869T>C→CC)

³ (EGF+61G>A→AG/GG); (TGFB1+869T>C→CT/TT)

O quadro V apresenta os “odds ratio” (OR) relativos ao risco para os portadores G serem diagnosticados com doença mais agressiva (doença avançada, metástases, Gleason \geq 7). Atendendo ao grau histológico de Gleason, verificou-se que os portadores G apresentam risco aumentado para serem diagnosticados com tumor mais agressivo, isto é, com grau de Gleason \geq 7 (OR=2.76, IC95%=1.39-5.56, $P=0.002$).

Atendendo a outras características associadas a doença com fenótipo agressivo, como doença avançada e presença de doença metastática, os resultados evidenciam que os portadores do alelo G têm risco aumentado para serem diagnosticados com CaP metastático (OR=2.33; IC 95%:0.97-5.74, $P= 0.038$) e com doença avançada (OR=1.74; IC 95%=1.06-2.86; $P = 0.021$) (Quadro V).

Quadro V. Risco para os portadores do alelo G do polimorfismo *EGF+61G>A* no momento do diagnóstico apresentarem doença avançada, doença metastática ou grau de Gleason \geq 7.

	OR ^a	IC 95%	P^c
Grupo Controlo	Referente		
Doença Avançada ^b	1.74	1.06-2.86	0.021
Metástases ^b	2.33	0.97-5.74	0.038
Gleason \geq 7 ^b	2.76	1.39-5.56	0.002

^a “Odds ratio” (OR) calculado entre os sub-grupos de doença agressiva estratificados a partir de variáveis clínico-patológicas, tendo como referência as frequências genotípicas do grupo controlo, segundo o modelo recessivo. OR apresentado para o genótipo AG/GG.

^b Características clínico-patológicas no momento do diagnóstico/tratamento cirúrgico.

^c Teste χ^2 .

Relativamente ao polimorfismo *TGFB1+869T>C* verificou-se que não havia associação entre os genótipos, segundo o modelo recessivo ou distribuição alélica e doença agressiva, nomeadamente com doença avançada, metástases e grau de Gleason \geq 7 (Quadro VI).

Quadro VI. “Odds ratio” (OR) e respectivos intervalos de confiança para os portadores T serem diagnosticados com doença agressiva (doença avançada, metástases, Gleason \geq 7) por comparação com o grupo controlo.

	OR ^a	IC95%	P ^c
Grupo Controlo	Referente		
Doença Avançada ^b	0.94	0.53-1.67	0.828
Metástases ^b	0.97	0.38-2.58	0.949
Gleason \geq 7 ^b	1.11	0.54-2.34	0.759

^a “Odds ratio” (OR) calculado entre os sub-grupos de doença agressiva estratificados a partir de variáveis clínico-patológicas, tendo como referência as frequências genótípicas do grupo controlo, segundo o modelo recessivo. OR apresentado para o genótipo CT/TT.

^b Características clínico-patológicas no momento do diagnóstico/tratamento cirúrgico.

^c Teste χ^2 .

No quadro VII estão descritos os OR relativos ao risco para os portadores de um perfil genético de alta proliferação celular apresentarem doença agressiva no momento do diagnóstico. Os portadores de um perfil genético de alta proliferação celular têm risco aumentado para no momento do diagnóstico apresentarem CaP com grau de Gleason \geq 7 (OR=1.83, IC95%=1.02-3.30, $P=0.030$) quando comparados com os de baixa/média proliferação. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos quando foi considerada a doença avançada (OR=1.18, IC95%=0.74-1.86, $P=0.466$) ou doença metastática (OR=1.36, IC95%=0.63-2.93, $P=0.397$).

Quadro VII. Risco para os portadores do perfil genético de alta proliferação no momento do diagnóstico apresentarem doença agressiva (doença avançada, metástases, Gleason \geq 7) por comparação com o grupo controlo.

	OR ^a	IC95%	P ^c
Grupo Controlo	Referente		
Doença Avançada ^b	1.18	0.74-1.86	0.466
Metástases ^b	1.36	0.63-2.93	0.397
Gleason \geq 7 ^b	1.83	1.02-3.30	0.030

^a "Odds ratio" (OR) calculado entre os su-grupos de doença agressiva estratificados a partir de variáveis clínico-patológicas, tendo como referência as frequências genotípicas do grupo controlo, segundo o modelo recessivo. OR apresentado para o perfil de alta proliferação.

^b Características clínico-patológicas no momento do diagnóstico/tratamento cirúrgico.

^c Teste χ^2 .

4.2. Distribuição das Frequências Genóticas dos Polimorfismos *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* em Populações Controlo

Na figura 20 encontram-se descritas as frequências genóticas do polimorfismo *EGF+61G>A* segundo o modelo funcional, em quatro populações mundiais. As frequências genóticas foram calculadas com base em trabalhos já publicados, encontrando-se já inseridos os resultados do presente estudo na população Europeia usada como referência.

De acordo com os resultados obtidos, não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre a população Europeia e dos Estados Unidos da América ($P=0.137$) e Austrália ($P=0.448$). Contudo, verificam-se diferenças estatisticamente significativas quando se comparam as frequências genóticas da população Europeia com a Asiática ($P<0.0001$).

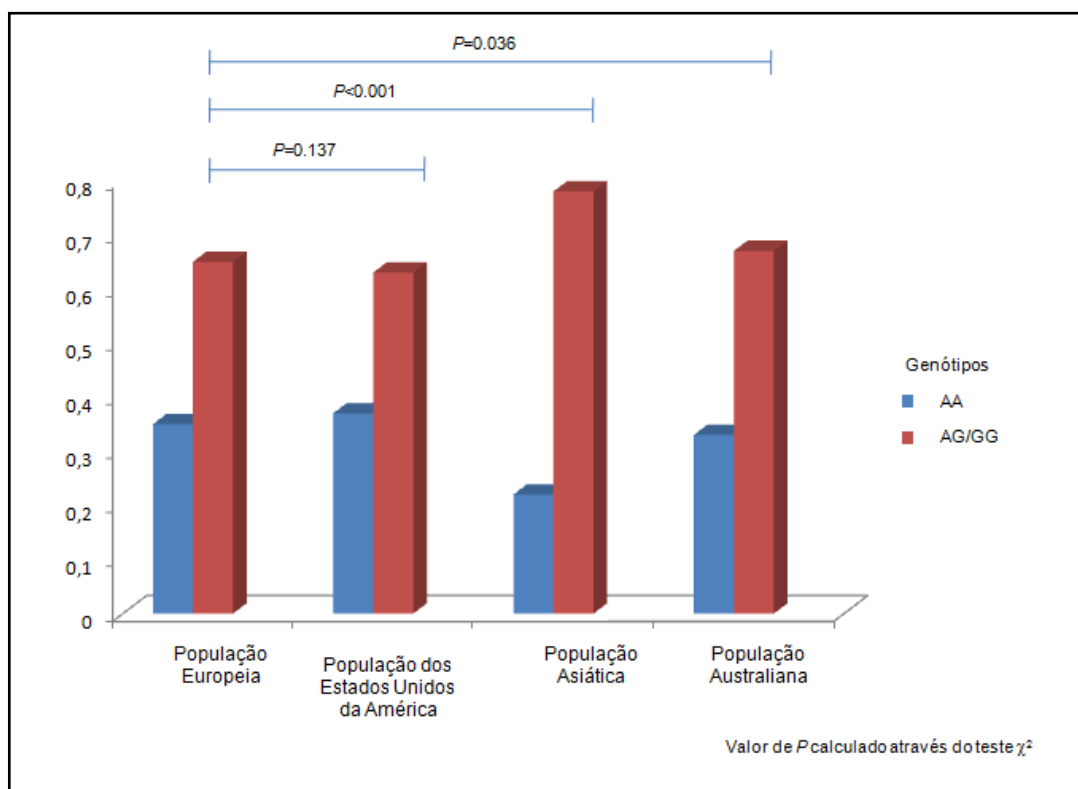


Figura 20. Estudo comparativo das frequências genóticas do polimorfismo *EGF+61G>A* em populações controlo.

4. Resultados

Quando comparadas as frequências genóticas do polimorfismo *TGFB1+869T>C* (Figura 21), constatamos diferenças estatisticamente significativas entre a população Europeia, que englobava já o presente estudo e a população Asiática ($P<0.0001$), não se mantendo estas diferenças quando comparada a população Europeia com a população dos Estados Unidos da América ($P=0.775$).

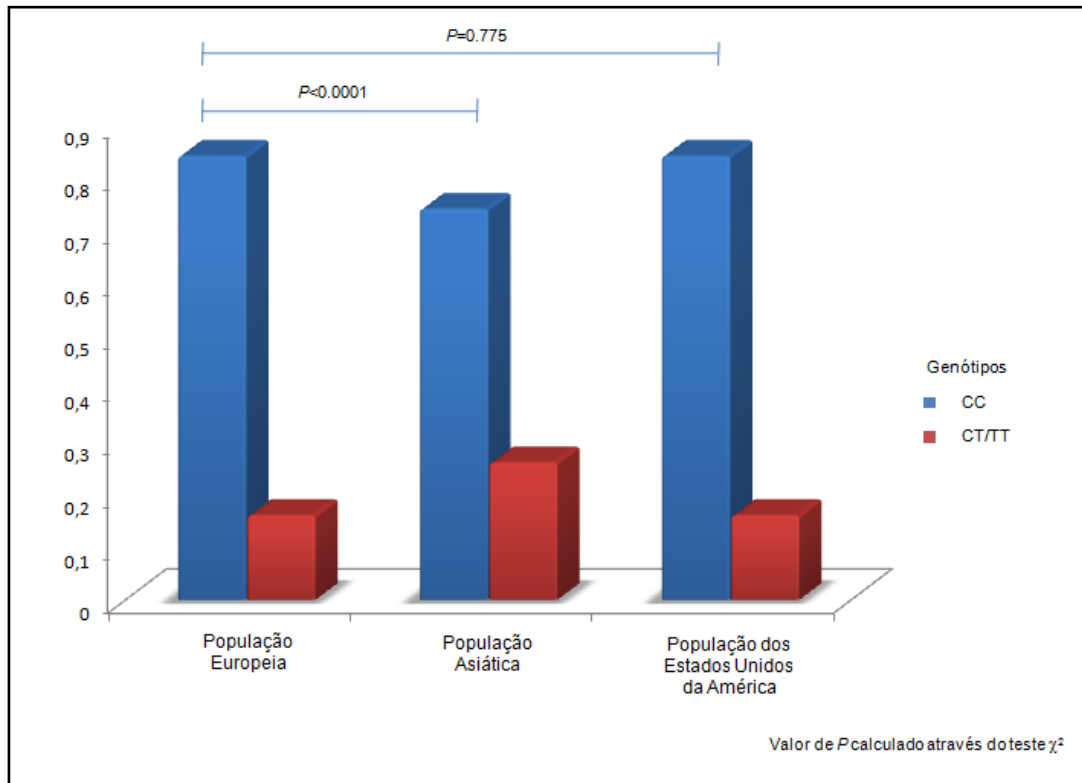


Figura 21. Estudo comparativo das frequências genóticas do polimorfismo *TGFB1+869T>C* em populações controlo.

4.3. Associação dos Polimorfismos *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* na Resposta à Terapia de Bloqueio Androgénico

A análise das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para o polimorfismo *EGF+61G>A* (Figura 22), evidencia uma probabilidade cumulativa de progressão da doença maior para os portadores G. O intervalo livre de doença (ILD) é significativamente inferior nos portadores AG/GG em comparação com os homozigóticos AA (15.2 e 87.4 meses, respectivamente, $P=0.018$), demonstrando uma recidiva precoce nos doentes com CaP portadores do alelo G submetidos a TBA.

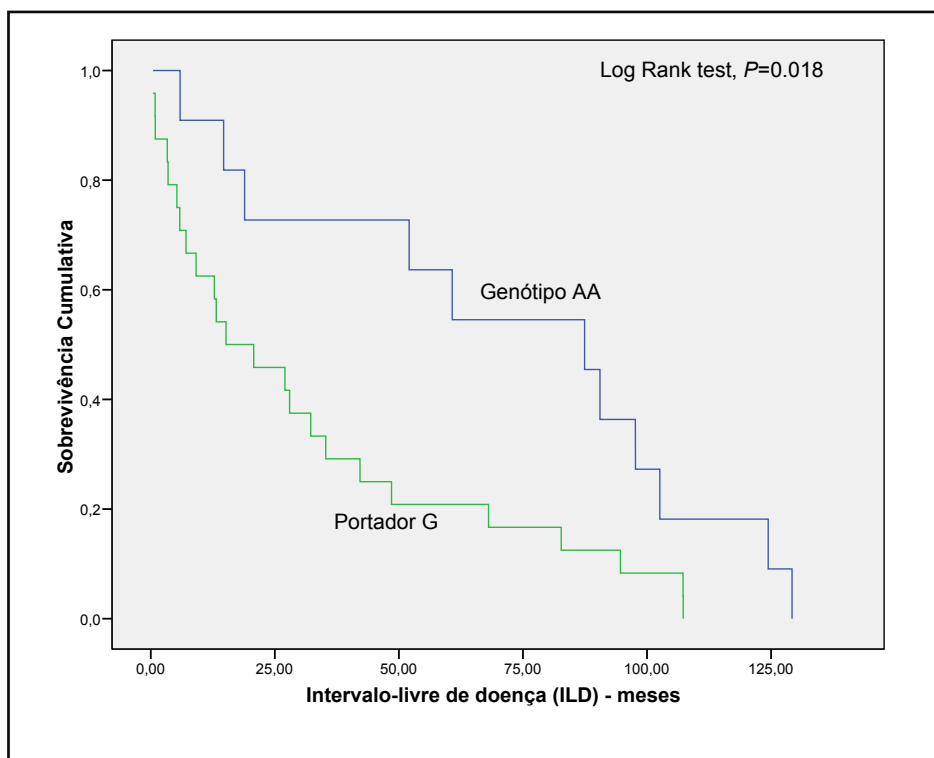


Figura 22. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste Log Rank após terapia de bloqueio androgénico (TBA) em doentes com cancro da próstata: influência do polimorfismo *EGF+61G>A*.

A análise multivariada por regressão de Cox, mostra uma tendência para os portadores do alelo G desenvolverem precocemente AI relativamente aos portadores AA, após ajustamento para a idade (≥ 69 versus < 69 anos), cirurgia (sim versus não), metastização (não metastático versus metastático) e tipo de tratamento hormonal

(antiandrogénios *versus* aLHRH *versus* terapia combinada) (HR=2.6, CI95%=0.96-7.23, $P=0.060$).

A figura 23, mostra o ILD e respectivas curvas de kaplan-Meier de acordo com os genótipos do polimorfismo $TGFB1+869T>C$. Não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa entre os genótipos do polimorfismo e a mediana para progressão da doença, que foi de 68.1 meses para os portadores CC e de 27.0 meses para os portadores T ($P= 0.452$).

