



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

Caracterização da expressão e função da trombospondina 2 no câncer de próstata.

ALINE DA ROCHA MATOS

Orientadora: Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

**RIO DE JANEIRO
2013**



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

ALINE DA ROCHA MATOS

Caracterização da expressão e função da trombospondina 2 no câncer de próstata.

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

RIO DE JANEIRO
2013

M425c Matos, Aline da Rocha.

Caracterização da expressão e função da trombospondina 2 no câncer de próstata.—Rio de Janeiro, 2013.

Xvi, 148f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA, 2013.

Orientador: Etel Rodrigues Pereira Gimba.

1. Neoplasia da Próstata. 2. Trombospondina. 3. Hiperplasia Protática Benigna. I. Gimba, Etel Rodrigues Pereira (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD-616.99463



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

AUTOR: Aline da Rocha Matos

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DA TROMBOSPONDINA 2 NO
CÂNCER DE PRÓSTATA**

ORIENTADORA: Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

**Prof. Dr. Raquel Cilvalschi Maia - Presidente
Prof. Dr. Fernando Regla Vargas
Prof. Dr. Cláudia Santos Mermelstein
Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti
Prof. Dr. Esther Alicia Rocio Hassan – Suplente I
Prof. Dr. Maria Isabel Doria Rossi – Suplente II**

**RIO DE JANEIRO
2013**

*A Deus, por guiar e iluminar minha vida e meus caminhos.
À minha família maravilhosa, meu esposo, meus pais, meu irmão e minha avó, por
me amarem e apoiarem incondicionalmente, por serem a melhor parte da minha
vida, por seu companheirismo e por tornarem minha vida mais feliz.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra Etel Gimba, por ter me recebido em seu laboratório, me dando a oportunidade maravilhosa de fazer pesquisa em seu grupo no INCa. Obrigada por toda a sua orientação, por ter acreditado no meu trabalho, por todo o apoio, investimento e incentivo!

Ao grupo de marcadores moleculares em neoplasias, a Luciana Bueno, Kivvi Mello, Ana Emília e Tatiana Tilli; obrigada pelo trabalho em equipe que realizamos juntas, pelas discussões e aprendizados do dia a dia, e também pela amizade e os momentos de descontração.

À equipe técnica do Programa de Carcinogênese Molecular, a Fernanda, Ana Paula, Andréia e Rosimar, por toda a ajuda e apoio no dia a dia dos experimentos, por facilitarem nossa vida com a organização que nos proporcionam. Agradeço também pelo respeito, carinho e competência.

Às meninas da secretaria, Sueli e Thaís, agradeço por ajudarem muito com a área administrativa e suporte, além do carinho e paciência de sempre.

Aos organizadores e membros do Programa *Next Generation Scientist Program*, da Novartis, em especial ao Dr Thomas Radimerski, por ter acreditado e incentivado meu trabalho e por me dado a chance de trabalharmos juntos. Agradeço pelas incontáveis discussões e aprendizados. Também agradeço a Rita Andraos, pelo suporte durante toda minha estadia em seu laboratório.

A Dra Cláudia Coutinho-Camilo e ao Dr Fernando Soares, do Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo, por terem me ajudado na realização do TMA de próstata.

Ao Dr Luiz Cláudio Thuler, pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao Dr Eloísio Alexsandro e seus alunos, do Serviço de Urologia da UERJ, pela coleta das amostras de pacientes com câncer de próstata e envio das amostras.

Ao suporte financeiro da Fundação Swiss Bridge, Fundação do Câncer, Ministério da Saúde, CAPES, CNPq e FAPERJ, que tornaram possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A trombospondina 2 (TSP2) é uma glicoproteína secretada na matriz extracelular envolvida com inibição de crescimento e angiogênese tumorais. Sua expressão em tumores é bastante controversa, dependendo do tipo tumoral. A caracterização do nível de expressão e da função de TSP2 ainda não foi realizada no câncer de próstata (CaP). Os objetivos deste trabalho são caracterizar o perfil de expressão de TSP2 no CaP e sua potencial aplicação no diagnóstico diferencial entre CaP e hiperplasia prostática benigna (HPB), além de investigar sua função no CaP. Para tanto, o nível de expressão do transcrito TSP2 foi analisado por PCR quantitativo em tempo real, em amostras teciduais de CaP e HPB e em linhagens prostáticas tumorais e não tumorais. A expressão da proteína TSP2 foi avaliada por imunohistoquímica em microarranjo de tecidos contendo amostras de CaP e HPB e utilizando um sistema semi-automático de análise de imagem celular. Linhagens celulares de CaP (PC3 e DU145) foram tratadas com a proteína recombinante de TSP2 (recTSP2) (50 µg/mL), sendo realizadas análises de viabilidade e de ciclo celular, além de análise fosfo-proteômica na linhagem PC3 tratada com recTSP2, através de um arranjo contendo anticorpos para 46 proteínas fosforiladas. Observamos que o transcrito TSP2 apresentou menores níveis de expressão em amostras teciduais e linhagens de CaP, em comparação com amostras teciduais de HPB e linhagem não tumoral prostática ($p < 0,01$). Em análise de curva ROC (*Receiving Operating Curve*), o transcrito TSP2 mostrou-se mais eficiente na distinção entre CaP e HPB ($p < 0,01$) do que os níveis séricos de PSA ($p = 0,299$). A expressão da proteína TSP2 foi observada no citoplasma das células dos compartimentos estromais e epiteliais de CaP e HPB. Notadamente, o escore da marcação estromal de TSP2 nos tecidos de CaP apresentou-se significativamente menor do que em HPB ($p < 0,01$), enquanto o padrão de marcação epitelial mostrou-se similar entre as duas doenças. O tratamento das linhagens PC3 e DU145 com recTSP2 diminuiu a viabilidade destas células, além de aumentar o percentual de células na fase sub-G1 do ciclo celular. A análise fosfo-proteômica das células PC3 tratadas mostrou que resíduos das proteínas ERK1/2 e JNK apresentam menor nível de fosforilação, enquanto que resíduos das proteínas Akt, p70S6, p53, paxilina, RSK1/2/3 e p27 possuíam maior nível de fosforilação. Em conjunto, estes dados demonstram que TSP2 apresenta menor expressão no CaP, especialmente no compartimento estromal. Os níveis alterados de TSP2 apresentam potencial aplicação no diagnóstico diferencial de CaP e HPB. Adicionalmente, os resultados gerados por este estudo fazem a primeira descrição da potencial função de TSP2 no CaP, reforçando a possibilidade de TSP2 ser um inibidor tumoral em células de CaP, o que já foi demonstrado para outros tipos tumorais.

Palavras-chave: Trombospondina-2, Câncer de Próstata, Hiperplasia Prostática Benigna

ABSTRACT

Thrombospondin 2 (TSP2) is a glycoprotein that is secreted in the extracellular matrix and is related to tumor growth and angiogenesis inhibition. However, its expression in tumors is quite controversial, depending on the tumor type. Despite the characterization of TSP2 expression level and function has been shown for some tumors types, a detailed characterization in prostate cancer (PCa) has not been performed. This study aims to characterize TSP2 expression profile in PCa and its potential application in the differential diagnosis between PCa and benign prostatic hyperplasia (BPH), and to characterize TSP2 possible functions in PCa. TSP2 transcript expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in PCa and BPH tissue samples and tumor and non tumor prostate cell lines. Protein expression was evaluated in tissue microarray assay containing PCa and BPH tissue samples, by immunohistochemistry with an anti-TSP2 antibody, and using a semi-automated image analysis system. To investigate the functional role of TSP2 in PCa, PCa cell lines (DU145 and PC3) were treated with TSP2 recombinant protein (recTSP2) (50 µg/mL). Cell viability and cell cycle analysis were performed. There was also performed phospho-proteomic analysis in PC3 cells treated with recTSP2 through an array containing antibodies to 46 phosphorylated proteins. Our results showed that TSP2 transcript expression was down regulated in PCa tissue samples and cell lines, as compared to BPH tissue samples and non-tumor prostate cell line ($p < 0.01$). ROC (Receiving Operating Curve) analyses showed that TSP2 transcript expression level was more efficient in distinguishing between PCa and BPH groups ($p < 0.01$) than serum PSA ($p = 0.299$). TSP2 protein expression was observed in the cytoplasm of cells of epithelial and stromal compartments of PCa and BPH. Notably, TSP2 stromal staining score was significantly lower in PCa than in BPH ($p < 0.01$), whereas the epithelial staining pattern was found to be similar for both diseases. PC3 and DU145 cell lines treatment with recTSP2 significantly reduced viability of these cells, and increase the percentage of cells in sub-G1 phase of the cell cycle. The phospho- proteomic analysis of treated PC3 cells showed that the proteins ERK1/2 and JNK presented lower phosphorylation level. However, Akt, p70S6, p53, p27, paxillin and RSK1/2/3 had a higher level of phosphorylation after treatment with recTSP2. Together, these data demonstrate that TSP2 is down regulated in PCa, especially in the stromal compartment. TSP2 diminished levels in PCa have potential application in the differential diagnosis of PCa and BPH. Additionally, the results generated in this study are the first description of the potential role of TSP2 in PCa, reinforcing the possibility that TSP2 is an inhibitor of PCa, which has been demonstrated for other tumor types.

Keywords: Thrombospondin-2, Prostate Cancer, Benign Prostatic Hyperplasia

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Glândula prostática.....	1
1.2. Doenças da próstata.....	3
1.2.1. Câncer de próstata.....	4
1.2.1.1. Epidemiologia.....	5
1.2.1.2. Diagnóstico.....	6
1.2.1.3. Classificação histopatológica.....	8
1.2.1.4. Tratamento.....	11
1.2.1.5. Fatores genéticos e alterações genômicas	13
1.2.1.6. Lesões pré-malignas e carcinogênese.....	14
1.2.1.7. Evolução do CaP.....	15
1.2.1.8. Interação tumor-estroma.....	20
1.2.1.9. Cascata metastática.....	21
1.2. Trombospondinas.....	22
1.2.1. Organização estrutural.....	23
1.3.2. Trombospondina 2.....	24
1.3.2.1. Estrutura gênica e regulação	24
1.3.2.2 Distribuição tecidual	25
1.3.2.3 Interações e funções	26
1.3.2.3.1 Inibição da angiogênese	28
1.3.2.3.2 Papel funcional em tumores	30
1.3.2.4 Expressão nos tumores	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivos específicos.....	35
3 CAPÍTULO I	36
Objetivos específicos	37
Artigo aceito para publicação	38
Materiais e Métodos complementares	78
Amostras teciduais	78
Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	78
PCR em tempo real	78
Detalhamento da construção e da análise dos ensaios de microarranjo de tecidos com imunohistoquímica para TSP2	80
Cultura de células	83
Extração e quantificação de proteínas	84

Detecção de TSP2 por imunoblot	84
Resultados complementares	86
A expressão de TSP2 encontra-se similar em amostras teciduais de CaP e de tecido adjacente ao tumor	86
A expressão do transcrito TSP2 não se correlaciona com dados clínico-patológicos dos pacientes de CaP	88
A expressão da proteína TSP2 não foi detectada por imunoblot em linhagens tumorais de CaP	88
Análises adicionais da expressão da proteína TSP2 nos tecidos de CaP e HPB	89
4 CAPÍTULO II	95
Objetivos específicos	96
Materiais e Métodos	97
Cultura de células	97
Tratamento celular com proteína recombinante TSP2 humana	97
Ensaio de análise de viabilidade celular	98
Ensaio de análise de ciclo celular	99
Ensaio de análise do perfil fosfo-proteômico da linhagem PC3 tratada com TSP2	99
Resultados	104
O tratamento com recTSP2 diminui a viabilidade de linhagens de CaP	104
Tratamento com a proteína recTSP2 aumenta o percentual de células de CaP em fase sub-G1 do ciclo celular	105
Análise do perfil fosfo-proteômico da linhagem PC3 tratada com TSP2	106
5 DISCUSSÃO GERAL	111
6 CONCLUSÃO GERAL	125
7 PERSPECTIVAS	126
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

Lista de tabelas

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para o qRT-PCR de TSP2. – Página 79.

Tabela 2 – Proporção do nível de expressão relativa de TSP2 entre amostras teciduais de CaP e não tumorais de tecido adjacente ao tumor (Adj CaP), pareadas individualmente. – Página 87.

Tabela 3 – Análise da associação da mediana da razão do escore de marcação epitélio/estroma de TSP2 e os dados clínico-patológicos dos pacientes de CaP. – Página 93.

Tabela 4 – Valores de área sob a curva, para as curvas ROC das medianas do escore de marcação epitelial de TSP2, do escore de marcação estromal de TSP2 e da razão do escore epitélio/estroma de TSP2 e os dados clínico-patológicos das amostras de CaP. – Página 94.

Tabela 5 – Coordenadas das proteínas cinases fosforiladas alvos dos anticorpos do kit *Proteome Profiler Array - Human Phospho-Kinase Array Kit* (R&D Systems). – Página 103.

Tabela 6 – Análise do perfil de fosforilacao relativa de 46 proteínas envolvidas em vias de sinalização celulares, em células PC3 tratadas e não tratadas com recTSP2. – Página 109.

Lista de figuras

Figura 1. Esquema da localização anatômica da próstata na pelve. – Página 1.

Figura 2. Esquema da anatomia da próstata, evidenciando a distribuição de suas zonas e a localização da uretra prostática. – Página 2.

Figura 3. Figura representativa das glândulas túbulo-alveolares da próstata, envolvidas por tecido conjuntivo e músculo liso. - Página 2.

Figura 4. Estimativa da incidência de câncer na população brasileira masculina para o ano de 2012. – Página 5.

Figura 5. Estadiamento patológico do CaP, de acordo com o sistema TNM, que avalia a localização e o espalhamento do tumor. – Página 10.

Figura 6. Sistema de graduação do CaP através do sistema de Gleason. – Página 11.

Figura 7. Mecanismos da via de ação do androgênio e do receptor de androgênio (RA) em células da próstata. – Página 17.

Figura 8. Esquema de corte transversal da glândula prostática evidenciando as etapas de progressão do câncer de próstata (CaP) para câncer de próstata refratário ao hormônioterapia (CPRH). – Página 18.

Figura 9. Mecanismos relacionados com o desenvolvimento do câncer de próstata refratário a hormônioterapia (CPRH). – Página 20.

Figura 10. Membros da família das trombospondinas (TSPs) possuem estrutura multimodular. – Página 24.

Figura 11. Espalhamento e morfologia do citoesqueleto de fibroblastos da derme. – Página 27.

Figura 12. Aparência do camundongo knock-out para TSP2. – Página 28.

Figura 13. Cortes de tecido da derme, representativos de tecidos com aumento de densidade vascular no camundongo sem TSP2. – Página 30.

Figura 14. Figura representativa de uma amostra tecidual de CaP e a seleção de suas regiões tumorais e estromais. – Página 83.

Figura 15. Expressão relativa de TSP2 em amostras teciduais tumorais de CaP e amostras não tumorais adjacentes ao tumor. – Página 87.

Figura 16. O nível de expressão do transcrito TSP2 não se correlaciona com os dados clínico-patológicos dos pacientes de CaP. – Página 88.

Figura 17. Caracterização da expressão da proteína TSP2 em linhagens celulares tumorais prostáticas. – Página 89.

Figura 18. Esquema de uma seção do TMA utilizado para avaliar a marcação da proteína TSP2 nos tecidos prostáticos. – Página 91.

Figura 19. Foto representativa mostrando a marcação heterogênea para a proteína TSP2 em amostras teciduais de CaP e HPB, no TMA utilizado. – Página 92.

Figura 20. Resolução da proteína recombinante TSP2 (recTSP2) humana por imunobot. – Página 98.

Figura 21. Figura representativa mostrando o princípio da reação imuno enzimática ELISA sanduíche, utilizada no kit *Proteome Profiler Array - Human Phospho-Kinase Array Kit* (R&D Systems). – Página 101.

Figura 22. Figura representativa mostrando a localização dos anticorpos do kit *Proteome Profiler Array - Human Phospho-Kinase Array Kit* (R&D Systems). – Página 102.

Figura 23. O tratamento com proteína recombinante TSP2 (recTSP2) humana diminui a viabilidade de linhagens de CaP. – Página 104.

Figura 24. O tratamento com proteína recombinante TSP2 (recTSP2) humana aumenta o percentual de células DU145 e PC3 em sub-G1. – Página 106.

Figura 25. Análise do perfil fosfo-proteômico das células PC3 tratadas com recTSP2. – Página 107.

Figura 26. O tratamento com proteína recombinante TSP2 (recTSP2) humana altera o nível de fosforilação relativa de determinadas proteínas nas células PC3. – Página 110.