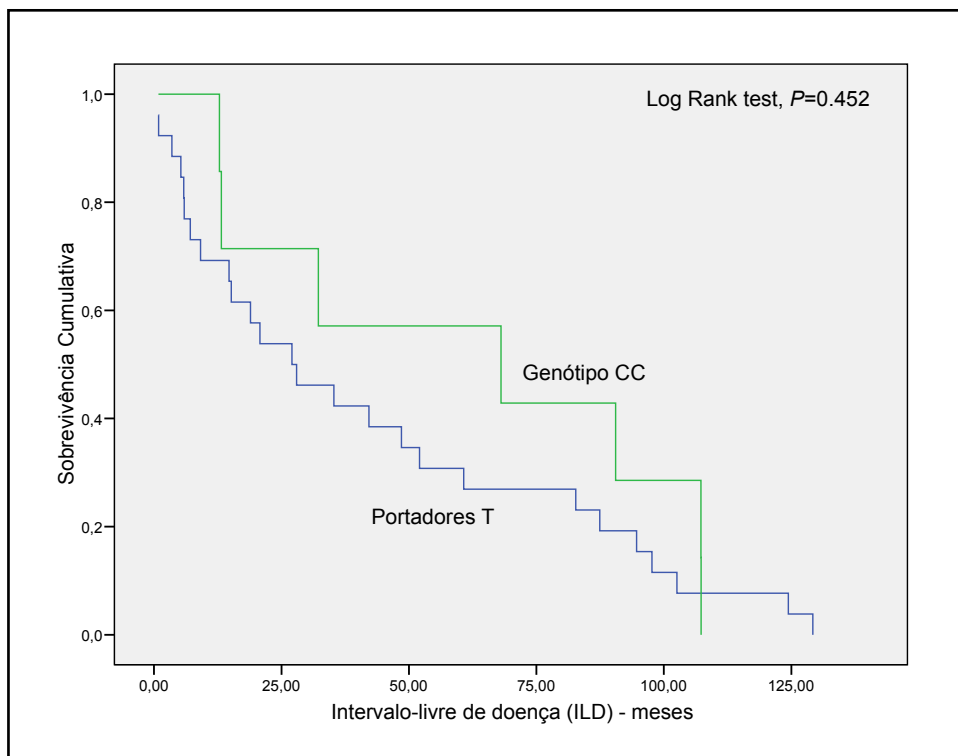


Figura 23. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste Log Rank após terapia de bloqueio androgénico (TBA) em doentes com cancro da próstata: influência do polimorfismo $TGFB1+869T>C$.

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas nas curvas de sobrevivência dos doentes submetidos a TBA, tendo em conta o perfil genético de proliferação celular combinado (Figura 24). Os portadores de um perfil genético de alta proliferação apresentam um valor mediano de ILD baixo, em comparação com os portadores de um perfil de baixa/média proliferação (15.2 e 68.1 meses,

respectivamente). A análise multivariada por regressão de Cox, mostra que os portadores de um perfil genético de alta proliferação, desenvolvem AI mais cedo que os portadores de um perfil genético de baixa-média proliferação, ajustando para a idade (≥ 69 *versus* < 69 anos), cirurgia (sim *versus* não), metastização (não metastático *versus* metastático) e tipo de tratamento hormonal (antiandrogénios *versus* aLHRH *versus* terapia combinada) (HR=3.0, CI95%=1.20-7.40, $P=0.019$).

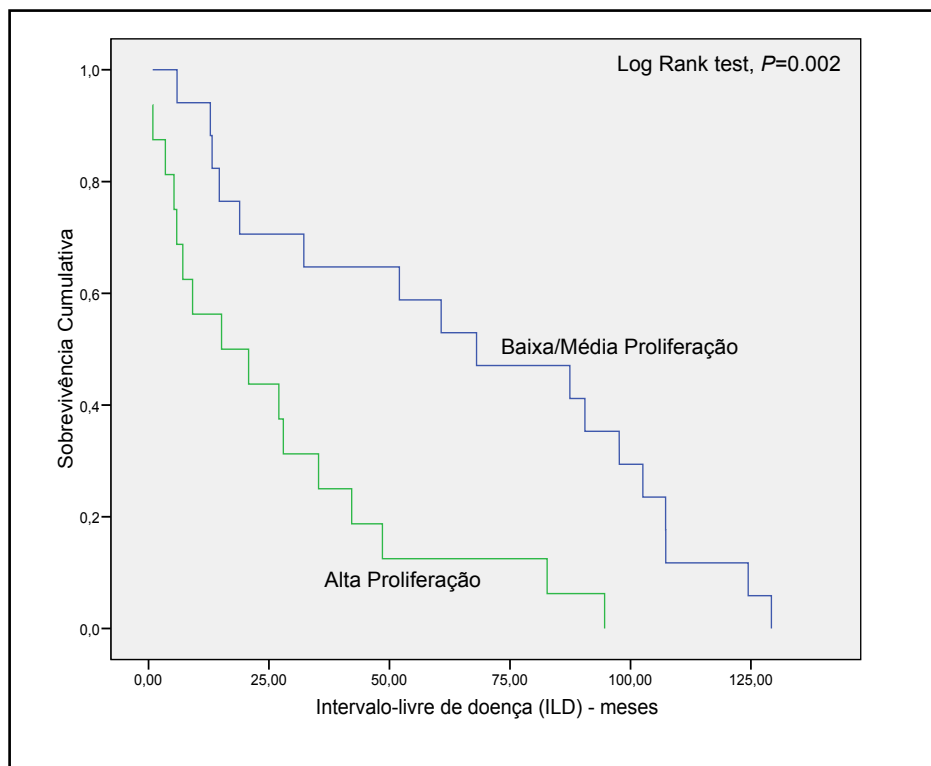
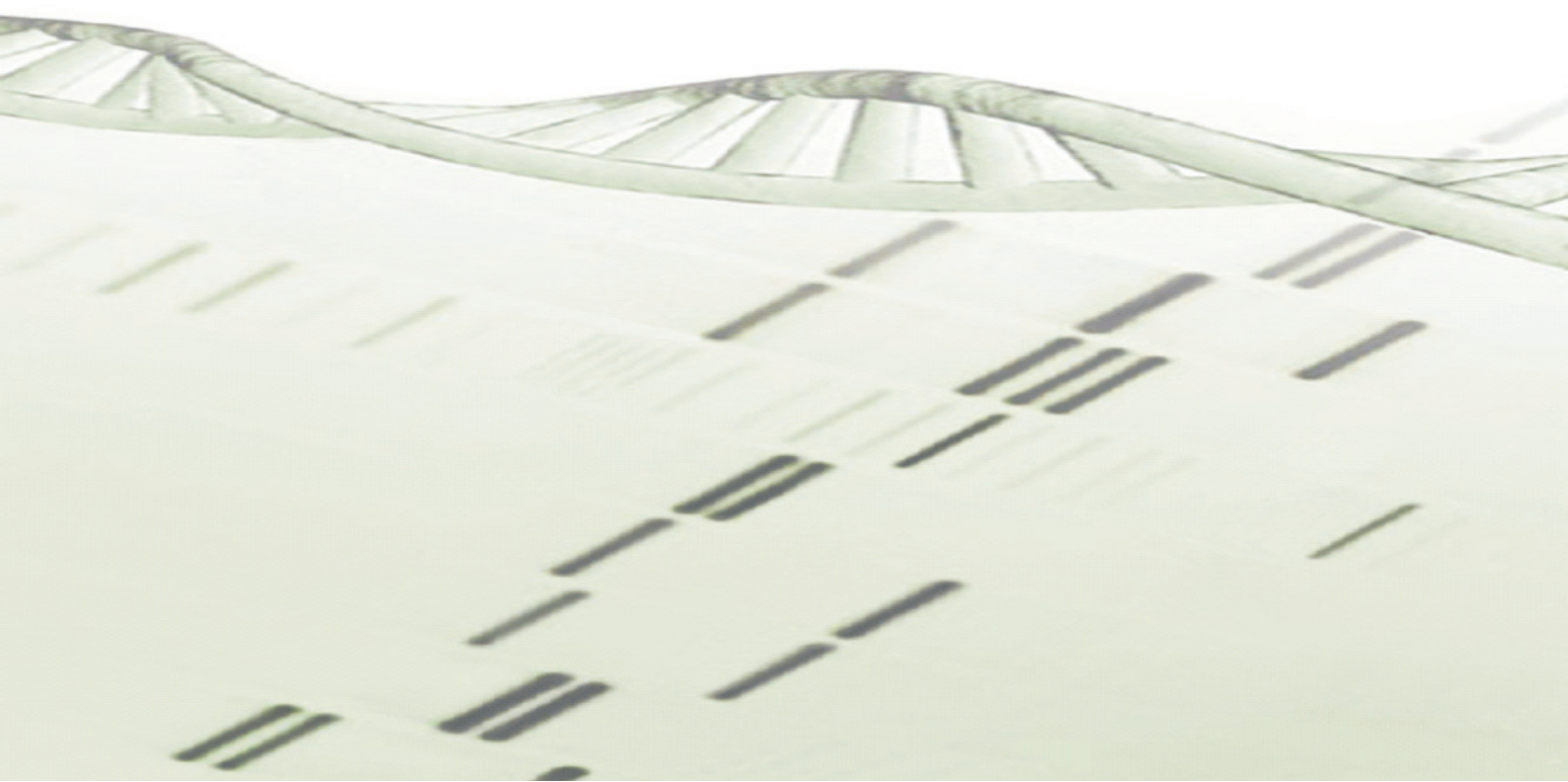


Figura 24. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste Log Rank após terapia de bloqueio androgénico (TBA) em doentes com cancro da próstata: influência dos polimorfismo *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* combinados.

5. Discussão



Apesar do grande investimento na investigação oncológica nos últimos anos, o cancro permanece uma doença a explorar como objecto de estudo, já que o seu carácter complexo e heterogéneo advém da interacção entre factores ambientais e genéticos.

Durante o desenvolvimento tumoral, ocorrem alterações em importantes processos celulares. O controlo da proliferação celular é um dos principais processos que sofre modificação, estando nas células neoplásicas geralmente sobre-regulado. Paralelamente às alterações genéticas somáticas que as células adquirem durante a transformação neoplásica, a variabilidade genética do hospedeiro, nomeadamente em genes-alvo específicos, também contribui e influencia todo o desenvolvimento tumoral.

O EGF e TGF β 1 são importantes factores de crescimento com funções opostas no controlo da proliferação celular. Devido ao equilíbrio funcional existente entre os diversos órgãos e tecidos, numa situação normal estes factores de crescimento contribuem para o equilíbrio estabelecido entre estimulação *versus* inibição da proliferação celular, favorecendo a homeostasia dos sistemas biológicos celulares. Polimorfismos funcionais nos genes que codificam estas proteínas, podem contribuir para fenótipos de desequilíbrio no processo de proliferação celular, uma vez que poderá ocorrer alteração da biodisponibilidade de EGF e/ou TGF β 1. Em situações de transformação neoplásica, esta alteração na biodisponibilidade de EGF e TGF β 1, devido a variantes funcionais nos genes que os codificam, podem condicionar o desenvolvimento tumoral por alterações induzidas no microambiente tumoral. Alterações prolongadas da biodisponibilidade de importantes factores de crescimento, podem constituir importantes pressões selectivas, responsáveis por diferentes padrões de proliferação e diferenciação celular. Estas alterações prolongadas de factores de crescimento, reflectem o perfil genético individual, que por serem consequência de variantes do genoma com origem na linha germinativa, ditam a exposição ao longo da vida a diferentes concentrações de factores de crescimento.

Actualmente, verifica-se que a ocorrência destas variantes genéticas, apresenta uma grande heterogeneidade geográfica, com acentuadas diferenças na sua distribuição, quando comparadas, diferentes populações. A análise da distribuição das frequências alélicas de diferentes polimorfismos em diferentes populações, pode constituir um importante meio de auxílio para interpretação de resultados obtidos à luz de diferentes influências ambientais e culturais.

5.1. Distribuição das Frequências Genóticas dos Polimorfismos *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* em Populações Controlo

Dos polimorfismos descritos no gene *EGF*, o *EGF+61G>A* tem sido o mais estudado, já que foi consistentemente associado a diferenças significativas na expressão genética. A análise do polimorfismo em populações controlo, permitiu constatar algumas diferenças quanto às frequências alélicas de acordo com etnias e distribuição geográfica.

Em populações orientais, nomeadamente Japonesa e Chinesa, os génotipos AG/GG, referentes ao polimorfismo *EGF+61G>A* estão presentes em 78% da população normal [87,91]. Nas populações normais Caucásicas da Europa verifica-se uma distribuição genotípica distinta, em que os indivíduos portadores do alelo G são significativamente menos frequentes (65%) ($P<0.0001$) [84,92,93, presente estudo]. Estudos com base em populações normais dos Estados Unidos da América e Austrália [85,94,95] sugerem que a frequência dos indivíduos portadores do alelo G é similar à Europa ($P=0.137$, $P=0.448$, respectivamente).

A distribuição das frequências genóticas do polimorfismo *TGFB1+869T>C* de acordo com a localização geográfica, evidenciou resultados semelhantes ao polimorfismo *EGF+61G>A*, isto é, apenas para as populações Orientais normais havia diferenças com significado estatístico ($P<0.0001$) [96-101]. Observa-se uma sobre-representação do génotipo homocigótico C (84%) na população Europeia, comparativamente, com a Asiática (74%).

De acordo com os resultados obtidos, relativamente ao polimorfismo *EGF+61G>A*, o génotipo de risco para CaP corresponde ao AG/GG. Paradoxalmente, a frequência deste génotipo na população Asiática é significativamente mais elevada do que na Europeia, apesar de a taxa de incidência de CaP nos países Asiáticos ser das mais baixas no mundo [18]. Apesar desta aparente incongruência, esta evidência poderá ser explicável pela relação gene-ambiente.

Apesar da elevada percentagem de portadores do génotipo de risco em países Asiáticos, estes possivelmente estarão protegidos devido a hábitos alimentares e estilos de vida, que em conjunto com o génotipo contribuem para o desenvolvimento de CaP. A ingestão de produtos naturais, que apresentam na sua constituição elevada concentração de flavonóides, isoflavonóides, entre outros, encontra-se intimamente associada a hábitos alimentares típicos de países Asiáticos, como o Japão e China.

Compostos como o isoflavonóide genisteína apresentam como principal função a inibição de domínios de cinase de resíduos de tirosina de diferentes receptores celulares [102,103], podendo provocar a inibição da activação de cascatas de transdução de sinal que medeiam a proliferação celular, como a cascata EGF/EGFR. A administração de elevadas concentrações de genisteína provoca também a diminuição da expressão de mRNA de *EGF* [102].