Lista de abreviaturas, unidade de medida e fórmulas químicas

°C - graus Celsius

µg - micrograma

µL - microlitro

µM - micromolar

Adj CaP - tecido adjacente ao tumor

AIP - atrofia inflamatória proliferativa

Akt – proteína cinase B

ARE - elemento de resposta a andrógenos

AUC - área sobre a curva

CaP - câncer de próstata

cDNA - ácido desoxirribonucléico complementar

CE - célula endotelial

CO² - gás carbônico

CPRH – câncer de próstata refratário a hormonioterapia

CT – ciclo da reação que cruza a linha de base (*cycle threshold*)

D.O. - densidade ótica

DAB - diaminobenzidina

DHT – dihidrotestosterona

DNA - ácido desoxirribonucléico

DNase - desoxirribonuclease

dNTPs - desoxirribonucleotídeos trifosfato

DSPP - dentina sialofosfoproteína

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – ensaio imunoenzimático (*enzyme linked immuno sorbent assay*)

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

ERK - sinal extracelular-relacionado com cinase

FACS – separação de células ativada por fluorescência (*fluorescence-activated cell sorting*)

FCS – soro fetal de bezerro

HPB - hiperplasia prostática benigna

HRP – peroxidase de raiz-forte (*horseradish peroxidase*)

HSP - proteína de choque térmico

JNK – cinase c-Jun N-terminal

Kb - kilobases

KDa - kiloDaltons
LHRH - hormônio liberador do hormônio luteinizante
M - molar
MAPK - MAP cinase
MEC - matriz extracelular
mg - miligrama
mL - mililitro
mM - milimolar
MMP - metaloproteinase de matriz
ng - nanograma
NIP - neoplasia intra-epitelial da próstata
nm - nanômetros
NO - óxido nítrico
p27 – inibidor de cinase dependente de ciclina 1B
p53 – proteína 53
p70 S6 – proteína ribossomal S6 70kDa
PAI – inibidor do ativador de plasminogênio
PAPA - proliferação acinar pequena atípica
Pb - pares de base
PBS - salina tamponada com fosfato
PCR – reação em cadeia da polimerase
PI3K fosfatidilinositol 3-cinase
PR – prostatectomia radical
PSA – antígeno específico da próstata
PTM – modificações pós-traducionais
qRT-PCR - PCR quantitativo em tempo real
RA - receptor de androgênio
recTSP2 – TSP2 recombinante
RNA - ácido ribonucléico
RNAm - RNA mensageiro
ROC - característica de operação do receptor (*Receiver operating characteristic*)
RPM - rotações por minuto
RSK – cinase ribossomal S6
RT – radioterapia

RTS - repetições de trombospondinas
SDS - sulfato dodecil de sódio
SFB – soro fetal bovino
THBS - gene trombospondina
TMA - microarranjo de tecidos
TNM - Tumor-Nódulo-Metástase
TPA - terapia de privação do androgênio
TR - toque retal
TSP - trombospondina
VEGF - fator de crescimento vascular endotelial
WST1 – *water soluble Tetrazolium salts*

1. Introdução

1.1 . Glândula prostática

A próstata é uma glândula exócrina que faz parte do sistema reprodutor masculino, estando situada na região inferior à bexiga e sendo atravessada, em toda a sua extensão, pela uretra (Figura 1). A função da próstata humana é produzir e armazenar um fluido incolor e ligeiramente alcalino que constitui parte do volume do fluido seminal, juntamente com a secreção das vesículas seminais. A secreção das glândulas prostáticas é lançada diretamente na porção prostática da uretra, através dos ductos prostáticos.

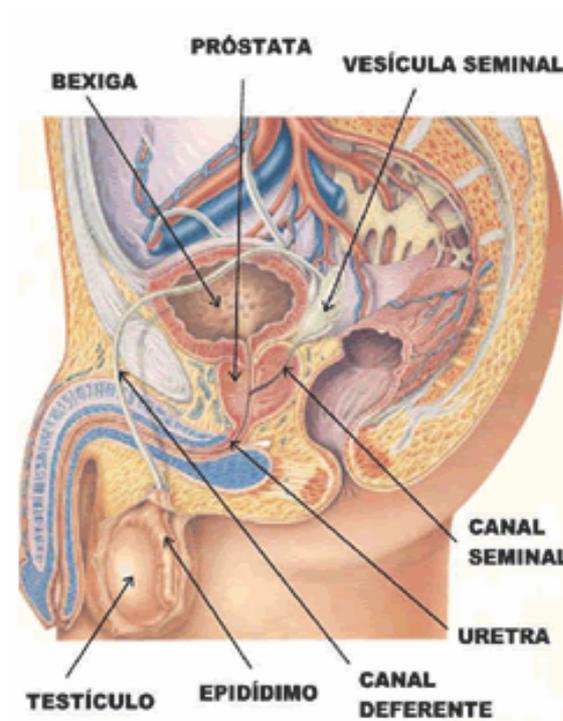


Figura 1. Esquema da localização anatômica da próstata na pelve. A próstata é uma glândula exócrina masculina localizada na região anterior ao reto e inferior à bexiga, circundando a uretra. (Retirado de [http://www.uro-oncobarretos.com.BR/v2/pros leigo/ana.html](http://www.uro-oncobarretos.com.BR/v2/pros%20leigo/ana.html)).

A glândula prostática é dividida em três zonas: a zona central, que possui 25% do volume da glândula; a zona de transição, onde se origina a maioria dos casos de hiperplasia prostática benigna (HPB); e a zona periférica, que possui 70% do volume da próstata e é o principal local de localização dos tumores malignos da próstata (Figura 2).

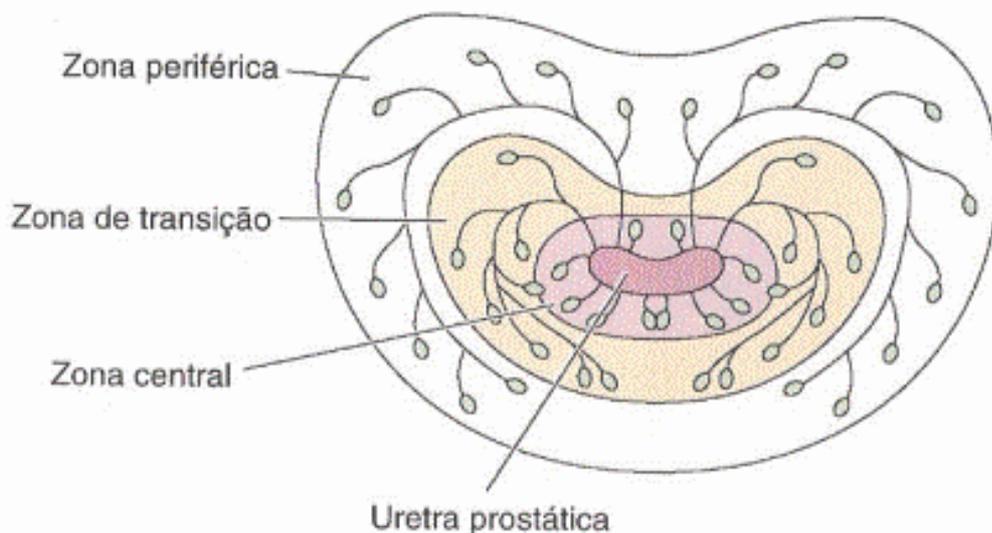


Figura 2. Esquema da anatomia da próstata, evidenciando a distribuição de suas zonas e a localização da uretra prostática. A glândula prostática é dividida, anatomicamente, entre zonas. A zona periférica é a região exterior à glândula, enquanto que a zona central é a região mais interior, isto é, que se situa entre a zona periférica e a central. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A próstata é um conjunto de glândulas túbulo-alveolares ramificadas, formadas por um epitélio cubóide ou pseudo-estratificado colunar, cercado por um estroma composto principalmente por matriz extracelular (MEC), músculo liso e fibroblastos (Figura 3). A próstata é envolvida por uma cápsula fibroelástica, cujos septos penetram na glândula, dividindo-a em quatro lobos: anterior, posterior, médio e lateral.

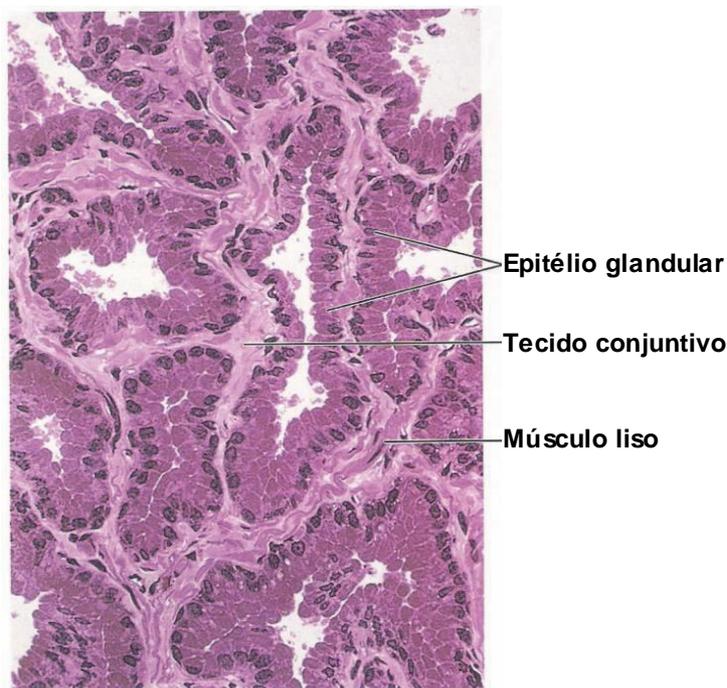


Figura 3. Figura representativa das glândulas túbulo-alveolares da próstata, envolvidas por tecido conjuntivo e músculo liso. As glândulas prostáticas são formadas pelas células epiteliais glandulares, formando os ácidos prostáticos. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

1.2. Doenças da próstata

A próstata humana pode ser acometida por algumas doenças, como a prostatite, HPB e o tumor maligno da próstata, o câncer de próstata (CaP).

A prostatite é uma síndrome comum que, geralmente, apresenta sintomas urinários e dor genito-urinária. Esta síndrome possui alta prevalência, redução substancial da qualidade de vida e recorrência frequente. Apesar de alguns casos serem conhecidamente causados por infecção bacteriana, a maioria dos casos com diagnóstico de prostatite não possui evidências de infecção bacteriana e a causa ainda é desconhecida (LIPSKY e *cols.*, 2010).

A HPB é definida como o crescimento da glândula prostática a partir da hiperplasia progressiva tanto das células estromais quanto das células prostáticas glandulares. A formação da HPB ocorre no compartimento estromal, com subsequente modulação da diferenciação e do crescimento das células epiteliais associadas. Assim, o desenvolvimento da HPB está altamente relacionado com proliferação celular dos componentes epiteliais e estromais (YAMASHITA e *cols.*, 2003). O aumento observado no número celular pode ocorrer devido à proliferação exacerbada das células estromais e epiteliais ou por comprometimento dos mecanismos de morte celular, levando a acúmulo celular. Etiologicamente, pode haver o envolvimento de andrógenos, estrógenos, interações estroma-epitélio, fatores de crescimento e neurotransmissores, separadamente ou em conjunto (ROERHBORN, 2008). A maioria dos casos de HPB é oriunda da zona de transição da próstata. Clinicamente, a HPB é caracterizada por sintomas no trato urinário inferior, associados com o crescimento benigno da próstata, o que causa obstrução da bexiga (NICKEL, 2008).

Os tumores malignos da próstata, diferentemente do HPB, acometem, principalmente, a zona periférica da próstata. O CaP pode não causar sintomas em seus estágios iniciais, sendo os mesmos mais freqüentes no caso de doença avançada ou metastática. O CaP é o tipo de tumor mais comum em homens, com exceção dos tumores de pele não-melanoma. Uma vez que o CaP é altamente associado com o aumento da idade, é esperado que a incidência desta doença aumente com o envelhecimento da população. Durante a carcinogênese da próstata, as células epiteliais são as iniciadoras da doença, adquirindo características malignas, mas as interações epitélio-estroma possuem papel fundamental na progressão do CaP (CUNHA e *cols.*, 1996, CUNHA e *cols.*, 2002; DIAW e *cols.*,

2005). Nos estágios iniciais, o CaP depende da ação de androgênio, e a terapia de privação de androgênio (TPA) induz a uma regressão tumoral inicial. Entretanto, a maioria dos pacientes de CaP desenvolve resistência a TPA e o tumor volta a crescer (NIETO e cols., 2007).

1.2.1. Câncer de próstata

O primeiro caso de CaP foi descrito em 1853, o qual foi descoberto através de análise histológica e foi descrito como uma doença muito rara (ADAMS, 1853). Atualmente, 160 anos depois, o CaP se tornou um problema de saúde altamente significativo e importante, sendo o tumor mais freqüente entre homens no Brasil e no mundo, após o câncer de pele não-melanoma. A previsão é de mais de 900.000 novos casos, por ano, no mundo (WORLD CANCER REPORT, IARC, 2008), mais de 60.000 novos casos, por ano, no Brasil (ESTIMATIVA INCA, 2012) (Figura 4) e mais de 240.000 novos casos, por ano, nos Estados Unidos da América (EUA) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012). No Brasil, existe um risco estimado de 62 casos novos a cada 100 mil homens (ESTIMATIVA INCA, 2012).

Histologicamente, o CaP é caracterizado por heterogeneidade e multifocalidade, ocorrendo justaposição de glândulas normais, lesões neoplásicas precursoras e lesões neoplásicas com vários graus de diferenciação (DEUTSCH e cols., 2004). No desenvolvimento e ao longo da progressão da doença, ocorre desregulação de inúmeros receptores celulares, oncogenes e genes supressores de tumor, e a sinalização pelos andrógenos possui papel regulatório fundamental.

Clinicamente, o CaP também é considerado uma doença bastante heterogênea, podendo variar desde uma doença indolente até uma doença altamente agressiva, com formação de metástases pelo organismo, dependendo da sua progressão. As metástases do CaP são mais comumente encontradas nos ossos, linfonodos, fígado e pulmões (BUBENDORF e cols., 2000). As metástases ósseas ocorrem em, aproximadamente, 90% dos pacientes com doença avançada e são a causa principal da morbidade e mortalidade do CaP.

Localização primária	casos novos	percentual	
Próstata	60.180	30,8%	Homens 
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%	
Cólon e Reto	14.180	7,3%	
Estômago	12.670	6,5%	
Cavidade Oral	9.990	5,1%	
Esôfago	7.770	4,0%	
Bexiga	6.210	3,2%	
Laringe	6.110	3,1%	
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%	
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%	

Figura 4. Estimativa da incidência de câncer na população brasileira masculina para o ano de 2012. (Estimativa INCA, 2012).

1.2.1.1. Epidemiologia

Atualmente, cerca de 75% dos casos de CaP, no mundo, estão presentes em países desenvolvidos. A taxa de incidência mundial vem crescendo, sendo as mais altas observadas na Austrália, Nova Zelândia, Europa Ocidental e América do Norte. Uma das causas deste aumento foi a introdução do rastreamento por meio do teste do Antígeno Prostático Específico (PSA). No Brasil, o aumento da incidência também pode ser explicado pelo aumento da expectativa de vida, pelo aprimoramento dos métodos diagnósticos e pela melhoria da qualidade dos sistemas de informação do país.

A idade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do CaP. A média de idade dos pacientes no momento do diagnóstico do CaP é de, aproximadamente, 70 a 75 anos, com cerca de 85% dos diagnósticos ocorrendo em homens com mais de 65 anos. O CaP é pouco incidente em homens com menos de 50 anos de idade (GRONBERG, 2003).

Além disso, a etnia também é considerada fator de risco para esse tipo de neoplasia, sendo a incidência do CaP bastante variável, dependendo do país e da população étnica. As menores taxas de incidência são encontradas nos países asiáticos e as maiores taxas encontradas na América do Norte, especialmente em indivíduos afro-americanos nos EUA (POWELL, 2007). Estudos de migração populacional mostram que, quando indivíduos japoneses se mudam do Japão para os EUA, a incidência do CaP aumenta nesses indivíduos, mas, ainda assim, é menor

do que nos indivíduos nativos dos EUA (RIES e cols., 2002). Estas diferenças podem ser explicadas por uma combinação de fatores, como susceptibilidade genética, exposição a fatores de risco externos, acesso e qualidade do sistema de saúde, além da exatidão dos registros de câncer.

Outro fator de risco para o CaP é o histórico familiar. Cerca de 10-15% dos pacientes com CaP possuem pelo menos um familiar que também é afetado pela neoplasia (HAYES e cols., 1995; WHITTEMORE e cols., 1995) e parentes de primeiro grau de pacientes com CaP possuem risco de 2 a 3 vezes maior de desenvolver a doença.

A mortalidade por esse tipo de neoplasia apresenta crescimento semelhante ao da sua incidência no Brasil, porém o CaP pode ser considerado um câncer de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado precoce e adequadamente. A mortalidade do CaP é relativamente baixa, se comparada com o número total de casos diagnosticados. Assim, a maioria dos pacientes morre com a doença, ao invés de morrer por consequência da doença (NELSON e cols., 2008). A mortalidade do CaP está associada à doença agressiva e a formação de metástases.

1.2.1.2. Diagnóstico

Nas últimas décadas, o aspecto mais importante do CaP, com relação ao seu diagnóstico, foi a mudança de perfil de uma doença que se apresentava tardiamente, com tumor localmente avançado e metastático, para uma doença que, atualmente, é descoberta por rastreamento ou acidentalmente, nos estágios mais precoces. Os grandes responsáveis por esta mudança foram a introdução da dosagem do PSA sérico como ferramenta para rastreamento e a realização da biópsia guiada por ultra-sonografia transretal para o diagnóstico.

Atualmente, o diagnóstico do CaP é feito utilizando-se os seguintes métodos: exame de toque retal (TR), dosagem sérica do PSA e ultra-sonografia transretal com biópsia.

O exame de TR é o teste primário para o acesso clínico inicial da próstata e foi o primeiro teste de rastreamento a ser utilizado para o CaP, sendo ainda usado rotineiramente, juntamente com o teste do PSA. Este exame possui a vantagem de detectar os tumores que não secretam PSA (BORLEY; FENELEY, 2009) e seu valor preditivo é de 50% (STONE e cols., 1994). Entretanto, o TR possui baixa reprodutibilidade e, geralmente, detecta o CaP em estágios mais avançados.

Aproximadamente 60% dos homens diagnosticados somente pelo TR possuem metástases no momento em que o diagnóstico é confirmado (BUNTING, 2002).

Antes do uso do PSA, 75% dos homens diagnosticados com CaP, somente através do TR, morriam dessa doença (GANN e *cols.*, 1995).

A introdução da dosagem sérica do PSA como teste de rastreamento do CaP levou a alterações na incidência e distribuição da doença. Apesar de o PSA ter se tornado o teste padrão para a detecção do CaP em estágios iniciais, ainda há muitas discussões acerca do seu uso como ferramenta de rastreamento ou acerca do dano ou benefício mais amplo que um programa de rastreamento de CaP pode trazer. O teste do PSA é simples, seguro e amplamente aceito, mas não é tão eficiente, devido a sua alta taxa de resultados falso-positivos (BORLEY; FENELEY, 2009). O PSA é uma serino protease produzida pelas células da glândula prostática e encontra-se presente em grandes quantidades nas secreções prostáticas (WANG e *cols.*, 1979). Como biomarcador, é órgão específico, mas não câncer específico, e também adquiriu utilidade como marcador de tumores epiteliais benignos (ANDRIOLE e *cols.*, 2004).