Uma vez que a via de sinalização EGF/EGFR influencia a expressão de *SMAD7*, a sua inibição provoca uma diminuição da proteína citoplasmática *SMAD7*. Devido à baixa disponibilidade de *SMAD7*, a via $TGF\beta 1/T\beta RI-RII$ não sofre inibição, permanecendo esta cascata de sinalização hiper-activada. Deste modo ocorre repressão da proliferação/crescimento celular o que, em situações de iniciação e promoção tumoral, pode apresentar vantagem. Em populações de origem Asiática, o genótipo de risco CT/TT, para o polimorfismo *TGFB1+869T>C*, associado a menor concentração de $TGF\beta 1$ é o mais frequente. Contudo, neste portadores o desenvolvimento de CaP poderá estar comprometido, devido à interacção das vias de sinalização EGF/EGFR- $TGF\beta 1/T\beta RI-RII$, que resulta numa optimização da principal função da via $TGF\beta 1/T\beta RI-RII$.

O genótipo individual, pode em conjunto com o ambiente em que o indivíduo se encontra inserido, provocar uma susceptibilidade diferencial para o desenvolvimento de CaP, prova disto é que indivíduos Asiáticos que emigram para países ocidentais, nomeadamente EUA, ao fim de algum tempo apresentam taxas de incidência de CaP semelhantes ao país de acolhimento. Este facto poderá dever-se à adopção de novos hábitos alimentares e modos de vida diferentes dos praticados no país de origem, que já não incluem muitos dos protectores naturais que estavam incluídos, por exemplo, na alimentação.

5.2. Associação dos Polimorfismos *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* na Susceptibilidade e Agressividade de Cancro da Próstata

O EGF tem sido descrito como um dos mais influentes mitogénios da regulação funcional da próstata ^[104]. Admite-se que o EGF e a hormona DHT têm funções complementares na regulação da proliferação de células da próstata ^[60]. Concomitantemente, tem sido descrito que o seu receptor transmembranar, EGFR, se encontra sobre-expresso em tumores prostáticos ^[105], o que se poderá traduzir numa maior activação da via de sinalização e conseqüentemente numa maior proliferação celular. O EGFR é pouco expresso em situações benignas da próstata e em área de neoplasias intraepiteliais da próstata de baixo grau (PIN), contudo apresenta uma expressão aumentada em locais de PIN de alto grau e em células neoplásicas malignas. Os níveis e padrão de expressão de *EGF* e *EGFR* em células de CaP sofrem alteração durante a progressão da doença para fenótipos mais agressivos como são os cancros da CaPAI e os CaP metastáticos ^[106].

A sobre-expressão de ligandos do receptor EGFR, como o EGF ou o factor de crescimento de transformação alfa (TGF α) entre outros, podem nas próprias células tumorais favorecer a proliferação celular por mecanismos autócrinos ^[107-109].

Os portadores do alelo G, que confere maior expressão de *EGF*, poderão ter maior biodisponibilidade de EGF no microambiente tumoral, apresentando assim um risco aumentado para desenvolver CaP (OR=1.81, $P=0.010$). Vários estudos demonstraram que factores de crescimento apresentam a capacidade de promover a proliferação celular e a transformação neoplásica ^[110]. De acordo com os resultados do presente estudo, variantes genéticas funcionais que influenciam a expressão de *EGF* e a biodisponibilidade da respectiva proteína têm impacto no desenvolvimento do CaP e influenciam o grau do tumor no momento do diagnóstico. O crescimento e diferenciação aberrante podem ser consequência de um ambiente celular inapropriado ^[110]. O polimorfismo *EGF+61G>A* representa uma modificação funcional da expressão de *EGF* desde o nascimento, expondo os seus portadores a diferentes concentrações de EGF, que induzem modificações no microambiente celular da próstata, conduzindo mesmo a padrões de diferenciação alterados, que podem contribuir para o grau de Gleason mais elevado no momento do diagnóstico (OR=2.76, $P=0.002$).

Os portadores do alelo G apresentam também risco aumentado para serem diagnosticados com metástases (OR=2.33, $P=0.038$). Factores de crescimento como o

EGF têm um papel importante na capacidade de migração e invasão das células tumorais. O receptor EGFR pode interagir com a integrina $\alpha 6 \beta 4$ e promover a migração celular devido à activação da via PI3K [111-113]. Outros estudos demonstraram uma associação entre a activação da via EGF/EGFR e a aquisição de um fenótipo invasivo [114-116]. Indivíduos portadores do alelo G, por apresentarem maior expressão de EGF, poderão desencadear a hiper-activação da via EGF/EGFR, induzindo um fenótipo tumoral metastático.

Durante o desenvolvimento tumoral ocorrem várias alterações incluindo a perda da capacidade anti-proliferativa. Esta perda de resposta ao TGF β 1 pode ser consequência da perda de receptores do tipo II (T β RII). Actualmente, outra linha de evidência admite que o EGF possa modular a sinalização pelo TGF β 1, devido à capacidade para estabilizar o mRNA de T β RII [117]. A activação da via EGF/EGFR, ao induzir a expressão da proteína citoplasmática SMAD7, inibe a via de sinalização intracelular mediada pelo TGF β 1.

O TGF β 1 exerce uma grande variedade de acções por mecanismos autócrinos e parácrinos. Este tem sido associado com o desenvolvimento de doença avançada e metástases por indução de proteólise extracelular, angiogénese e supressão imunológica [118].

Nos estadios iniciais do desenvolvimento tumoral sabe-se que o TGF β 1 possui a capacidade de inibir a progressão neoplásica [72]. De facto, já foi observado o papel duplo do TGF β 1 em células tumorais da próstata [119]. De acordo com Tang e colaboradores [120], a supressão de TGF β 1 conduz à activação de propriedades celulares tumorigénicas. Este aparente paradoxo pode ser atribuído à diferente concentração de TGF β 1, promovendo a proliferação celular em ambientes com concentração baixa de TGF β 1 e inibindo a proliferação em concentrações elevadas [121]. O TGF β 1 pode inibir a proliferação celular de células epiteliais, endoteliais e hematopoiéticas e apresenta a capacidade de inibir a progressão do ciclo celular através da indução da expressão dos inibidores de cinases dependentes de ciclina p15, p21, p27 [81]. Cumulativamente, o TGF β 1 regula a expressão de moléculas chave que controlam a progressão do ciclo celular na passagem G1-S, incluindo o gene *c-myc*.

As células do estroma da próstata produzem TGF β 1, podendo através de um mecanismo parácrino induzir a apoptose das células epiteliais da próstata. A activação da sinalização intracelular do TGF β 1/T β RI-RII tem significado prognóstico em indivíduos

com CaP, enquanto a reactivação *in vitro* desta via provoca inibição da proliferação celular [119,122].

Colocou-se a hipótese de que o polimorfismo *TGFB1+869T>C*, que está associado a variações nas concentrações de TGFβ1 em circulação, poderia influenciar a susceptibilidade para o desenvolvimento de CaP. Contudo, não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa para os portadores T, que têm níveis inferiores de TGFβ1, apresentarem risco para CaP (OR=1.06, *P*=0.822). A influência do *TGFB1+869T>C* na susceptibilidade individual para CaP, deverá ser analisada em combinação com variantes de outros genes, nomeadamente o *EGF+61G>A*.

A célula é uma estrutura dinâmica que apresenta capacidade de interacção com outras células e de adaptação a alterações do microambiente. Durante o processo evolutivo, a célula foi sujeita a inúmeras modificações de modo a adaptar-se ao meio envolvente. Em resposta a alterações do meio, a célula transformou-se numa estrutura complexa, favorecendo a transformação de vias de sinalização intracelulares únicas em vias de sinalização intracelulares múltiplas que interactuam entre si.

Deste modo, com base na repercussão funcional ao nível da proliferação celular que os diferentes genótipos dos polimorfismos estudados apresentam, procedeu-se à sua combinação de modo a obter perfis genéticos de proliferação celular. Com base nestas categorias verificamos que os portadores de um perfil genético de média e alta proliferação apresentam risco aumentado para CaP quando comparados com os de baixa proliferação (OR=4.97, *P*=0.019; OR=5.68, *P*=0.010, respectivamente). Os portadores de um perfil genético de baixa, média ou alta proliferação, apresentarão um padrão de proliferação tumoral distinto, devido à exposição aos factores de crescimento EGF e TGFβ1, condicionado pela genética: baixa concentração de EGF/baixa concentração de TGFβ1 (baixa proliferação); elevada concentração de EGF/alta concentração de TGFβ1 (média proliferação) e a elevadas concentrações de EGF e a reduzidas concentrações de TGFβ1 (alta proliferação).

Uma vez que os portadores do perfil genético de alta proliferação, são portadores do alelo G do polimorfismo *EGF+61G>A* e estando o EGF associado à diferenciação celular, sugerimos que o microambiente tumoral estabelecido poderá condicionar um grau de Gleason mais elevado no momento do diagnóstico (OR=1.83, *P*=0.030).

5.3. Associação dos Polimorfismos *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* na Resposta à Terapia de Bloqueio Androgénico

Apesar de inicialmente os indivíduos submetidos a TBA apresentem remissão da doença, uma elevada percentagem de doentes evolui para uma fase de resistência a esta forma de tratamento, desenvolvendo o denominado CaPAI. O CaPAI é uma forma de cancro complexa, com elevado potencial de progressão e metastização^[50], ainda com limitadas opções terapêuticas.

O desenvolvimento de CaPAI é um processo multifásico que envolve múltiplos eventos, ocorrendo diferentes padrões de expressão molecular durante todo o processo, que envolvem alterações em diversas vias de sinalização intracelulares^[123].

Os tumores AI adquirem a capacidade de proliferarem independentemente de estarem privados de androgénios. A progressão destes tumores poderá ser estimulada pela acção autócrina e parácrina de factores de crescimento, responsáveis pela activação de cascatas de sinalização que promovem a proliferação, sobrevivência e migração celular. Ligandos como o EGF e TGFβ1 representam potenciais vias implicadas no processo de desenvolvimento de AI^[60,61].

Estudos *in vitro* mostraram que a inibição da via de sinalização EGF/EGFR reduz a proliferação celular de células AI (DU145 e PC-3) por interferência no ciclo celular na passagem da fase G1 para a fase S. Recentemente, estudos com base em assinaturas de expressão de genes em tumores prostáticos mostraram uma fraca activação da via de sinalização mediada pelos androgénios em tumores prostáticos de elevado grau e metastáticos^[124], mostrando que durante a progressão, a célula pode redireccionar o seu programa de proliferação celular, activando outras vias de sinalização intracelulares.

Vários estudos suportam a ocorrência de uma interacção entre o receptor EGFR e o AR em células de CaP, apesar de o papel do AR na AI permaneça controverso. Recentemente, Bonaccorsi e colaboradores demonstraram que a expressão do AR afecta a endocitose do EGFR mediada pela clatrina, sugerindo que as células tumorais prostáticas que expressam o AR apresentam um fenótipo menos agressivo, devido à interferência com a via de sinalização intracelular pró-invasiva EGF/EGFR^[125]. Estudos em linhas celulares indicam que a privação androgénica pode favorecer a progressão de CaPAI devido à sobre-activação da via de sinalização EGF/EGFR^[126].

Neste contexto, os resultados mostram uma progressão precoce da doença para AI nos portadores do alelo G do polimorfismo *EGF+61G>A* (15.2 vs 87.4 meses,

respectivamente, $P=0.018$) e nos portadores do perfil genético de alta proliferação (15.2 vs 68.1 meses, respectivamente).

Indivíduos submetidos a TBA, vão apresentar uma fraca activação da via de sinalização intracelular mediada pelo AR, devido à baixa concentração de androgénios existente no meio intracelular. Nestas situações, vias de sinalização alternativas como a via EGF/EGFR, vão ser activadas conduzindo à aquisição de um fenótipo mais agressivo. Indivíduos portadores do alelo G do polimorfismo $EGF+61G>A$ e indivíduos portadores de um perfil genético de alta proliferação, têm expressão de *EGF* aumentada, o que se traduzirá numa activação da via de sinalização EGF/EGFR, e consequentemente, progressão precoce para AI. Nos portadores deste perfil, devido à intensa activação da via EGF/EGFR poderá também ocorrer activação cruzada da via de sinalização mediada pelo AR.

Trabalhos desenvolvidos por Isaacs e Cooffey ^[127], sugeriram que a mudança de um fenótipo de androgénio-dependência (AD) para um fenótipo de AI, poderá ser devida a células estaminais insensíveis a androgénios, que emergem após a terapia TBA sob estímulo de crescimento apropriado. O microambiente adjacente às células tumorais da próstata, estabelecido após TBA pode condicionar todo o comportamento das células da próstata. As células estaminais encontram-se geralmente quiescentes e residem em nichos rodeadas por um microambiente responsável pelo seu equilíbrio. O EGF e o $TGF\beta 1$ são moduladores da proliferação celular de células estaminais, regulando também a sua homesotasia ^[128]. A TBA poderá assim criar uma oportunidade para que estas células indeferenciadas proliferem sob influência do microambiente que as rodeia. Indivíduos portadores de genótipos que conferem maior disponibilidade de EGF e maior proliferação celular, estarão expostos a um estímulo proliferativo mais intenso que conduz à emergência de um fenótipo de AI.