A faixa de normalidade para o valor do PSA sérico foi atribuída a valores menores que quatro ng/mL. Os dois sinais principais para a detecção do CaP são a presença de nódulo no exame TR e valor do PSA sérico acima de 4 ng/mL. Qualquer um destes achados é suficiente para se indicar a biópsia transretal. Entretanto, atualmente, a detecção do CaP está se tornando mais sensível e focos de câncer cada vez menores estão sendo diagnosticados. Os urologistas, algumas vezes, usam o valor de PSA sérico de 2,5 ng/mL como ponto de corte para a indicação da biópsia (GILBERT e *cols.*, 2005). Homens com níveis de PSA entre 2,5 ng/mL e 4,0 ng/mL e entre 4,1 ng/mL e 10,0 ng/mL possuem taxas de detecção de CaP de 25% e 34%, respectivamente (BABAIAN e *cols.*, 2001). Assim, a utilização de pontos de corte menores para o valor sérico de PSA detectaria o CaP em um número substancial de homens, mas também levaria a um aumento no número de biópsias desnecessárias. O mais novo teste alternativo para o diagnóstico do CaP, uPM3, que utiliza a detecção do RNA mensageiro (RNAm) do gene PCA3/DD3, é menos invasivo e mais sensível que o teste do PSA, representando uma alternativa promissora (NEVES e *cols.*, 2012; GITTELMAN e *cols.*, 2013).

A ultra-sonografia transretal possibilita a visualização da próstata e das vesículas seminais, mas não é a ideal para a detecção do CaP nos estágios iniciais.

Para o diagnóstico, a ultra-sonografia transretal é utilizada devido a sua capacidade de guiar as agulhas utilizadas na biópsia e mapeá-las dentro das regiões específicas da próstata. As indicações para a biópsia são: alterações no exame TR, dosagem de PSA elevado, biópsias prévias mostrando neoplasia intra-epitelial da próstata (NIP) ou proliferação acinar pequena atípica (PAPA), além de monitoramento, após o tratamento primário do CaP.

1.2.1.3. Classificação histopatológica

O CaP é, geralmente, multifocal e heterogêneo (MACINTOSH e *cols.*, 1998), sendo 70% dos tumores originários da zona periférica, 15 a 20% originários da zona central e 10 a 15% originários da zona transicional. A maioria dos tumores na próstata é do tipo adenocarcinoma. Atualmente, há dois sistemas para a classificação do CaP: o sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM), que avalia localização e tamanho do tumor e refere-se a sua extensão no sistema, e o sistema de graduação de Gleason, que descreve o grau de diferenciação tumoral, de acordo com características histológicas microscópicas.

O sistema de estadiamento TNM é um dos determinantes da evolução tumoral, de acordo com o sistema tumor-nódulo-metástase (QIAN e *cols.*, 1997), e avalia o crescimento tumoral local (T), linfonodal (N) ou metastático (M) (Figura 5). Os tumores classificados como T1 são pequenos e não aparentes, não podem ser detectados durante o exame TR. Os tumores T1 são os tumores diagnosticados através de ressecção transuretral ou biópsia. A não ser que haja presença de metástases, o estadiamento definitivo só pode ser determinado na prostatectomia. Os tumores T2 são confinados a próstata e podem ser subdivididos em a, b e c. Os tumores T3 possuem espalhamento para tecidos adjacentes à próstata, com os tumores 3a indicando extensão para o tecido extra-prostático, 3b indicando espalhamento unilateral para a vesícula seminal e 3c indicando espalhamento bilateral para a vesícula seminal. Já os tumores T4 são caracterizados por terem invadido ou estarem fixados em um órgão próximo a próstata, como a bexiga ou o reto. A extensão para os linfonodos é aferida pelo patologista, de acordo com a categoria N, com N0 significando que não há envolvimento e N1 denotando envolvimento dos linfonodos pélvicos ou inguinais. A categoria M caracteriza a existência de metástases, com M0 significando que não há metástases e M1 significando que há presença de metástase no tecido ósseo, no pulmão, no fígado

ou no cérebro, em geral (TNM CLASSIFICATION OF MALIGNANT TUMOURS, 2002) (Figura 5).

O sistema de graduação do CaP é baseado no sistema de Gleason, uma medida de escala que avalia o grau de diferenciação tumoral e a anaplasia celular (GLEASON; MELLINGER, 1974), que leva em consideração as características da arquitetura tumoral, como variações de tamanho, forma e propriedades de marcação celulares. Este sistema diferencia as células de acordo com sua diferenciação. O grau de Gleason 1 é dado para as células bem diferenciadas, que se parecem ao máximo com células normais. O grau de Gleason 5 é dado para as células menos diferenciadas. O grau de Gleason primário é designado de acordo com o padrão mais frequentemente observado e o grau secundário de acordo com o segundo padrão mais frequentemente encontrado, podendo os mesmos ser iguais ou diferentes. O escore de Gleason é obtido pela soma dos graus primário e secundário e pode variar de 2 a 10. Escore de Gleason de 2 a 4 é considerado de baixo grau, o escore de 5 a 7 é considerado de grau moderado e o escore de 8 a 10 é considerado de alto grau tumoral, sendo pouco diferenciado. Como os graus de Gleason 1 e 2 quase nunca são usados e o grau 5 é raro, a maioria dos tumores possui escore 7 (3 + 4 ou 4 + 3) (Figura 6).

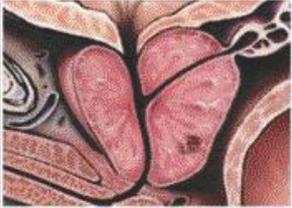
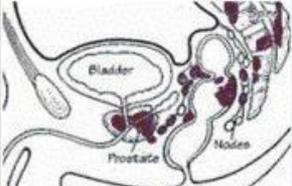
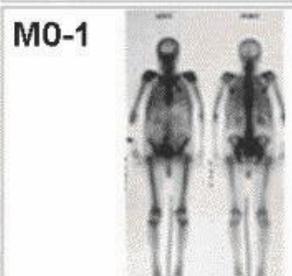
T1	T2	T3	T4
			
<p>T1 - Tumor clinicamente não palpável ou visível por método de imagem.</p> <p>T1a - Tumor incidental - achado histopatológico em $\leq 5\%$ do tecido de ressecção.</p> <p>T1b - Tumor incidental - achado histopatológico em $>5\%$ do tecido de ressecção.</p> <p>T1c - Tumor identificado por biópsia por agulha (PSA elevado).</p>	<p>T2 - Tumor confinado à próstata.</p> <p>T2a - Tumor engloba metade de um dos lobos ou menos.</p> <p>T2b - Tumor engloba mais da metade de um lobo, mas não os dois lobos.</p> <p>T2c - Tumor engloba ambos lobos.</p>	<p>T3 - Tumor além da cápsula prostática.</p> <p>T3a - Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral).</p> <p>T3b - Tumor envolve a vesícula seminal (uma ou ambas).</p>	<p>T4 - Tumor fixo ou invadindo estruturas adjacentes além das vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores ou parede pélvica.</p>
<p>N0-3</p> 	<p>M0-1</p> 	<p>N - Envolvimento linfonodal regional.</p> <p>Nx - Linfonodos regionais não avaliados.</p> <p>N0 - Sem metástases para linfonodos regionais.</p> <p>N1 - Metástases linfonodais regionais.</p> <p>M - Metástases à distância.</p> <p>Mx - Metástases à distância não avaliadas.</p> <p>M0 - Ausência de metástase à distância.</p> <p>M1 - Metástase a distância.</p> <p>M1a - Linfonodos não-regionais.</p> <p>M1b - Ossos.</p> <p>M1c - Outros órgãos.</p>	

Figura 5. Estadiamento patológico do CaP, de acordo com o sistema TNM, que avalia a localização e o espalhamento do tumor. O sistema de estadiamento TNM é um dos determinantes da evolução tumoral e avalia o crescimento tumoral local (T), linfonodal (N) ou metastático (M). Os tumores classificados como T1 são pequenos e não aparentes, não podem ser detectados durante o exame TR, diagnosticados através de ressecção transuretral ou biópsia. Os tumores T2 são confinados a próstata e podem ser subdivididos em a, b e c. Os tumores T3 possuem espalhamento para tecidos adjacentes à próstata. Já os tumores T4 são caracterizados por terem invadido ou estarem fixados em um órgão próximo a próstata, como a bexiga ou o reto. Na categoria N, avalia-se o envolvimento de linfonodos, com N0 significando que não há envolvimento e N1 denotando envolvimento dos linfonodos pélvicos ou inguinais. A categoria M caracteriza a existência de metástases, com M0 significando que não há metástases e M1 significando que há presença de metástase. (Adaptado de <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/kaiser-simone-2004-06-10/HTML/>).