Os portadores de um perfil genético de alta proliferação apresentam potencialmente maior activação da via EGF/EGFR. A activação da via de sinalização intracelular EGF/EGFR tem a capacidade de induzir a expressão da proteína intracelular SMAD7. A SMAD7 por interacção com um complexo formado pelas proteínas SMAD2/3 pode inibir a activação da cascata de sinalização mediada pelo ligando $TGF\beta 1$. Estes portadores estarão assim expostos durante toda a vida, a um estímulo intenso para a proliferação celular, apresentando em simultâneo uma diminuída activação da cascata de sinalização anti-proliferativa mediada pelo $TGF\beta 1$. Em situações de TBA, em que poderá ocorrer uma activação preferencial de cascatas alternativas que medeiam a

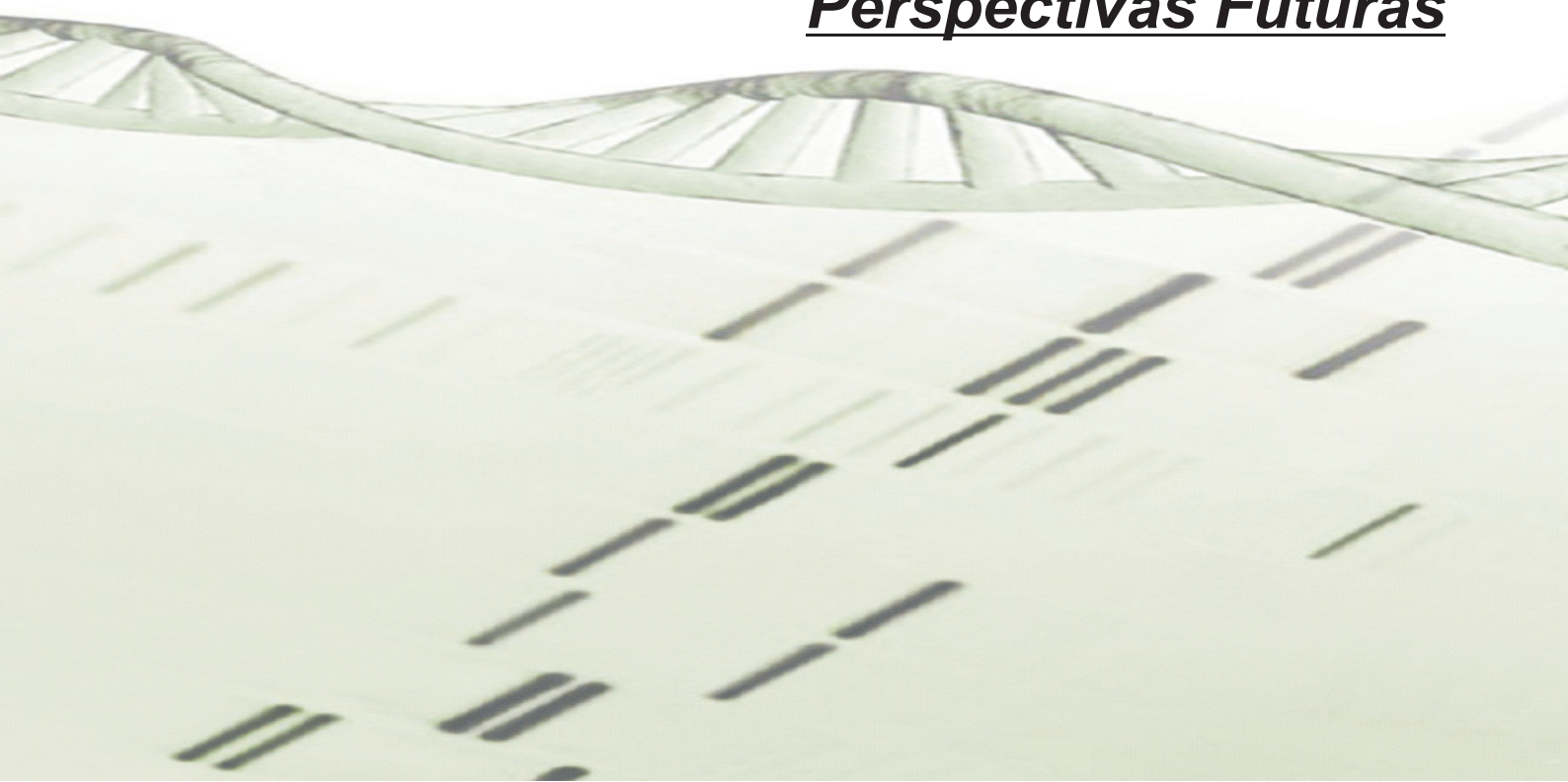
proliferação celular, estes indivíduos vão desenvolver mais rapidamente um fenótipo agressivo da doença, apresentando também progressão da doença para AI mais precocemente.

O presente trabalho suporta a influência do EGF e do efeito combinado do EGF/TGF β 1 na susceptibilidade para CaP, bem como no desenvolvimento de CaPAI. O bloqueio simultâneo da via de sinalização intracelular mediada pelo AR e da via EGF/EGFR poderá ser uma estratégia de futuro mais apropriada para o tratamento de CaP, eventualmente com impacto no tempo para desenvolvimento de AI e no prognóstico.

Estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciam a ocorrência da supressão do crescimento celular em células AI após administração de inibidores do domínio de cinase de resíduos de tirosina ou anticorpos monoclonais anti-EGFR, combinados com outros agentes de quimioterapia ^[129-132]. Contudo, ensaios clínicos em que se utilizava inibidores do domínio de cinase de resíduos de tirosina do EGFR em doentes com doença AI e metastática, não demonstraram aumento da resposta clínica ^[133,134].

De futuro será necessária a realização de mais estudos em amostras maiores, variando diferentes regimes terapêuticos que incluam a utilização de inibidores do domínio de cinase de resíduos de tirosina do receptor EGFR e anticorpos monoclonais anti-EGFR, de modo a avaliar a relevância da via de sinalização EGF/EGFR no desenvolvimento de CaPAI.

6. Conclusões e Perspectivas Futuras



6. Conclusões e Perspectivas Futuras

Os factores de crescimento EGF e TGF β 1 desempenham uma importante função no controlo da proliferação celular. A interacção estabelecida entre eles contribui para a homeostasia em diferentes tecidos, podendo as vias de sinalização mediadas por estes ligandos estar desreguladas em situações de transformação neoplásica.

A activação de cascatas de sinalização alternativas que controlam a proliferação celular, como é exemplo a via EGF/EGFR e a via TGF β 1/T β RI-T β RII, parecem estar envolvidas na recidiva de doentes com CaP submetidos à TBA.

A análise de polimorfismos funcionais poderá contribuir para a caracterização da susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro. Variantes genéticas funcionais nos genes *EGF* e *TGFB1* poderão influenciar o processo de AI e o desenvolvimento tumoral. A definição de grupos de indivíduos mais susceptíveis para o desenvolvimento de CaP e com maior predisposição para não responder ao tratamento hormonal, possibilitará a definição de estratégias de quimio-prevenção mais eficientes e prever a resposta ao tratamento, contribuindo para a orientação terapêutica.

Os polimorfismos *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C*, surgem na literatura associados a diferente biodisponibilidade das respectivas proteínas, bem como a risco e prognóstico alterados em outros modelos oncológicos. De acordo com os resultados obtidos, o polimorfismo funcional *EGF+61G>A* bem como o seu efeito combinado com o polimorfismo *TGFB1+869T>C* influenciam a susceptibilidade genética para o desenvolvimento CaP, influenciando também o ILD, conferindo aos portadores dos genótipos de risco, efectivamente um risco acrescido para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia e um ILD mais reduzido. Estes resultados suportam a influência dos factores de crescimento EGF e TGF β 1 na oncobiologia do CaP, sugerindo a sua interveniência no mecanismo de proliferação celular tumoral alternativo no desenvolvimento de resistência à TBA.

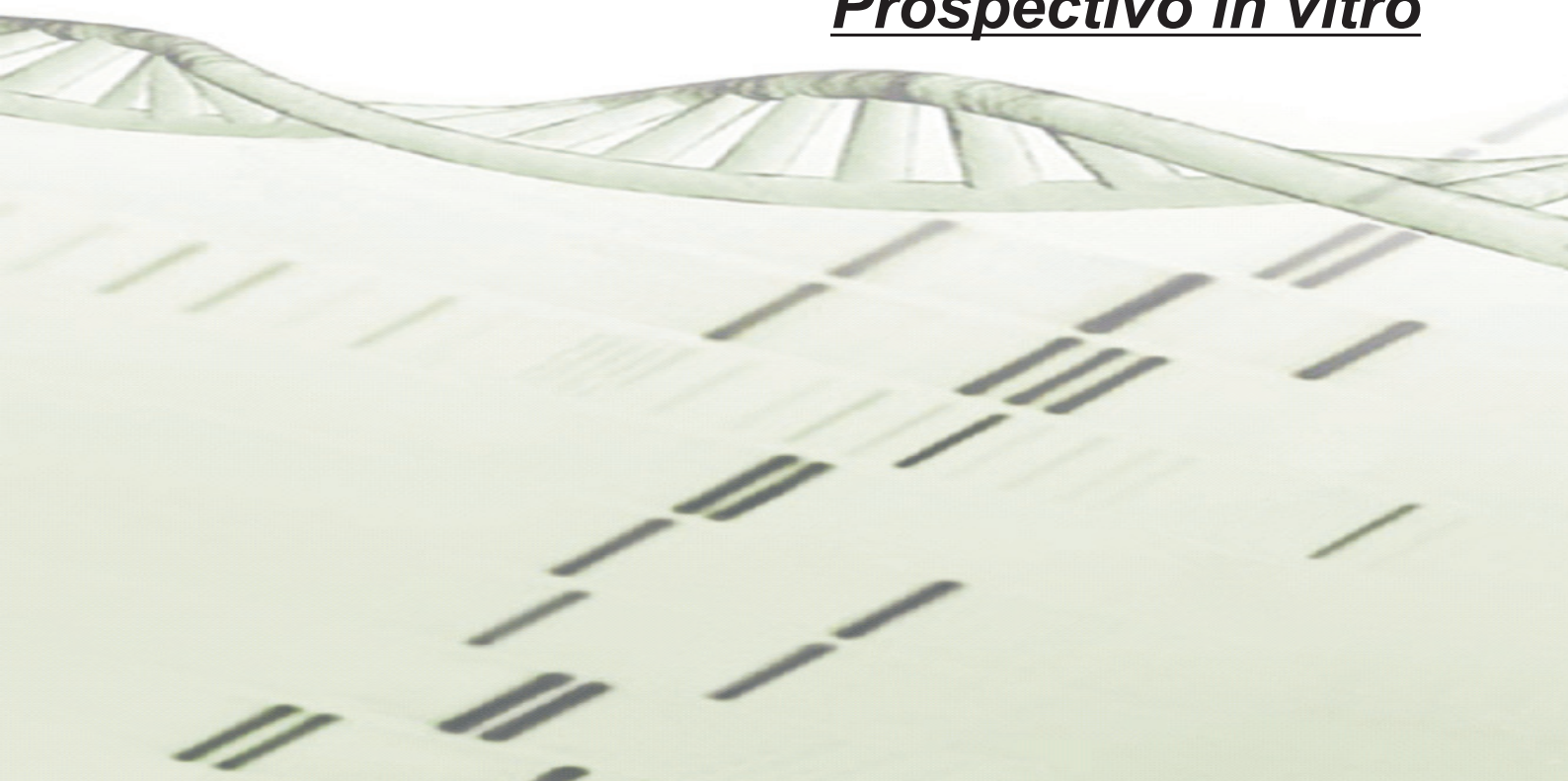
Estudos futuros, deveriam replicar o estudo numa amostragem superior de casos e controlos e realizar estudos funcionais *in vitro*, com o objectivo de avaliar a consequência funcional dos polimorfismos funcionais *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* na expressão genética e produção proteica em linhas celulares de CaP androgénio dependentes e em linhas celulares de CaP androgénio-independentes. Uma vez que as vias de sinalização intracelulares EGF/EGFR e TGF β 1/T β RI-T β RII são alvo de terapias dirigidas, isto é, actualmente existem alguns compostos dirigidos a componentes específicos de ambas as vias de sinalização que visam o bloqueio das mesmas, realizar ensaios *in vitro* com recurso a linhas celulares de CaP e avaliar os diferentes efeitos que

6. Conclusões e Perspectivas Futuras

a adição de compostos terapêuticos provoca em células transfectadas com plasmídeos, construídos de acordo com as variantes genéticas funcionais analisadas.

A correcta caracterização da função das vias de sinalização intracelulares EGF/EGFR e TGF β 1/T β RI-T β RII, permitirá instituir novos protocolos terapêuticos, agora dirigidos (p.e. anticorpos monoclonais anti-EGFR1, inibidores do domínio de cinases de resíduos de tirosina), e/ou combinações terapêuticas mais eficazes como alternativa ao tratamento hormonal ou nos doentes que desenvolvem AI.

7. Estudio
Prospectivo in vitro



7. Estudo Prospectivo *in vitro*

No seguimento do estudo efectuado e de acordo com os trabalhos futuros sugeridos no capítulo de Conclusões e Perspectivas Futuras, iniciamos a realização de estudos funcionais *in vitro*, para avaliar a consequência funcional do polimorfismo *EGF+61G>A* na expressão do gene *EGF* em células tumorais AI.

O *EGF* e o *TGFβ1* são ligandos de potenciais vias implicadas no processo de desenvolvimento de AI ^[60,61]. Deste modo, variantes genéticas funcionais *EGF+61G>A* e *TGFβ1+869T>C*, ao modularem a biodisponibilidade dos respectivos factores de crescimento, poderão conduzir a diferentes comportamentos do tumor de acordo com o perfil genético individual. Assim, e considerando o papel destas moléculas no CaP, é necessário caracterizar do ponto de vista funcional *in vitro* o perfil de expressão genética e produção proteica de acordo com os diferentes génotipos.

O estudo da repercussão funcional destes polimorfismos reveste-se de particular interesse, permitindo-nos de futuro uma melhor caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na aquisição de AI e de que modo o perfil genético por influenciar o microambiente tumoral contribuirá para AI.

O polimorfismo funcional *EGF+61G>A* foi já associado a diferentes níveis de expressão de *EGF* em monócitos, em células de gliomas e células de cancro da mama ^[84,85,86], permanecendo por esclarecer o mecanismo envolvido. Foi sugerido que o polimorfismo afecta a expressão de *EGF* por causar um processamento e degradação de mRNA de *EGF* diferencial ou por criar um local adicional de ligação para factores de transcrição ^[85].

Dada a importância que a via *EGF/EGFR* assume na progressão do CaP, especificamente como via proliferativa alternativa na AI, torna-se necessário avaliar a repercussão que a variante genética funcional *EGF+61G>A* tem em células tumorais AI. Assim, para avaliar a influência do polimorfismo funcional *EGF+61G>A* na expressão do gene *EGF* em células tumorais AI, seleccionou-se a linha celular PC-3 originária da colecção de células da “European Collection of Cell Cultures” (ECCAC). A linha celular PC-3 foi estabelecida a partir de um adenocarcinoma da próstata de grau 4, de um indivíduo de 62 anos de idade Caucasiano. Estas células exibem baixa actividade da enzima 5α-redutase.

Após o descongelamento da linha celular PC-3, esta foi cultivada em meio de cultura “F-12 Kaighn’s” (Invitrogen) suplementado com 7% de soro bovino fetal (Invitrogen), 45mg/L de ácido ascórbico (SIGMA) e 10% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) (Invitrogen) (Anexo II).

7. Estudo Prospectivo in vitro

Ao fim das primeiras subculturas verifica-se que estas atingem a confluência ao fim de 3-4 dias de crescimento (Anexo II). No fim deste período, após quantificação, as células podem ser divididas e colocadas a crescer como sub-culturas com pelo menos 1×10^6 células/mL

De modo a assegurar a obtenção de resultados de expressão correctos, foi realizado, aquando da segunda subcultura, um teste para detectar a presença de contaminação por *Mycoplasma*, o qual apresentou resultado negativo. Em simultâneo com a realização de subculturas foi realizado um “master-stock” de células PC-3 a partir das células em cultura das primeiras passagens celulares (Anexo II).

A linha celular PC-3 foi caracterizada genotípicamente quanto aos polimorfismos *EGF+61G>A* e *TGFB1+869T>C* (Quadro VIII) pelo método de discriminação alélica “TaqMan” , de acordo com o procedimento previamente descrito.

Quadro VIII. Caracterização genotípica das células de cancro da próstata PC-3.

	<i>EGF+61G>A</i>	<i>TGFB1+869T>C</i>
Linha Celular		
PC-3	GG	CC

Para avaliar o efeito da variante funcional *EGF+61G>A* na expressão de EGF em células de cancro da próstata androgénio-independentes (CaPAI), estão a ser construídos dois tipos de plasmídeos “reporter”. Num dos plasmídeos o gene da luciferase encontra-se controlado por um promotor do gene *EGF* que contém a variante nucleotídica G e outro plasmídeo que apresenta a variante A no locus +61 na região promotora.

Para estudar o efeito na actividade do promotor do polimorfismos *EGF+61G>A*, proceder-se-á à amplificação de uma região de interesse que contem o local da variante genética a partir de amostras de indivíduos homocigóticos G e A, respectivamente.

7. Estudo Prospectivo *in vitro*

Posteriormente, com a utilização de enzimas de restrição específicas, que reconhecem sequências que flanqueiam a região amplificada que contem o locus onde ocorre o polimorfismo, serão sub-clonados os fragmentos amplificados num vector (pCR2.1 vector-Invitrogen). Os “inserts” de interesse clonados deverão ser sequenciados, de modo a garantir que não têm nenhuma variação nucleotídica excepto a variação G>A no locus +61 do gene *EGF*.

Após digestão do vector construído pelas mesmas enzimas de restrição utilizadas, os fragmentos obtidos serão novamente sub-clonados num outro vector que contem o gene da Luciferase (pGL3-Basic vector- Promega). Após verificação de todas as moléculas recombinantes construídas por sequenciação automática, proceder-se-á à transfecção das células PC-3 com a utilização de lipofectamina 2000 (Invitrogen). Após transfecção a actividade da luciferase será avaliada num luminómetro.



8. Referências
Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

- [1] Jemal A, Siegel R, War E, *et al.* (2008) Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 58 (2): 71–96.
- [2] Ferlay J, Autier P, Boniol M, *et al.* (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann. Oncol.* 18 (3): 581–592.
- [3] Parkin D, Bray F; Ferlay J, Pisani P (2005) Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55(2): 74–108.
- [4] Bruce A, Ponder J (2001) Cancer Genetics. *Nature.* 411: 336-341.
- [5] DeVita HS Jr, Rosenberg SA (2005) Cancer Principles & Practice of Oncology, 7th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- [6] Kumar V, Cotran RS, Robbins SJ (2003) Robbins Basic Pathology, 7th Ed. Saunders, Philadelphia, USA.
- [7] Greaves M (2002) Cancer causation: the Darwinian downside of past success? *Lancet Oncol.* 3 (4): 244-251.
- [8] Brennan P (2002) Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? *Carcinogenesis.* 23 (3): 381-387.
- [9] Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell.* 100 (1) : 57-70.
- [10] Chakravarti A (2001) To a future of genetic medicine. *Nature.* 409 (6822): 822-823.
- [11] Knudsen L, Loft S, Autrup H (2001) Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mut Res.* 482 (1-2): 83-88.
- [12] Erichsen HC, Chanock SJ (2004) SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer.* 90 (4): 747-751.
- [13] Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene.* 234 (2): 177-186.

8. Referências Bibliográficas

- [14] Stover DG, Bierie B, Moses HL (2007) A Delicate balance: TGF- β and the tumor microenvironment. *J Cell Biochem.* 101 (4): 851–861.
- [15] Hsing AW, Chokkalingam AP (2006) Prostate Cancer Epidemiology. *Front Biosci.* 11: 1188-1413.
- [16] Pinheiro PS, Tyczyński JE, Bray F, *et al.* (2003) Cancer incidence and mortality in Portugal. *Eur J Cancer.* 39 (17): 2507–2520.
- [17] RORENO (2007) Registo oncológico regional do norte 2003. Instituto Português de Oncologia do Porto, Porto.
- [18] Henrik Grönberg (2003) Prostate cancer epidemiology. *Lancet.* 361 (8): 859-864.
- [19] Hsing AW, Tsao L, Devesa SS (2000) International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int. J. Cancer.* 85(1): 60–67.
- [20] Whitmore WF Jr (1994) Localised prostatic cancer: management and detection issues. *Lancet.* 343 (8908): 1263-1267.
- [21] Muir CS, Nectoux J, Staszewski J (1991) The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol.* 30 (2): 133-140.
- [22] Long R, Morrissey C, Fitzpatrick J (2005) Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin Sci.* 108 (1): 1-11.
- [23] Lee F, Siders DB, Torp-Pederson ST, *et al.* (1990) Prostate Cancer: transrectal ultrasound and pathology comparison a preliminary study of outer gland (peripheral and central zones) and inner gland (transition zone) cancer. *Prostate Cancer.* 67 (4): 1132-1142.
- [24] De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, *et al.* (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 7 (4): 256-269.

8. Referências Bibliográficas

- [25] Hsing AW, Devesa SS (2001) Trends and patterns of prostate cancer: what to they suggest? *Epidemiol Rev.* 23 (1): 3-13.
- [26] Noe M, Schroy P, Demierre MF, Babayan R, Geller AC (2008) Increased cancer risk for individuals with a family history of prostate cancer, colorectal cancer, and melanoma and their associated screening recommendations and practices. *Cancer Causes Control.* 19 (1): 1-12.
- [27] Allen NE, Appleby PN, Travis RC, *et al.* (2008) Animal foods, protein, calcium and prostate cancer risk: the european prospective investigation into cancer and nutrition. *Br J cancer.* 98 (9):1574-1581.
- [28] Gonzalez CA (2006) Nutrition and cancer: the current epidemiological evidence. *Br J Nutr.* 96 suppl1: S42-S45.
- [29] Schmid HP, Engeler DS, Pummer K, Schmitz-Dräger BJ (2007) Prevention of prostate cancer: more questions than data. *Recent Results Cancer Res.* 174: 101-107.
- [30] Cook LS, Goldoft M, Schwartz SM, Weiss NS (1999) Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendents. *J Urol.* 161 (1): 152-155.
- [31] McCracken M, Olsen M, Chen MS Jr, *et al.* (2007) Cancer incidence, mortality and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Vietnamese, Korean and Japanese ethnicities. *CA Cancer J Clin.* 57 (4):190-205.
- [32] Lee J, Demissie K, Lu SE, Rhoads GG (2007) Cancer incidence among Korean-American immigrants in the United States and native Koreans in South Korea. *Cancer Control.* 14 (1): 78-85.
- [33] Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN, *et al.* (1995) Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am J Epidemiol.* 141 (8): 732-740.

8. Referências Bibliográficas

[34] Hayes RB, Liff JM, Pottern LM, *et al.* (1995) Prostate cancer risk in US blacks and whites with a family history of cancer. *Int J Cancer*. 60 (3): 361–364.

[35] Chen YC, Page JH, Chen R, Giovannucci E (2008) Family history of prostate and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era. *Prostate*. 68 (14): 1582-1591.

[36] Caplan A, Kratz A (2002) Prostate-specific antigen and the early diagnosis of prostate cancer. *Am J Clin Pathol*. 117: S104-S108.

[37] Steuber T, Helo P, Lilja H (2007) Circulating biomarkers for prostate cancer. *World J Urol*. 25 (2): 111-119.

[38] Etzioni R, Penson DF, Ledger JM, *et al.* (2002) Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst*. 94 (13): 981-990.

[39] Lopes C, Campos C, Brito MJ (2000) "Cancro da Próstata" Problemas do diagnóstico em biópsias e em peças de prostatectomia: Resultados, certezas e dúvidas. In: Carcinoma da Próstata - Perspectiva Actual, Calais-da-Silva F (Ed.), Lisboa.

[40] Gleason DF (1992) Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*. 23 (3): 373-379.

[41] Humphrey PA (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 17 (3): 292-306.

[42] Heidenreich, A, Aus G, Abbou CC, *et al.* (2007) Guidelines on prostate cancer. European Association of Urology .

[43] Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH (2002) TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*. 94 (9): 2511-2516.

8. Referências Bibliográficas

- [44] Pronzato P, Rondini M (2005) Hormonotherapy of advanced prostate cancer. *Ann Oncol.* 16 suppl 4: iv80-iv84.
- [45] Gabrespine A, Guy L, Chollet P, Debiton E, Bay J-O (2004) Mécanismes moléculaires impliqués dans l'hormonorésistance du cancer de la prostate. *Bull Cancer.* 91 (10):747-757.
- [46] Loblaw DA, Mendelson DS, Talcott JA, *et al.* (2004) American Society of Clinical Oncology recommendations for the initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer. *J Clin Oncol.* 22 (14): 2927-2941.
- [47] Angelucci A, Schenone S, Gravina G, *et al.* (2006) Pyrazolo [3,4-d] pyrimidines c-Src inhibitors reduce epidermal growth factor-induced migration in prostate cancer cells. *Eur J Cancer.* 42 (16): 2838-2845.
- [48] Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, *et al.* (2003) Steroid hormone genotypes ARStul and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 141 (2): 91–96.
- [49] Tilbrook AJ, Clarke IJ (2001) Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol Reprod.* 64 (3): 735-742.
- [50] Feldman BJ, Feldman D (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 1 (1): 34-45.
- [51] Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A (2005) Mechanisms of endocrine therapy-responsive and –unresponsive prostate tumours. *Endocr Relat Cancer.* 12 (2): 229-244.
- [52] Labrie F, Bélanger A, Luu-The V, *et al.* (2005) Gonadotropin-releasing hormone agonists in the treatment of prostate cancer. *Endocr Rev.* 26 (3): 361-379.
- [53] Pienta KJ, Bradley D (2007) Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 12 (6): 1665-1671.

8. Referências Bibliográficas

[54] Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, *et al.* (1997) Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* 57 (2): 314-319.

[55] Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, *et al.* (1995) In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet.* 9 (4): 401-406.

[56] Gregory CW, Johnson RT Jr, Mohler JL, French FS, Wilson EM (2001) Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res.* 61 (7): 2892-2898.

[57] Amit I, Wides R, Yarden Y (2007) Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. *Mol Syst Biol.* 3: 151.

[58] Culig Z, Hobissch A, Cronauer MV, *et al.* (1994) Androgen receptor activation in prostatic tumor cells lines by insulin-like growth factor, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res.* 54 (20): 5474-5478.

[59] Ye D, Mendelsohn J, Fan Z (1999) Androgen and epidermal growth factor down-regulate cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 and costimulate proliferation of MDA PCa 2a and MDA PCa 2b prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* 5 (8):2171-2177.

[60] El Sheikh, Domin J, Abel P, Stamp G, Lalani el-N (2003) Androgen-independent prostate cancer: potencial role of androgen and ErbB receptor signal transduction crosstalk. *Neoplasia.* 5 (2): 99-109.

[61] Jakowlew S (2006) Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 25 (3): 435-457.

[62] Lee EC, Tenniswood MP (2004) Emergence of metastatic hormone-refractory disease in prostate cancer after anti-androgen therapy. *J Cell Biochem.* 91 (4): 662-670.

8. Referências Bibliográficas

- [63] Fisher DA, Lakshmanan J (1990) Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals. *Endocr Rev.* 11 (3): 418–442.
- [64] Groenen LC, Nice EC, Burgess AW (1994) Structure-function relationships for the EGF/TGF-family of mitogens. *Growth Factors.* 11(4): 235–257.
- [65] Goodsell D (2003) The molecular perspective: epidermal growth factor. *Oncologist.* 8 (5): 496-497.
- [66] Hsieh M, Conti M (2005) G-protein-coupled receptor signalling and the EGF network in endocrine systems. *Trends Endocrinol Metab.* 16 (7):320-326.
- [67] Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2 (2): 127-137.
- [68] Sridhar S, Seymor L, Shepherd F (2003) Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 4 (7): 397-406.
- [69] Hansen L, Woodson II R, Holbus S, *et al.* (2000) The epidermal growth factor receptor is required to maintain the proliferative population in the basal compartment of epidermal tumors. *Cancer Res.* 60 (13): 3328-3332.
- [70] Normanno N, de Luca A, Bianco C, *et al.* (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 366 (1): 2-16.
- [71] Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS (2003) Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer.* 10 (1): 1-21.
- [72] kaklamani V, Pasche B (2004) Role of TGF- β in cancer and the potencial for therapy and prevention. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 4 (4): 649-661.

8. Referências Bibliográficas

[73] Derynck R, Akhurst R, Balmain A (2001) TGF- β signalling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 29 (2): 117-129.

[74] Hu X, Zhang X, Zhong Q, *et al.* (2001) Differential effects of transforming growth factor on cell cycle regulatory molecules in human myeloid leukaemia cells. *Oncogene.* 20 (47): 6840-6850.

[75] Denicourt C, Doedy S (2003) Another twist in the transforming growth factor- β -induced cell-cycle arrest chronicle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (26): 15290-15291.

[76] Reiss M, Barcellos-Hoft MH (1997) Transforming growth factor-b in breast cancer: a working hypothesis. *Breast Cancer Res Treat.* 45 (1): 81– 95.

[77] Kretschmar M (2000) Transforming growth factor-b and breast cancer. Transforming growth factor-b/SMAD signaling effects and cancer. *Breast Cancer Res.* 2 (2): 107 –115.

[78] Kang Y (2006) Pro-metastasis function of TGF- β 1 mediated by the smad pathway. *J Cell Biochem.* 98 (6): 1380-1390.

[79] Pardali K, Moustakas A (2007) Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1775 (1): 21-62.

[80] Lücke CD, Philpott A, Metcalfe JC, *et al.* (2001) Inhibiting mutations in the transforming growth factor β type 2 receptor in recurrent human breast cancer. *Cancer Res.* 61 (2): 482-485.

[81] Elliott R, Blobel G (2005) Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J Clin Oncol.* 23 (9): 2078-2093.

[82] Wikstrom P, Stattin P, Franck-Lissbrant I, Damber JE, Bergh A (1998) Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate.* 37 (1): 19-29.

8. Referências Bibliográficas

- [83] Saunier EF, Akhurst RJ (2006) TGF beta inhibition for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 6 (7): 565-578.
- [84] Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, *et al.* (2002) Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet*. 359 (9304): 397-401.
- [85] Bhowmick D, Zhuang Z, Wait S, Weil R (2004) A functional polymorphism in the EGF gene is found with increased frequency in glioblastoma multiforme patients and is associated with more aggressive disease. *Cancer Res*. 64 (4):1220-1223.
- [86] Costa B, Ferreira P, Costa P, *et al.* (2007) Association between functional EGF+61 polymorphism and glioma risk. *Clin Cancer Res*. 13 (9): 2621-25.
- [87] Hamai Y, Matsumura S, Matsusaki K, *et al.* (2005) A single nucleotide polymorphism in the 5'untranslated region of the EGF gene is associated with occurrence malignant progression of gastric cancer. *Pathobiology*. 72 (3): 133-138.
- [88] Dunning AM, Ellis PD, McBride S, *et al.* (2003) A transforming growth factor beta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res*. 63 (10): 2610–2615.
- [89] Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, *et al.* (1999) Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet*. 8 (1): 93–97.
- [90] Yokota M, Ichihara S, Lin TL, Yamada Y (2000) Association of a T29C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation*. 101 (24): 2783–2787.
- [91] Wang Y, Tian T, Hu Z, *et al.* (2008) EGF promoter SNPs, plasma EGF levels and risk of breast cancer in Chinese women. *Breast Cancer Res Treat*. 111 (2): 321-327.
- [92] McCarron SL, Bateman AC, Theaker JM, Howell M (2003) EGF+61 gene polymorphism and susceptibility to and prognostic markers in cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer*. 107 (4): 673-675.