	①	Glândulas pequenas e uniformes, com poucas alterações nucleares
	②	Ácinos de tamanho mediano, ainda separados pelo estroma, mas mais próximos.
	③	O grau de Gleason mais comum das biópsias de CaP, com variação marcante de tamanho e organização das glândulas, com infiltração do estroma e tecidos adjacentes.
	④	Células marcadamente atípicas, com extensa infiltração do tecido adjacente.
	⑤	Camadas de células tumorais indiferenciadas.

Figura 6. Sistema de graduação do CaP através do sistema de Gleason. O sistema de Gleason é uma medida de escala que avalia o grau de diferenciação tumoral e a anaplasia celular que leva em consideração as características da arquitetura tumoral, como variações de tamanho, forma e propriedades de marcação celulares. O grau de Gleason 1 é dado para as células bem diferenciadas, que se parecem ao máximo com células normais. O grau de Gleason 5 é dado para as células menos diferenciadas. (Adaptado de GLEASON; MELLINGER, 1974).

1.2.1.4. Tratamento

A escolha para o tratamento do CaP é crucialmente dependente de como a doença se apresenta (HEIDENREICH e *cols.*, 2011), além de alguns outros fatores, como a presença de co-morbidades e preferências do paciente.

O CaP localizado ou localmente avançado pode ser efetivamente tratado e até curado através da prostatectomia radical (PR), uma cirurgia que remove completamente a próstata, as vesículas seminais, as extremidades do canal deferente e, dependendo das considerações oncológicas, a gordura, os nervos e os vasos sanguíneos adjacentes (BERGLUND e *cols.*, 2006).

A radioterapia (RT) também é uma opção para o tratamento destes pacientes. A RT pode ser externa, indicada para pacientes com contraindicação à cirurgia, ou intersticial, denominada braquiterapia, realizada através da implantação de sementes radioativas, indicada para pacientes com bom prognóstico (D'AMICO e *cols.*, 1998).

Além disso, também existe a opção de observação vigilante dos pacientes com CaP localizado. Esta é uma estratégia tradicional usada em pacientes idosos, quando não há mais possibilidade de intervenções, ou em pacientes jovens com bom prognóstico (escore de Gleason <6). Nesta estratégia, ao invés de se iniciar imediatamente um tratamento curativo, é realizado um programa de vigilância, consistindo de repetições, em intervalos regulares, da dosagem do PSA sérico, do exame do TR e da biópsia. A observação vigilante é o monitoramento atento à condição do paciente, o qual não é tratado com nenhum método curativo, até que algum sintoma apareça ou se modifique. Se não houver nenhuma alteração da próstata, o paciente é poupado dos efeitos dos tratamentos curativos (KLOTZ, 2006).

Entretanto, de 10 a 20 % dos homens com CaP apresentam doença metastática ao diagnóstico, e de 20 a 30 % dos pacientes diagnosticados com CaP localizado vão eventualmente desenvolver metástases. Pacientes com doença metastática são tratados com TPA, ou hormonioterapia. Esta terapia remove ou bloqueia a ação dos andrógenos, impedindo o crescimento das células tumorais da próstata (KAWAKAMI e cols., 2006; HORI e cols., 2011) e é a principal opção de terapia destes pacientes. A TPA envolve a utilização de fármacos relacionados com o hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), como fármacos agonistas, que previnem que os testículos produzam testosterona; ou fármacos antagonistas, que bloqueiam a ação dos andrógenos; ou castração química, com fármacos que previnem que as glândulas adrenais produzam andrógenos. Outra opção na TPA é a orquiectomia, ou castração cirúrgica, um procedimento que remove os testículos, a maior fonte dos hormônios masculinos, resultando numa diminuição de 90 a 95 % dos níveis circulantes de testosterona.

Porém, a maioria dos pacientes desenvolve doença progressiva, denominada CaP refratário a hormonioterapia (CPRH). Esta doença aparece, apesar dos baixos níveis de andrógenos (níveis de testosterona < 50 ng/mL), e após um tempo de 18 a 24 meses respondendo à terapia (HAMBERG e cols., 2008; STERNBERG, 2008). Apesar de manipulações hormonais secundárias, incluindo a utilização da anti- andrógenos e agentes supressores de andrógenos como cetozonazol, poderem beneficiar alguns pacientes com CPRH metastático, este benefício é, geralmente, por curto período (BRACARDA e cols., 2011; MOTTET e cols., 2011). Estudos recentes vêm trazendo novas promessas para o tratamento do CPRH. Atualmente, docetaxel é o agente de primeira linha para o tratamento do CPRH, por aumentar a expectativa de vida dos pacientes. Entretanto, também

ocorre desenvolvimento de resistência ao tratamento com docetaxel e, nestes casos, a alternativa é o tratamento com cabazitaxel, um taxano que prolonga a sobrevivência geral de pacientes com CPRH. Outros agentes utilizados incluem abiraterona, uma molécula inibidora seletiva da biossíntese de androgênio, e sipuleucel-T, um tipo de vacina terapêutica contra o CPRH, que é capaz de induzir respostas imunológicas celulares através da introdução de células mononucleares, de sangue periférico, autólogas que foram ativadas *ex vivo* (MALUF e cols., 2012).

1.2.1.5. Fatores genéticos e alterações genômicas

Apesar da incidência do CaP ser alta em determinadas populações, sua causa ainda é indeterminada. Entretanto, sabe-se que o CaP é uma doença heterogênea com múltiplos fatores genéticos e ambientais envolvidos em sua etiologia. Uma das causas apontadas para o surgimento do CaP é a herança genética, relacionada com alguns genes que possuem alta penetrância, enquanto outros genes apresentam polimorfismos e baixa penetrância. Muitos genes estão associados com o desenvolvimento do CaP esporádico e, em particular, o CaP hereditário, incluindo os genes HPC1/RnaseL (1q25.3), ELAC2 (17p11), MSR1 (8p22–23), HPCX (Xq27–28), HPC20 (20q13), BRCA1 (17q21) e BRCA2 (13q12–13) (KRAL e cols., 2011).

Alterações genômicas com potencial envolvimento no CaP incluem mutações somáticas, deleções ou amplificações gênicas e rearranjos cromossômicos. Estas alterações são, provavelmente, acumuladas ao longo de décadas. Com relação a mutações e polimorfismos associados ao CaP, dados mostram que uma mutação pontual no gene BRCA2 pode aumentar o risco de CaP, estando associada com 5% dos casos de CaP em homens com menos de 55 anos (EDWARDS; EELES, 2004). Também já foram relatados casos de polimorfismo nos genes do receptor de androgênio (RA), da 5 α -redutase tipo 2 e do esteróide hidroxilase (KOPPER; TIMAR, 2005) associados com a presença de CaP.

Estudos sobre as alterações moleculares que possuísem papéis potenciais no desenvolvimento do CaP identificaram algumas anormalidades cromossômicas frequentes, como ganho de material genético nos cromossomos 7p, 7q, 8q e Xq e perda de material em 8p, 10q, 13q e 16q (ASHELTER e cols., 2012).

Dados da literatura evidenciam que translocações cromossômicas envolvendo Tmprss2, um gene que codifica uma protease transmembrana regulada pelo PSA

e responsivo ao androgênio, e membros da família de fatores de transcrição ETS (ERG, ETV1, ETV4 ou ETV5) estão presentes em mais de 60% dos casos de CaP localizado e metastático e em 20% dos casos de NIP (TOMLINS e cols., 2005). As proteínas ETS cooperam com outros fatores de transcrição na regulação de várias funções celulares, como proliferação, diferenciação, angiogênese e apoptose. O gene ERG é o parceiro mais comum de fusão com TMPRSS2, estando esta fusão presente em, aproximadamente, 50% dos casos de CaP (MOSQUERA e cols., 2009). A fusão TMPRSS2–ERG pode ocorrer através da deleção da região entre os genes ERG e TMPRSS2, ambos no cromossomo 21, ou através da translocação da região entre os genes para outro cromossomo (PERNER e cols., 2006). Translocações envolvendo outros membros da família ETS ocorrem mais raramente.

Acredita-se que, durante a evolução do CaP e o desenvolvimento do CPRH, ocorra o acúmulo de múltiplas alterações genéticas. Vários tipos de aberrações genéticas foram identificados, incluindo mutações, deleções, alteração do número de cópias de genes e fusões gênicas, tanto em oncogenes, como C-MYC, BCL-2 e ERG, quanto em genes supressores de tumor, como PTEN, NKX3-1 e p53 (AHMED; LI, 2012). Especula-se que algumas destas alterações sejam mudanças adaptativas em resposta a privação de androgênio, enquanto que outras são eventos iniciais que facilitam a iniciação tumoral e sua subsequente progressão.

Conforme apresentado, a alta variabilidade da doença, os vários fatores epidemiológicos envolvidos e a idade avançada ao diagnóstico dificultam a identificação de um bom biomarcador para o CaP (SIMARD e cols., 2003).