8. Referências Bibliográficas

[93] Randerson-Moor JA, Gaut R, Turner F, *et al.* (2004) The relationship between the epidermal growth factor (EGF) 5'UTR variant A61G and melanoma/nevus susceptibility. *J Invest Dermatol.* 123 (4): 755-759.

[94] James MR, Hayward NK, Dumenil T, *et al.* (2004) Epidermal growth factor gene (EGF) polymorphism and the risk of melanocytic neoplasias. *J Invest Dermatol.* 123 (4): 760-762.

[95] Tanabe KK, Lemoine A, Finkelstein DM, *et al.* (2008) Epidermal growth factor gene functional polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *JAMA.* 299 (1): 53-60.

[96] Shin A, Shu X-O, Cai Q, Gao Y-T, Zheng W (2005) Genetic polymorphisms of the transforming growth factor- β 1 gene and breast cancer risk: a possible dual role at different cancer stages. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14 (6): 1567-1570.

[97] Kang HG, Chae MH, Park JM, Kim EJ (2006) Polymorphisms in TGF- β 1 gene and the risk of lung cancer. *Lung Cancer.* 52 (1): 1-7.

[98] Wei YS, Zhu YH, Du B, *et al.* (2007) Association of transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Clin Chim Acta.* 380 (1-2): 165-169.

[99] Le Marchand L, Haiman CA, van der Berg D, *et al.* (2004) T29C polymorphism in the transforming growth factor β 1 gene and postmenopausal breast cancer risk: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13 (3): 412-415.

[100] Kaklamani V, Baddi L, Liu J, *et al.* (2005) Combined genetic assessment of transforming growth factor- β signaling pathway variants may predict breast cancer risk. *Cancer Res.* 65 (8): 3454-3461.

[101] Kang D, Lee K-M, Park SK, *et al.* (2007) Lack of association of transforming growth factor- β 1 polymorphisms and haplotypes with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian trial. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev.* 16 (6): 1303-1305.

8. Referências Bibliográficas

[102] Kalbe C, Mau M, Rehfeld C (2008) Developmental changes and the impact of isoflavones on mRNA expression of IGF-I receptor, EGF receptor and related growth factors in porcine skeletal muscle cell cultures. *Growth Horm IGFR Res.* 18 (5):424-433.

[103] Gong L, Li Y, Nedeljkovic-Kurepa A, Sarkar AH (2003) Inactivation of NF- κ B by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene.* 22 (30):4702-4709.

[104] El Sheikh SS, Domin J, Abel P, Stamp G, Lalani el-N (2004) Phosphorylation of both EGFR and ErbB2 is a reliable predictor of prostate cancer cell proliferation in response to EGF. *Neoplasia.* 6 (6): 846-853.

[105] Vicentini C, Festuccia C, Gravina GL, *et al.* (2003) Prostate cancer cell proliferation is strongly reduced by epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in vitro on human cell lines primary cultures. *J Cancer Res Clin Oncol.* 129 (3): 165-175.

[106] Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento F, *et al.* (2002) Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 8 (11): 3438-3444.

[107] Sato B (1999) Can an autocrine loop explain sex-hormone-dependent tumour growth? A brief overview. *Oncology.* 57 suppl 2: 3-6.

[108] Normanno N, Kim N, Wen D, *et al.* (1995) Expression of messenger RNA for amphiregulin, heregulin, and cripto-1, three new members of the epidermal growth factor family, in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.* 35 (3): 293-297.

[109] De Miguel P, Royuela M, Bethencourt R, *et al.* (1999) Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates. *Cytokine.* 11 (9): 722-727.

[110] Aaronson SA (1991). Growth factors and cancer. *Science.* 254 (5035): 1146-1153.

8. Referências Bibliográficas

[111] Mercurio AM, Rabinovitz I, Shaw LM (2001) The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 13 (5): 541–545.

[112] Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Toker A, Mercurio AM (1997) Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell.* 91 (7): 949–960.

[113] Tampellini M, Longo M, Cappia S, *et al.* (2007) Co-expression of EGF receptor, TGF α and S6 kinase is significantly associated with colorectal carcinomas with distant metastases at diagnosis. *Virchows Arch.* 450 (3): 321–328.

[114] Zolfaghari A, Djakiew D (1996) Inhibition of chemomigration of a human prostatic carcinoma cell (TSU-pr1) line by inhibition of epidermal growth factor receptor function. *Prostate.* 28 (4); 232–238.

[115] Kondapaka SB, Fridman R, Reddy KB (1997) Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 70 (6): 722–726.

[116] Angelucci A , Gravina GL, Rucci N, *et al.* (2006) Suppression of EGF-R signaling reduces the incidence of prostate cancer metastasis in nude mice. *Endocr Relat Cancer.* 13 (1): 197–210.

[117] Song K, Krebs TL, Danielpour D (2006) Novel permissive role of epidermal growth factor in transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling and growth suppression. Mediation by stabilization of TGF-beta receptor type II. *J Biol Chem.* 281 (12):7765-7774.

[118] Stearns ME, Garcia FU, Fudge K, Wang M (1999) Role of interleukin 10 and transforming growth factor β 1 in the angiogenesis and metastasis of human prostate primary tumor lines from orthotopic implants in severe combined immunodeficiency mice. *Clin Cancer Res.* 5 (3): 711-720.

[119] Bierie B, Moses H (2006) Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer.* 6 (7): 506-520.

8. Referências Bibliográficas

- [120] Tang B, de Castro K, Barnes HE, *et al.* (1999) Loss of responsiveness of to transforming growth factor beta induces malignant transformation of nontumorigenic rat prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 59 (19): 4834-4842.
- [121] Zhou W, Park I, Pins M, *et al.* (2003) Dual regulation of proliferation and growth arrest in prostatic stromal cells by transforming growth factor- β 1. *Endocrinology.* 144 (10): 4280 – 4284.
- [122] Guo Y, Kyprianou N (1999) Restoration of transforming growth factor beta signalling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 59 (6): 1366-1371.
- [123] De La Taille A, Vacherot F, Salomon L, *et al.* (2001) Hormone-refractory prostate cancer: a multi-step and multi-event process. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 4 (4): 204-212.
- [124] Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, *et al.* (2007) Integrative molecular concept modelling of prostate cancer progression. *Nat Genet.* 39 (1): 41-51.
- [125] Bonaccorsi L, Nosi D, Muratori M, *et al.* (2007) Altered endocytosis of epidermal growth factor receptor in androgen receptor positive prostate cancer cell lines. *J Mol Endocrinol.* 38 (1-2): 51-66.
- [126] Festuccia G, Gravina GL, Angelucci A, *et al.* (2005) Additive antitumor effects of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, gefitinib (Iressa), and the nonsteroidal antiandrogen, bicalutamide (Casodex), in prostate cancer cells in vitro. *Int J Cancer.* 115 (4): 630-640.
- [127] Isaacs JT, Coffey DS (1989) Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl.* 2: 33–50.
- [128] Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA (2000) Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood.* 96 (6): 2022–2036.

8. Referências Bibliográficas

[129] Belochitski O, Ariad S, Shany S, Fridman V, Gavrilov V (2007) Efficient dual treatment of the hormone-refractory prostate cancer cell line DU145 with cetuximab and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *In Vivo*. 21(2): 371-376.

[130] Mimeault M, Johansson SL, Vankatraman G, *et al.* (2007) Combined targeting of epidermal growth factor receptor and hedgehog signaling by gefitinib and cyclopamine cooperatively improves the cytotoxic effects of docetaxel on metastatic prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 6 (3): 967-978.

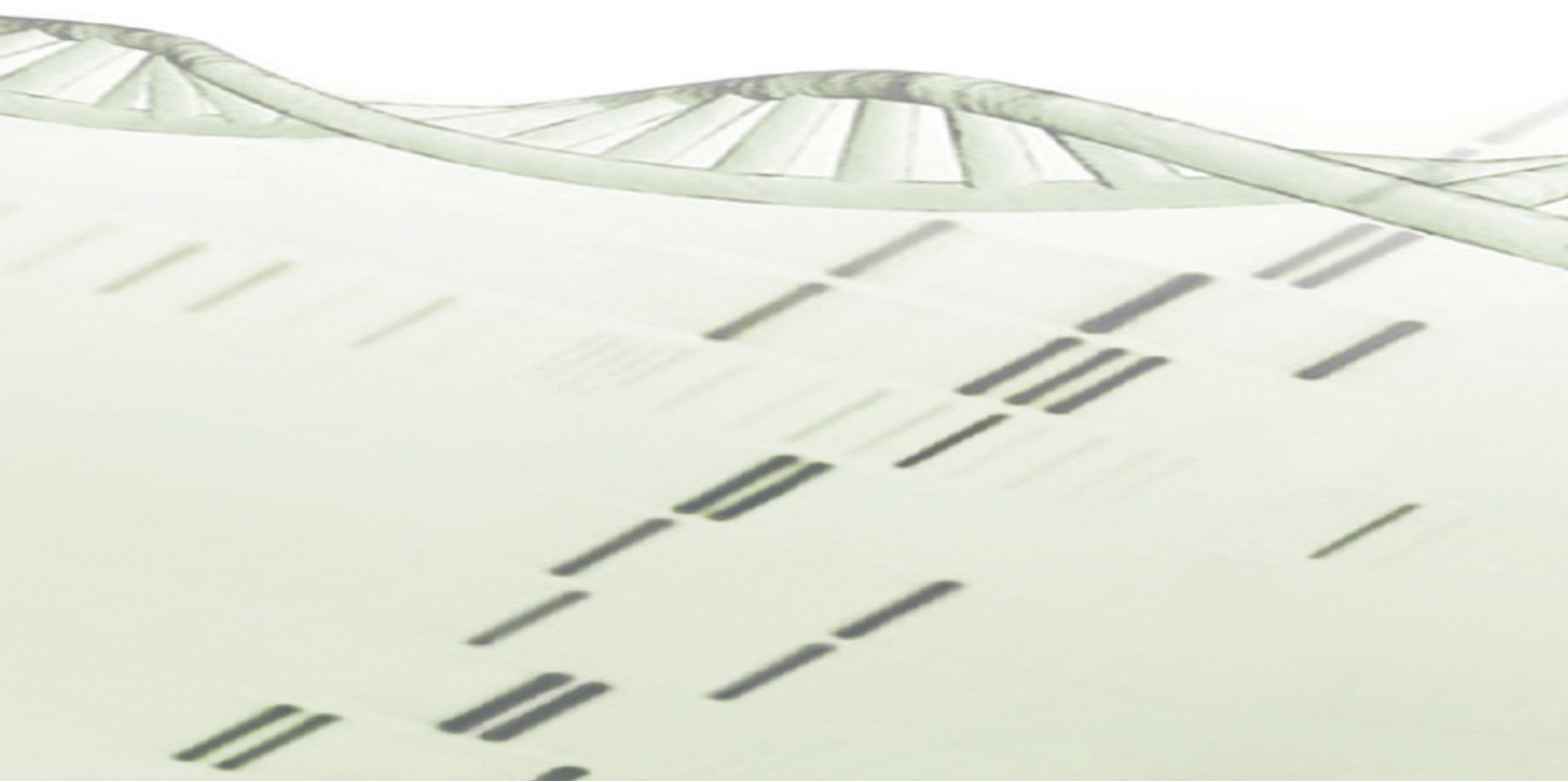
[131] Mimeault M, Venkatraman G, Johansson SL, *et al.* (2007) Novel combination therapy against metastatic and androgen-independent prostate cancer by using gefitinib, tamoxifen and etoposide. *Int J Cancer*. 120 (1): 160-169.

[132] Busby JE, Kim SJ, Yazici S, *et al.* (2006) Therapy of multidrug resistant human prostate tumors in the prostate of nude mice by simultaneous targeting of the epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells. *Prostate*. 66 (16): 1788-1798.

[133] Salzberg M, Rochlitz C, Morant R, *et al.* (2007) An open-label, noncomparative phase II trial to evaluate the efficacy and safety of docetaxel in combination with gefitinib in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Onkologie*. 30 (7): 355-360.

[134] Curigliano G, Pelosi G, De Pas T, *et al.* (2007) Absence of epidermal growth factor receptor gene mutations in patients with hormone refractory prostate cancer not responding to gefitinib. *Prostate*. 67 (6): 603-604.

9. Anexos



Anexo I

- Soluções

TBE 10x

Tris Base 108 g/l (Merck 1083821000)

Ácido Bórico 55 g/l (Merck 1001651000)

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

Anexo II

- Procedimentos Laboratoriais de Cultura de Células *in vitro*

a) Descongelamento do material celular crio-preservado

- Suplementação do meio de cultura "F12-Kaighn's" (Nutrient Mixture Kaighn's modification") (Invitrogen), com 7% de soro bovino fetal (Invitrogen), 45mg/L de ácido ascórbico (SIGMA-A4544-25G) e 1% de solução de penicilina e estreptomicina (Invitrogen).
- Aquecimento de 5 mL de meio de cultura num banho-maria a 37°C durante 5 minutos.
- Aquecimento da ampola que contém as células crio-preservadas num banho-maria a 37°C somente para favorecer a descongelação da ampola.
- Gota a gota adicionar o conteúdo da ampola previamente descongelada a um tubo "falcon" com os 5 mL de meio de cultura.
- Centrifugação do conteúdo celular a 1500 rpm, durante 3 minutos.
- Rejeição do sobrenadante e ressuspensão do "pellet" de células em 5 mL de meio de cultura.
- Transferência do material celular para um frasco de cultura e adição de 5 mL de meio de cultura.
- Visualização ao microscópio invertido da disposição das células, favorecendo uma distribuição homogênea destas pelo frasco.
- Incubação das células numa estufa a 37°C com 5% CO₂.
- Após 24 horas do descongelamento, substituição do meio de cultura.

b) Subcultura de Células Aderentes

Atingido o estado de confluência, executa-se uma subcultura:

- Retira-se todo o meio de cultura do frasco, adicionando-se 5 mL de tampão PBS (Invitrogen).
- Após lavagem, retira-se o PBS e adiciona-se 2 mL de tripsina, garantindo que esta cobre toda a camada de células.
- O frasco de cultura com a tripsina é colocado na estufa a 37°C e 5%CO₂ %, durante aproximadamente 5 minutos.
- Visualização das células em microscópio invertido.
- Adição de 4 mL de meio de cultura, para inativação da tripsina.
- Transferência do material celular para um tubo “falcon” e centrifugação a 1500 rpm durante 3 minutos.
- Rejeição do sobrenadante e ressuspensão do “pellet” de células em 5 mL de meio de cultura.
- Após quantificação celular, transferir o volume equivalente a um milhão de células para um novo frasco de cultura e adicionar o volume de meio de cultura adequado para perfazer um volume total no frasco de cultura de 10 mL.

c) Quantificação de Células em Cultura em Câmara de Neubauer

Para realizar a quantificação celular realizam-se os mesmos procedimentos da realização de sub-culturas.

- Da suspensão celular existente no tubo “falcon” recolhe-se uma alíquota para um “ependorf”.
- A partir da alíquota retira-se 15 µL da suspensão de células e adiciona-se 15 µL do corante “Trypan Blue”.
- Após homogeneização, retira-se 15 µL dividindo-se este volume pelos dois lados de uma câmara de contagem de “Newbauer”.
- Contagem, ao microscópio invertido, do número de células presente em dois campos equidistantes da câmara de contagem de “Newbauer” e posterior cálculo do número de células presente na suspensão de células.

d) Teste de Detecção de *Mycoplasma*

Detecção de contaminação por microrganismos do género *Mycoplasma* por técnica de “Polymerase Chain Reaction” (PCR). Quando se retira todo o meio de cultura no início da execução de sub-cultura recolhe-se uma alíquota de meio que funcionará como amostra na reacção de PCR, após processamento.

A região de interesse é amplificada numa reacção com volume de 50 µL. A mistura de reacção inclui 10 µL de tampão de reacção (1X), uma unidade de “Taq Polimerase” [Promega Taq DNA Polymerase], 1.5 mM de MgCl₂ [Promega Taq DNA Polymerase], 0.2 mM de dNTPs [Fermentas #RO192], 0.3µM de cada um dos “primers” (“Forward”: 5’ TGCACCATCTGTCACCTCTGTAAACCTC 3’; “reverse”: 5’ ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA 3”) e aproximadamente uma quantidade de 2 µL da amostra de meio de cultura.

e) Crio-preservação Celular

Para se proceder ao congelamento de ampolas que contêm células são realizados todos os procedimentos laboratoriais necessários à execução de sub-culturas. Após quantificação, procedeu-se ao congelamento de ampolas que continham aproximadamente o volume equivalente a 1.5 milhão de células.

Ao volume transferido para cada ampola que continha 1.5 milhão de células foi adicionado 5% DMSO. As ampolas são posteriormente colocadas num recipiente que se encontra preenchido com isopropanol que favorece uma descida gradual da temperatura. Posteriormente, o recipiente é colocado a -80°C durante aproximadamente 12-16 horas, após o qual as ampolas são transferidas para um reservatório de azoto líquido.

Anexo III

Artigo intitulado “Genetic Polymorphism in *EGF* is Associated with Prostate Cancer Aggressiveness and Progression-Free Interval in Androgen Blockade Treated Patients”, *Clin Cancer Res.* 2008; 14 (11): 3367-3371.

Imaging, Diagnosis, Prognosis

Genetic Polymorphism in *EGF* Is Associated with Prostate Cancer Aggressiveness and Progression-Free Interval in Androgen Blockade-Treated Patients

Ana L. Teixeira,^{1,4} Ricardo Ribeiro,^{1,4} Diana Cardoso,¹ Daniela Pinto,^{1,2} Francisco Lobo,³ Avelino Fraga,⁵ Francisco Pina,⁶ Fernando Calais-da-Silva,⁷ and Rui Medeiros^{1,2,4}

Abstract **Purpose:** Most prostate cancer patients develop resistance to androgen deprivation treatment, resulting in hormone resistance. Epidermal growth factor (EGF) activates several pro-oncogenic intracellular pathways inducing proliferation, differentiation, and tumorigenesis in epithelial cells. The EGF-EGF receptor pathway seems to be especially relevant in hormone-resistant prostate cancer stage. A single nucleotide polymorphism G>A in +61 locus of *EGF* gene has been described, in which A homozygous carriers express significantly less EGF protein compared with G allele carriers. Our purpose was to investigate the potential prognostic and predictive role of *EGF* functional genetic variant +61 G>A in prostate cancer patients submitted to androgen blockade therapy (ABT). **Experimental Design:** We conducted a case-control study in prostate cancer patients treated with ABT ($n = 123$) and in healthy controls without evidence of cancer ($n = 152$). Cumulatively, a follow-up study (median follow-up, 37 months) was undertaken to evaluate response to ABT therapy in prostate cancer patients. *EGF* +61 G>A genotypes were detected by PCR-RFLP. **Results:** We found increased risk in G carriers, after age-adjusted regression analysis, for being diagnosed with Gleason ≥ 7 and with metastatic disease compared with control group (CG; age-adjusted odds ratio, 3.37, $P = 0.004$ and age-adjusted odds ratio, 2.61, $P = 0.043$, respectively). Kaplan-Meier survival analysis and log-rank test showed an influence of *EGF* +61 G>A polymorphism in time to relapse during ABT ($P = 0.018$). **Conclusions:** *EGF* functional polymorphism may contribute to earlier relapse in ABT patients, supporting the involvement of *EGF* as an alternative pathway in hormone-resistant prostatic tumors. Furthermore, our results lend support to EGF-EGF receptor pathway as an additional therapeutic target during hormonal treatment.

Prostate cancer is the most common nonskin cancer among men in most Western populations (1). Initial treatment in early stages of disease is usually prostatectomy or radiation, which removes or destroys tumoral cells that are confined within the

prostate capsule. Patients diagnosed in advanced stages are frequently submitted to endocrine manipulation with androgen blockade therapy (ABT; ref. 2), although most men will eventually fail this therapy and die from recurrent hormone-resistant prostate cancer (HRPC). HRPC is a common lethal form of prostate cancer that frequently metastasizes and eventually leads to death (3). Therefore, it is important to understand the mechanisms involved in androgen-independent progression.

The androgen pathway is commonly accepted to have a critical role in survival of prostatic cells. Nevertheless, progression into advanced prostate cancer and incurable forms has also been associated with the activation of other cascades mediated by growth factors responsible for the balance between cell growth rate and apoptosis (4). Several pathways have been proposed to be involved in HRPC development, and their understanding will pave the way to more effective therapies. In fact, prostate cell growth and differentiation in the absence of androgens may be due to alternative intracellular signaling pathways, such as the ErbB pathway, which implicates epidermal growth factor (EGF) as a probable ligand (5). Additionally, cross-talk between these signaling transduction pathways has been implicated in prostate cancer survival in an androgen-poor environment (6, 7).

Cumulatively, studies by Ye et al. (8) showed that there is a positive feedback stimulation loop between androgen-induced

Authors' Affiliations: ¹Molecular Oncology Group-CI, ²Virology Department, and ³Urology Department, Portuguese Institute of Oncology, Porto Centre; ⁴Abel Salazar Biomedical Sciences Institute, Porto University; ⁵Urology Department, Hospital Militar do Porto; ⁶Urology Department, Hospital S. João, Porto, Portugal and ⁷Urology Department, Lisbon Medical Centre (Central Region), Lisbon, Portugal
Received 12/10/07; revised 1/24/08; accepted 2/18/08.

Grant support: Liga Portuguesa Contra o Cancro-Centro Regional do Norte (Portuguese League Against Cancer), Yamanouchi-Astellas European Foundation, and Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC/SAU-FCF/71552/2006). R. Ribeiro is a recipient of a Doctoral degree grant from Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BD/30021/2006). A.L. Teixeira is a recipient of a Master degree grant from Liga Portuguesa Contra o Cancro-Programa de Apoio à Investigação Oncológica no Norte de Portugal 2008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Rui Medeiros, Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, EPE Grupo de Oncologia Molecular-CI, Edifício Laboratórios, 4.º piso Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal. Phone: 351-22-508-4000; Fax: 351-22-508-4001; E-mail: ruimedei@ipoporito.min-saude.pt

©2008 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5119

Imaging, Diagnosis, Prognosis

Table 1. Allelic and genotype frequencies and OR analysis in prostate cancer patients versus controls according to *EGF* +61 G>A polymorphism

	Prostate cancer, n (%)	Controls, n (%)	aOR (95% CI)	P
Genotypes				
AA	33 (0.27)	57 (0.38)		
AG/GG	90 (0.73)	95 (0.62)	1.94 (0.99-3.79)	0.053
Alleles				
A	124 (0.50)	167 (0.55)		
G	122 (0.50)	137 (0.45)	1.22 (0.84-1.70)	0.290

gene transcription and EGF-stimulated signal transduction, as one could stimulate the synthesis of the receptors for the other.

The EGF receptor (EGFR) is proposed to participate in the pathogenesis or maintenance of several human cancers of epithelial origin. In prostate cancer cells, EGFR ligands are frequently elevated and EGFR itself is commonly overexpressed (9). Furthermore, EGFR expression increases during progression to a hormone-resistant stage (10).

EGF is encoded by *EGF* gene, located in chromosome 4q25-q27. Recently, Shahbazi et al. (11) identified a functional G>A single nucleotide polymorphism at position +61 in the 5' untranslated region of the *EGF* gene. *In vitro* studies showed that G carriers have an increased EGF production in cultured peripheral blood mononuclear cells, glioma cells, glioblastoma cells, and breast cancer cells (11-13).

Previous studies found controversial results about the association between *EGF* polymorphism and cancer development and prognosis (11-16). Nevertheless, the present study is the first to evaluate the relevance the *EGF* functional polymorphism in HRPC patients.

Materials and Methods

Study population. One hundred and twenty-three patients (ages 71.7 ± 7.4 y) submitted to ABT between 1995 and 2006 at Lisbon Medical Centre (Central Region) were included in the study. All cases were submitted to prostate biopsy and had histopathologically confirmed diagnosis; the median follow-up time was 37 mo (range, 2-137 mo). All cases were considered with complete data for statistical analysis, from which 35% of the cases had localized prostate disease (T₁-T_{2b}), 36% of the cases had locally advanced disease (T₃-T₄), and 29% of the cases had metastatic disease (N⁺ and/or M⁺). The types of hormonal treatment were as follows: antiandrogens plus luteinizing hormone-releasing hormone agonist combination therapy (84.9%), luteinizing hormone-releasing hormone agonist alone (9.2%), and antiandrogens alone (5.9%). Hormone resistance was evaluated through prostate-specific antigen recurrence, which was defined as

two consecutive increasing prostate-specific antigen values >1.0 ng·mL⁻¹ and differing by >0.2 ng·mL⁻¹.

Men ages >45 y, without known history of cancer, were recruited from the Portuguese Institute of Oncology-Porto Centre blood donor's bank (ages 55.6 ± 8.5 y) and included in the control group ($n = 152$). Study was conducted according to Helsinki Declaration principles. Antecubital peripheral venous blood sample was collected from each subject enrolled in the study followed by DNA extraction from WBC fraction according to salting out procedure (17).

***EGF* +61 G>A polymorphism genotyping.** *EGF* +61 G>A variants were analyzed through PCR-RFLP method, as described in a previous report (16). Briefly, DNA was amplified in a 50- μ L reaction mixture containing *EGF* +61 G>A primers (forward, 5'-TGTCACI-AAAGGAAAGGAGGT-3'; reverse, 5'-TTCACAGAGITTAACAGCCC-3'), 1 \times PCR buffer, 1 unit Taq polymerase, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L deoxynucleotide triphosphates, and 100 ng DNA.

PCR products (242 bp) were incubated overnight with *Ahl*I restriction endonuclease at 37°C. The polymorphism was defined by the presence (A) or absence (G) of an additional restriction site.

Quality control procedures implemented for the *EGF* genotype analyses included double sampling in ~10% of the samples to assess reliability and the use of negative controls to step-away false positives. Two authors obtained the results independently, and the ambiguous results were reanalyzed.

Statistical analysis. Genotype proportions among groups were compared with Pearson χ^2 test. Central tendency measures and comparisons between groups were evaluated through independent sample Mann-Whitney *U* test. Unconditional logistic regression analysis was used to compute odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) estimating the association of genotypes to prostate cancer susceptibility, and to stratified Gleason score, metastatic disease, and hormone resistance development, while adjusting for age in all these variables [age-adjusted OR (aOR)]. The Kaplan-Meier method and log-rank test were used to compare genotype influence in the disease-free survival interval.

Results

The functional *EGF* +61 G>A polymorphism genotype distribution in patients and controls is described in Table 1. Using

Table 2. Risk for being diagnosed with higher Gleason grade (≥ 7) and with metastatic prostate cancer in *EGF* +61 G carriers

	Controls, n (%)	Metastatic prostate cancer, n (%)	Gleason ≥ 7 , n (%)
AA	57 (0.38)	8 (0.22)	13 (0.19)
AG/GG	95 (0.62)	28 (0.78)	54 (0.81)
aOR*		2.61	3.37
95% CI		1.03-6.60	1.47-7.73
P		0.043	0.004

*aOR in comparison with control group.

Table 3. Prostate cancer patient genotype frequencies according to tumor staging and prostate-specific antigen level

	Genotypes		P
	AA, n (%)	AG/GG, n (%)	
Staging			
Localized (T ₁ -T _{2b} stage)	11 (0.26)	32 (0.74)	
Locally advanced (T ₃ -T ₄ stage)	14 (0.32)	30 (0.68)	
Metastatic (N ⁺ and/or M ⁺ stage)	8 (0.22)	28 (0.78)	0.612*
Prostate-specific antigen level at diagnosis (ng·mL ⁻¹) †	33.2 ± 9.7	62.7 ± 16.1	0.901 ‡

* χ^2 test.
† Average ± SE.
‡ Mann-Whitney U test.

the recessive model, frequencies for homozygous AA and AG/GG genotypes were, respectively, 0.27 and 0.73 for prostate cancer patients and 0.38 and 0.62 in the control group. Although the association is not statistically significant, there is a trend to an overrepresentation of AG/GG genotype in prostate cancer group compared with normal controls (aOR, 1.94; 95% CI, 0.99-3.79; $P = 0.053$).

Table 2 presents EGF +61 G>A genotype distribution and age-adjusted risk for being diagnosed with an aggressive prostate cancer phenotype (e.g., presence of metastatic disease or Gleason grade >7). Carriers of the G allele have a significantly higher age-adjusted risk for being diagnosed with metastatic prostate cancer (aOR, 2.61; 95% CI, 1.03-6.60; $P = 0.043$) and with higher Gleason grade tumors (≥ 7 ; aOR, 3.37; 95% CI, 1.47-7.73; $P = 0.004$).

Within the group of patients, EGF +61 G>A functional polymorphism was not associated with disease stage and prostate-specific antigen serum level at diagnosis (Table 3). Table 4 shows the influence of EGF +61 G>A polymorphism in the response to ABT. Prostate cancer patients who developed hormone resistance had similar genotype frequencies to hormone respondents ($P = 0.468$).

Kaplan-Meier survival curves (Fig. 1) and log-rank test (Mantel-Cox) show that EGF +61 G>A polymorphism is associated with progression-free interval cumulative probability. Median estimated cumulative survival was significantly lower in AG/GG carriers compared with AA homozygous (15.2 and 87.4 months, respectively; $P = 0.018$), showing an earlier relapse in prostate cancer patients following hormone ablation therapy.