1.2.1.6. Lesões pré-malignas e carcinogênese

A carcinogênese do CaP acontece em uma série de etapas morfológicas e genéticas. A primeira delas é a formação do NIP de alto grau, no qual o epitélio acinar é citologicamente maligno e, usualmente, estratificado. Entretanto, no NIP, ainda existe a manutenção da camada de células basais. A ruptura da continuidade da camada de células basais e da membrana basal é essencial para a progressão do NIP de alto grau para o adenocarcinoma invasivo da próstata. Evidências científicas foram geradas entre a associação do NIP de alto grau como uma lesão pré-maligna e precursora do CaP, como a associação espacial (< 2mm) do NIP de alto grau e o CaP (BRAWER, 1992), a presença do NIP de alto grau em 53%

dos casos de CaP (BOSTWICK e *cols.*, 1995), concordância do conteúdo de DNA por análise de ploidia entre NIP de alto grau e CaP invasivo (WEINBERG; WEIDNER, 1993), assim como outras manifestações de instabilidade genética, como perda alélica (BOSTWICK, 1995). Assim, quando se encontra NIP de alto grau isolado, é recomendado que se façam novas biópsias e que se tenha uma observação mais intensa do paciente, pois achados de NIP de alto grau nas biópsias aumentam em 30 a 40% a chance de se encontrar uma lesão de CaP em uma biópsia subsequente (BORLEY; FENELEY, 2009).

Há evidências para o envolvimento de outra lesão, a atrofia inflamatória proliferativa (AIP), como precursora do CaP, porém tais evidências são menos definitivas e ainda controversas. Na AIP, são encontradas alterações de expressão de proteínas do ciclo celular, menor expressão de p27, com menor taxa de apoptose e aumento de expressão de BCL-2 (DEMARZO e *cols.*, 2003), e elevação do marcador de proliferação Ki-67 (FAITH e *cols.*, 2005). Também foi encontrada uma associação positiva de AIP em amostras provenientes de prostatectomia com CaP (TOMAS e *cols.*, 2007). Entretanto, a associação espacial de AIP com o carcinoma não foi tão forte quanto a associação de CaP com NIP de alto grau (PUTZI; DEMARZO, 2000). Além disso, análise de expressão gênica da AIP mostrou um perfil mais próximo do epitélio benigno do que do epitélio tumoral. Tal achado poderia indicar que esta lesão ocorre de maneira precoce ou seria irrelevante para a tumorigênese (TOMLINS e *cols.*, 2007).

1.2.1.7. Evolução do CaP

O crescimento do CaP está diretamente relacionado com a razão entre células proliferando e células morrendo. Os andrógenos são os maiores reguladores dessa razão, tanto por estimularem a proliferação celular quanto por inibirem a apoptose. O andrógeno que possui maior ação é a testosterona, o principal andrógeno produzido pelo corpo, e é predominantemente liberada pelas células de Leydig dos testículos (RADMAYR e *cols.*, 2008), mas pequenas quantidades também são produzidas nas glândulas adrenais. A testosterona circula pela corrente sanguínea ligada a albumina e a globulinas ligadoras de hormônios sexuais, com uma pequena quantidade livre no soro. Quando a testosterona livre entra nas células prostáticas, sua maior parte é convertida a dihidrotestosterona (DHT) pela 5 α -redutase.

Para a proliferação e crescimento das células prostáticas, o RA possui papel fundamental. O RA, em seu estado basal, encontra-se ligado, principalmente, a proteínas de choque térmico (HSP), o que impede sua ligação ao DNA. A sua ligação a andrógenos induz mudanças conformacionais que levam à dissociação das HSPs e a fosforilação do RA. Após a dissociação do RA das HSPs, o RA pode interagir com os co-reguladores, tais como ARA-70, filamina-A e importina- α , que então se liga ao sinal de localização nuclear do RA. Essas interações promovem a localização nuclear do RA e sua consequente dimerização nuclear. Os complexos de homodímeros do RA se ligam aos elementos de resposta a andrógenos (AREs) na região promotora dos genes alvos. Juntamente com a ligação de moléculas co-regulatórias, que permitem a interação com o aparato basal de transcrição, a transcrição do gene alvo é inibida ou ativada, dependendo do gene em questão. Algumas destas interações com moléculas co-regulatórias são responsáveis pela modificação do receptor a nível pós-traducional, modulando a sua atividade. Especificamente, a atividade de modulação do RA por modificações pós-traducionais (PTMs) pode levar a regulação da estabilidade da proteína, interação com outras proteínas, alteração da sua localização celular e da estrutura do próprio receptor. Vários genes são regulados pelo RA, incluindo KLK3, que codifica o PSA (Figura 7) (COFFEY; ROBSON, 2012).

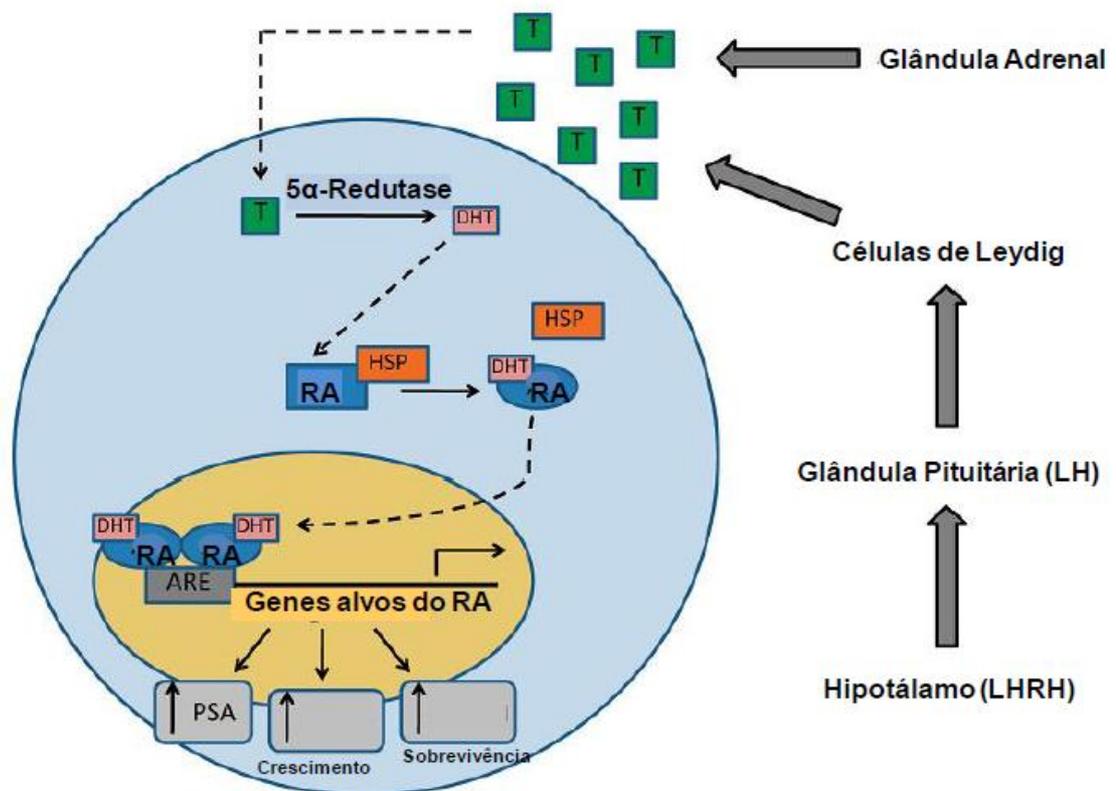


Figura 7. Mecanismos da via de ação do androgênio e do receptor de androgênio (RA) em células da próstata. A testosterona (T), o principal andrógeno produzido pelo corpo, é, predominantemente, liberada pelas células de Leydig dos testículos, mas pequenas quantidades também são produzidas nas glândulas adrenais. A testosterona livre entra nas células da próstata e é convertida a dihidrotestosterona (DHT) pelas 5 α -redutase. A ligação de DHT ao receptor de androgênio (RA) induz a sua dissociação das proteínas de choque térmico (HSPs) e a fosforilação do receptor. O RA dimeriza e pode se ligar a elementos de resposta ao androgênio (ARE) na região promotora de seus genes alvos. A ativação de genes alvos leva a respostas biológicas, como aumento do PSA e da proliferação e sobrevivência celulares. LH - hormônio luteinizante; LHRH - hormônio liberador do hormônio luteinizante; PSA – antígeno específico da próstata. (Adaptado de SARAON e cols., 2011)

As células tumorais do CaP primário retêm a característica das células prostáticas normais de serem dependentes do androgênio, respondendo, assim, à retirada do androgênio com parada do crescimento celular e apoptose. Após a resposta inicial à TPA, todas as células do CaP metastático eventualmente retomam seu crescimento e progridem a um estado resistente à castração, não sendo mais responsivas e tornando-se cada vez mais agressivas, desenvolvendo o CPRH e podendo levar a formação de metástases (Figura 8).