Table 4. Hormone resistance in prostate cancer patients submitted to ABT according to EGF +61 G>A polymorphism

	Genotypes		P
	AA, n (%)	AG/GG, n (%)	
Hormone resistance			
No	22 (0.67)	66 (0.73)	
Yes	11 (0.33)	24 (0.27)	0.468*

* χ^2 test.

Discussion

Patients with local or distant metastatic prostate cancer are usually treated primarily through pharmacologic androgen suppression (2). This hormonal therapy is initially efficient, although the majority of patients will subsequently become unresponsive to androgen inhibition (18). HRPc is a complex and heterogeneous form of prostate cancer with a high capacity of progression and metastization (4).

EGF has been described as one of the most influent mitogenic factors in prostate function regulation (19). Furthermore, its receptor is overexpressed in prostate tumors, and the EGF-EGFR pathway is involved in hormone resistance development (9). In prostate cancers, EGFR is weakly expressed in the benign gland and in areas of low-grade prostatic intraepithelial neoplasia, whereas it is highly expressed in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and in neoplastic cells (20). Expression levels of EGF and EGFR in prostate cancer cells seem to be enhanced during disease progression to HRPc and metastatic prostate cancer (10).

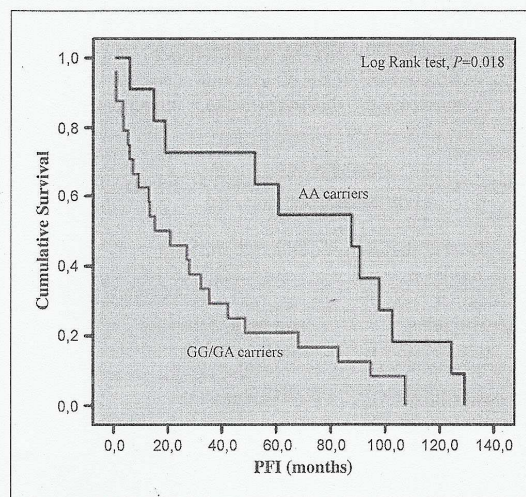


Fig. 1. Kaplan-Meier analysis of progression-free interval (PFI) in prostate cancer androgen blockade-treated patients according to EGF +61 G>A polymorphism.

Imaging, Diagnosis, Prognosis

Through overproduction of EGFR ligands such as EGF, transforming growth factor- α , amphiregulin, heparin-binding EGF, and betacellulin, cancer cells can stimulate their own proliferation through an autocrine mechanism (21–23). *In vitro* studies show that some EGFR ligands, such as amphiregulin, are overexpressed in prostate cancer cells (PC3; ref. 24), emphasizing the relevance of further studies in other ligands. Cumulatively, *in vitro* studies revealed that EGFR signaling pathway inhibition reduces androgen-independent DU145 and PC3 prostate cancer cell growth through interference in G₁-S cell cycle progression phase (25).

Although the EGF +61 G>A polymorphism is localized in a noncoding region and the exact mechanism by which it affects EGF production is still undetermined, this locus seems to be involved in EGF regulation because it affects EGF expression (11, 13). It is hypothesized that this polymorphism might influence EGF through differential EGF mRNA processing and degradation or by providing a binding site for transcription factors.

Conversely, it is expected that G carriers may have a higher EGF availability in tumor environment. EGF +61 G>A polymorphism has been the subject of investigation in several case-control studies, involving other cancer types, with controversial results (11–15).

A recent investigation using prostatic tumor cell expression signatures showed an attenuated androgen signaling signature in high-grade and metastatic prostate cancer, eventually reflecting and providing support for the clinical association of grade with prognosis (26). In our study, risk for being diagnosed with a high Gleason grade is significantly increased in G carriers (aOR, 3.37; 95% CI, 1.47–7.73). Concomitantly, we observed a trend toward an increased risk to develop prostate cancer in EGF +61 G carriers (aOR, 1.94; 95% CI, 0.99–3.79), although this association was not statistically significant. Several studies have previously shown that growth factors promote tissue proliferation and malignant transformation (27). Accordingly, results from our study support that this genetic variant, which influences EGF expression and serum levels, may have an effect in prostate cancer development and in higher grade at diagnosis. In fact, some authors (28) refer that aberrant growth and differentiation are due to inappropriate cellular environment. Our results suggest that EGF +61 G>A polymorphism, which represents a functional modification in EGF expression since birth and throughout life, exposes AG/GG carriers to higher EGF concentrations, inducing modifications in prostate normal and tumoral cell microenvironment, leading to different patterns of cell differentiation, and contributing to a higher Gleason grade at diagnosis.

We found a significantly higher risk for metastasis in G carriers ($P = 0.043$). Growth factors, such as EGF, have an important role in migration and invasion of cancer cells. They can disrupt different pathways and contribute to metastization. The EGFR can interact with the integrin $\alpha_6\beta_4$ and promote cell migration through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and other downstream pathways (29–31). Cumulatively, previous studies

showed a significant association between EGFR activation and the acquisition of the invasive phenotype (32–34).

We hypothesize that in G carriers, which express significantly more EGF, the EGF-EGFR pathway may be up-regulated, inducing a metastatic tumor phenotype.

The HRPC is a multistep and multievent process with different molecular patterns throughout development (35), involving changes in growth factor signaling. Several reports support an interaction of EGFR and EGF-EGFR pathway with androgen receptor (AR) pathway in prostate cancer cells, although the role of AR in hormone resistance development is still controversial. Furthermore, AR is also overexpressed in hormone-resistant tumors (36). Recently, Bonaccorsi et al. (37) showed that expression of AR affects clathrin-mediated endocytosis pathway of EGFR, suggesting that AR-positive prostatic cells have a less aggressive phenotype due to interference in proinvasive EGFR signaling (37). Moreover, studies in prostate cancer cell cultures indicated that androgen deprivation could favor the progression to HRPC states by up-regulating the EGFR pathway (38).

Our results of earlier hormone resistance in hormone-treated prostate cancer patients agree with these previous findings because the lack of ligands to AR due to ABT will decrease AR signaling, inducing a more aggressive phenotype due to EGF-EGFR alternative signaling pathway. Alternatively, we hypothesize that because EGF AG/GG carriers have increased expression of EGF and because the AR pathway can be activated by other growth factors, including EGF, tumoral cells of G carriers may be exposed to higher EGF concentrations through both autocrine and paracrine mechanisms, inducing a faster progression to hormone resistance.

Taken together, these results suggest that simultaneous blockade of AR and EGFR pathways may be appropriate for prostate cancer treatment with effect in the time to HRPC development and in prognosis. Accordingly, *in vitro* and *in vivo* studies evidence growth suppression in HRPC cells, after tyrosine kinase inhibitor or anti-EGFR monoclonal antibody therapies combined with other chemotherapeutic drugs (39–42). Nevertheless, clinical trials of tyrosine kinase inhibitor in hormone-refractory metastatic prostate cancer patients did not effectively increase clinical response (43, 44). Further studies in larger populations and varying chemotherapeutic regimens to include tyrosine kinase inhibitor or EGFR monoclonal antibodies should be undertaken to ascertain the relevance of EGF-EGFR pathway in HRPC progression and the effectiveness of anti-EGFR treatments in these patients.

The present study suggests that the EGF functional polymorphism may contribute to the establishment of a genetic profile to ABT efficacy in prostate cancer patients before their involvement in hormonal treatment and supports the involvement of EGF as an alternative molecular pathway in hormone-resistant prostatic tumors. Further studies in larger samples are required to strengthen these results and guide future investigations.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

- Hsing Aw, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci* 2006;11:1388–413.
- Pronzato P, Rondini M. Hormonotherapy of advanced prostate cancer. *Ann Oncol* 2005;4:iv80–4.
- Calabro F, Sternberg CN. Current indications for chemotherapy in prostate cancer patients. *Eur Urol* 2007; 51:17–26.
- Harper ME, Goddard L, Glynn-Jones E, et al. Multiple responses to EGF receptor activation and their abrogation by a specific EGF receptor tyrosine kinase inhibitor. *Prostate* 2002;52:59–68.
- Feldman BJ, Feldman D. The development of

- androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:34–45.
6. El Sheikh SS, Domin J, Abel P, Stamp G, Lalani E-N. Androgen-independent prostate cancer: potential role of androgen and ErbB receptor signal transduction crosstalk. *Neoplasia* 2003;5:99–109.
 7. Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 1999;5:280–5.
 8. Ye D, Mendelsohn J, Fan Z. Androgen and epidermal growth factor down-regulate cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 and costimulate proliferation of MDA PCa 2a and MDA PCa 2b prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:2171–7.
 9. Vicentini C, Festuccia C, Gravina GL, Angelucci A, Marronaro A, Bologna M. Prostate cancer cell proliferation is strongly reduced by the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 *in vitro* on human cell lines and primary cultures. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:165–75.
 10. Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiato F, et al. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3438–44.
 11. Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, et al. Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet* 2002;359:397–401.
 12. Bhowmick D, Zhuang Z, Wait SD, Weil R. A functional polymorphism in the EGF gene is found with increased frequency in glioblastoma multiforme patients and is associated with more aggressive disease. *Cancer Res* 2004;64:1220–3.
 13. Costa B, Ferreira P, Costa P, et al. Association between functional EGF+61 polymorphism and glioma risk. *Clin Cancer Res* 2007;13:2621–5.
 14. Hamai Y, Matsumura S, Matsusaki K, et al. A single nucleotide polymorphism 5' untranslated region of the EGF gene is associated with occurrence and malignant progression of gastric cancer. *Pathobiology* 2004;72:133–8.
 15. Okamoto I, Roka F, Kröger J, et al. The EGF A61G polymorphism is associated with disease-free period and survival in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2006;126:2242–6.
 16. Ribeiro R, Soares A, Pinto D, Catarino R, Lopes C, Medeiros R. EGF genetic polymorphism is associated with clinical features but not malignant phenotype in neurofibromatosis type 1 patients. *J Neurooncol* 2007;81:225–9.
 17. Mullenbach R, Lagoda PJ, Welter C. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends Genet* 1989;5:391.
 18. Angelucci A, Schenone S, Gravina G, et al. Pyrazolo [3,4-*d'*] pyrimidines c-Src inhibitors reduce epidermal growth factor-induced migration in prostate cancer cells. *Eur J Cancer* 2006;42:2838–45.
 19. El Sheikh SS, Domin J, Abel P, Stamp G, Lalani E-N. Phosphorylation of both EGFR and ErbB2 is a reliable predictor of prostate cancer cell proliferation in response to EGF. *Neoplasia* 2004;6:846–53.
 20. Harper ME, Glynne-Jones E, Goddard L, Mathews P, Nicholson RI. Expression of androgen receptor and growth factors in premalignant lesions of the prostate. *J Pathol* 1998;186:169–77.
 21. Sato B. Can an autocrine loop explain sex-hormone-dependent tumour growth? A brief overview. *Oncology* 1999;57:3–6.
 22. Normanno N, Kim N, Wen D, et al. Expression of messenger RNA for amphiregulin, heregulin, and cripto-1, three new members of the epidermal growth factor family, in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1995;35:293–7.
 23. Miguel P, Royuela M, Bethencourt R, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R. Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor α , epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates. *Cytokine* 1999;11:722–7.
 24. Yotsumoto F, Yagi H, Suzuki SO, et al. Validation of HB-EGF and amphiregulin as target for human cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;365:555–61.
 25. Karashima T, Sweeney P, Slaton J, et al. Inhibition of angiogenesis by the anti-epidermal growth factor receptor antibody Imclone c225 in androgen-independent prostate cancer growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 2002;8:1253–64.
 26. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, et al. Integrative molecular concept modelling of prostate cancer progression. *Nat Genet* 2007;39:41–51.
 27. Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science* 1991;254:1146–53.
 28. Long R, Morrissey C, Fitzpatrick J. Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin Sci* 2005;108:1–11.
 29. Mercurio AM, Rabinovitz I, Shaw LM. The $\alpha\beta 4$ integrin and epithelial cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:541–5.
 30. Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Tokar A, Mercurio AM. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the $\alpha\beta 4$ integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 1997;91:949–60.
 31. Tampellini M, Longo M, Cappia S, et al. Co-expression of EGF receptor, TGF α and S6 kinase is significantly associated with colorectal carcinomas with distant metastases at diagnosis. *Virchows Arch* 2007;450:321–8.
 32. Zolfaghari A, Djakiew D. Inhibition of chemomigration of a human prostatic carcinoma cell (TSU-pr1) line by inhibition of epidermal growth factor receptor function. *Prostate* 1996;28:232–8.
 33. Kondapaka SB, Fridman R, Reddy KB. Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 1997;70:722–6.
 34. Angelucci A, Gravina GL, Rucci N, et al. Suppression of EGF-R signaling reduces the incidence of prostate cancer metastasis in nude mice. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:197–210.
 35. Taille A, Vacherot F, Salomon L, et al. Hormone-refractory prostate cancer: a multi-step and multi-event process. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2001;4:204–12.
 36. Visakorpi T, Hyytiäinen E, Koivisto P, et al. *In vivo* amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 1995;9:401–6.
 37. Bonaccorsi L, Nosi D, Muratori M, Formigli L, Forti G, Baldi E. Altered endocytosis of epidermal growth factor receptor in androgen receptor positive prostate cancer cell lines. *J Mol Endocrinol* 2007;38:51–66.
 38. Festuccia G, Gravina GL, Angelucci A, et al. Additive antitumor effects of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, gefitinib (Iressa), and the nonsteroidal antiandrogen, bicalutamide (Casodex), in prostate cancer cells *in vitro*. *Int J Cancer* 2005;115:630–40.
 39. Belochitski O, Ariad S, Shany S, Fridman V, Gavrilov V. Efficient dual treatment of the hormone-refractory prostate cancer cell line DU145 with cetuximab and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *In Vivo* 2007;21:371–6.
 40. Mimeault M, Johansson SL, Vankatraman G, et al. Combined targeting of epidermal growth factor receptor and hedgehog signaling by gefitinib and cyclopamine cooperatively improves the cytotoxic effects of docetaxel on metastatic prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:967–78.
 41. Mimeault M, Venkatraman G, Johansson SL, et al. Novel combination therapy against metastatic and androgen-independent prostate cancer by using gefitinib, tamoxifen and etoposide. *Int J Cancer* 2007;120:160–9.
 42. Busby JE, Kim SJ, Yazici S, et al. Therapy of multi-drug resistant human prostate tumors in the prostate of nude mice by simultaneous targeting of the epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells. *Prostate* 2006;66:1788–98.
 43. Salzberg M, Rochlitz C, Morant R, et al. An open-label, noncomparative phase II trial to evaluate the efficacy and safety of docetaxel in combination with gefitinib in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Onkologie* 2007;30:355–60.
 44. Curigliano G, Pelosi G, De Pas T, et al. Absence of epidermal growth factor receptor gene mutations in patients with hormone refractory prostate cancer not responding to gefitinib. *Prostate* 2007;67:603–4.