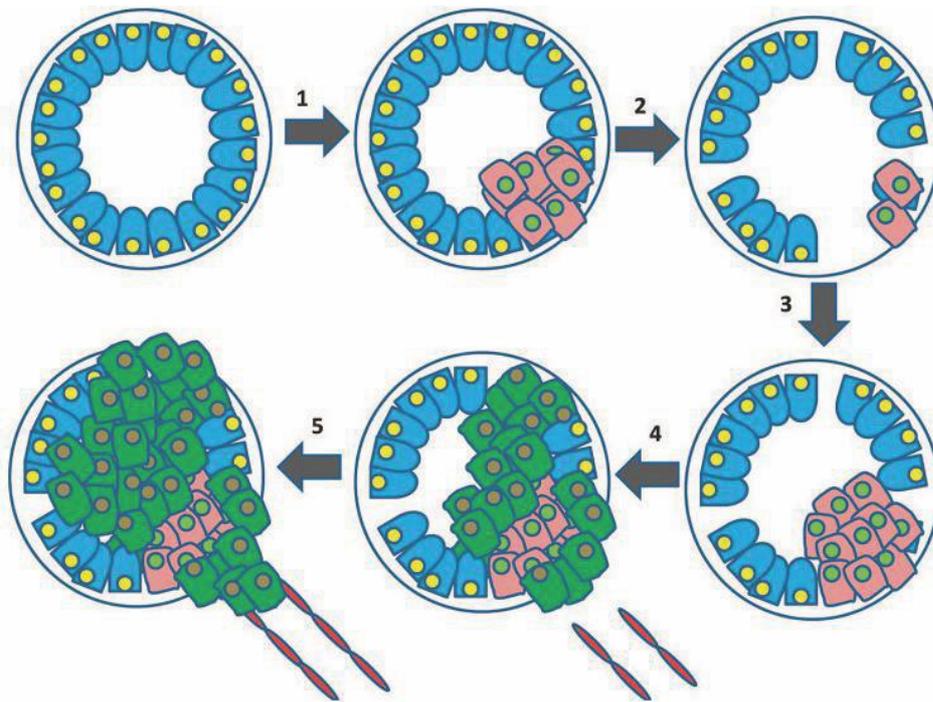


Figura 8. Esquema de corte transversal da glândula prostática evidenciando as etapas de progressão do câncer de próstata (CaP) para câncer de próstata refratário ao hormonioterapia (CPRH). 1 - Vários processos tumorigênicos ocorrem, nos quais algumas células da próstata proliferam fora de controle. 2 - Células de CaP são inicialmente andrógeno dependentes, portanto, a terapia de privação de androgênio é bem sucedida em destruir as células tumorais. 3 – Algumas células são capazes de sobreviver a este tratamento e continuam a proliferar. 4 - As células são agora independentes de andrógenos e obtêm alterações subsequentes, além de ocorrerem alterações e comprometimento do estroma, que interage com o epitélio, resultando em aumento da angiogênese, dentre outras alterações. 5 – CPRH começa a metastatizar para locais distantes. (Adaptado de SARAON e cols., 2011)

Entretanto, estudos mostraram que o CPRH continua a depender do androgênio e da função do RA para seu crescimento e sobrevivência, através de diversos mecanismos, apesar dos baixos níveis de testosterona (TAPLIN; BALK, 2004; ATTARD e cols., 2009). Torna-se claro que a biossíntese do androgênio e a função do RA estão significativamente alteradas no CPRH, com o objetivo final de otimização da utilização do fornecimento limitado de androgênio. A resposta que se observa do CPRH a manipulações hormonais secundárias, como os inibidores de síntese de androgênio e os bloqueadores do RA de segunda geração favorecem esta afirmação. Muitos modelos têm sido propostos para alteração desta cascata de sinalização, incluindo a amplificação e mutação do gene do RA, alterações nas concentrações dos co-reguladores do RA, alterações nas vias esteroidogênicas, e a ativação de um modo independente do ligante, através da ativação de vias não convencionais, ocorrendo ativação por fatores de crescimento, citocinas, receptores tirosina cinase e via de Wnt. Os mecanismos discutidos até agora são dependentes do RA e sua cascata de sinalização (Figura 9). No entanto, outras vias podem também estar envolvidas na progressão para CPRH. Essas vias foram consideradas

vias alternativas, porque são definidas como vias completamente independentes da sinalização do RA. É interessante notar que muitos dos caminhos não convencionais mencionados anteriormente, que ativam a sinalização do RA de um modo independente do ligante, podem também agir como vias alternativas (FELDMAN; FELDMAN, 2001; SARAON e *cols.*, 2011). Fatores de crescimento, como IGF-1 e seus respectivos receptores tirosina cinase, podem ativar uma cascata de transdução de sinais que induz a expressão de vários genes responsáveis pela promoção do crescimento e sobrevivência celulares. Muitas destas vias ativam cinases críticas, tais como MAPK/Ras/Raf/PKC, que influenciam regulação do ciclo celular e aumento da proliferação celular através da ativação de vários fatores de transcrição, como AP1, c-MYC e NF- κ B (EDWARDS; BRATLETT, 2005).

Também vêm sendo descritas alterações epigenéticas, especialmente metilação e modificação de histonas, relacionadas com a progressão do CaP. A hipermetilação do gene do RA foi associada com CPRH e CaP metastático. O silenciamento do gene do RA por meio de metilação do DNA sugere um mecanismo alternativo que conduziu à independência de androgênio em um subgrupo de pacientes com CaP avançado. Além disso, a modulação epigenética de vários genes envolvidos no controle do ciclo celular, invasão celular, reparação de danos ao DNA, em genes supressores de tumor e oncogenes vem sendo demonstrada em amostras e linhagens de CaP. Os genes mais importantes que já foram identificados como epigeneticamente alterados incluem CDKN2A, CDH1, CD44, MGMT, RASSF1A, MDR/TAP, ABCB1, APC e GSTP1 (LI e *cols.*, 2004; LI e *cols.*, 2005).

A regulação de miRNAs é outro mecanismo que pode ter um impacto na progressão do CaP. Estes pequenos RNAs não codificadores podem regular a expressão gênica de maneira pós-transcricional. Estão associados com a progressão do CaP os miRNAs: miR-221, miR-222 e miR-125b, que estão superexpressos; e o miR-146, que se encontra menos expresso, ao longo da progressão do CaP (COPPOLA e *cols.*, 2010; SEVLI e *cols.*, 2010).

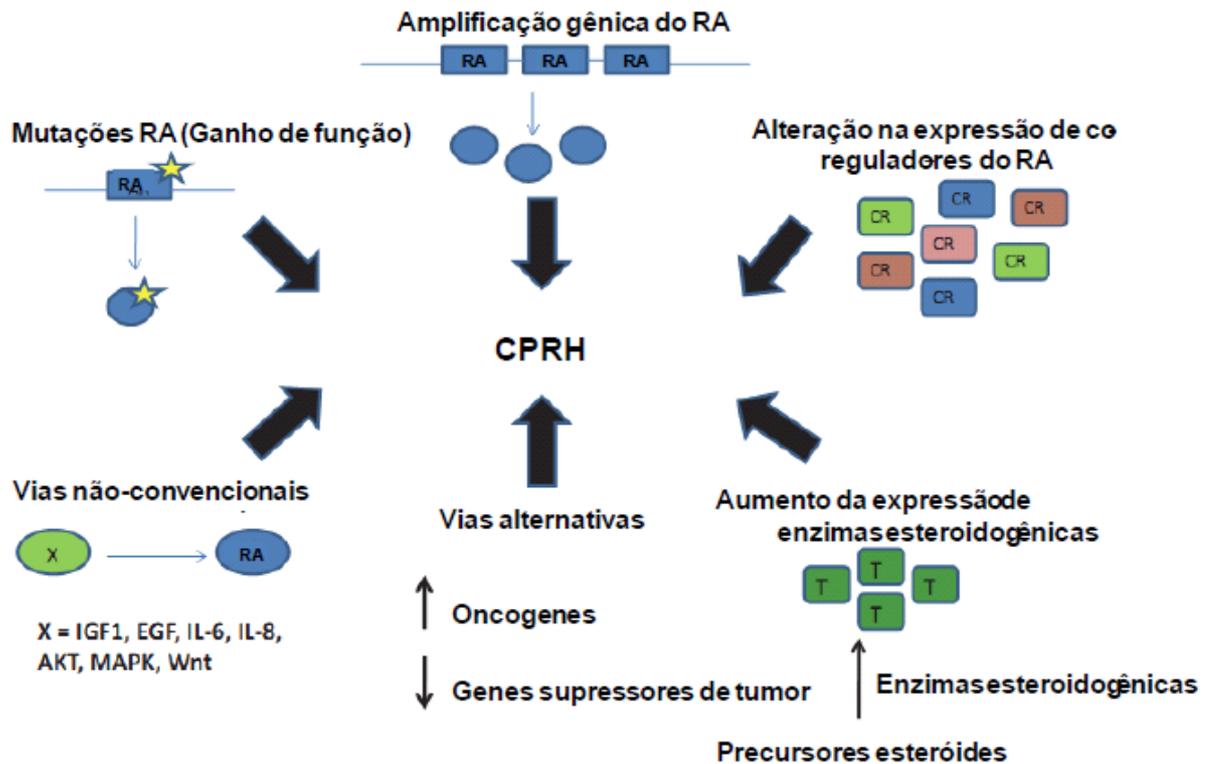


Figura 9. Mecanismos relacionados com o desenvolvimento do câncer de próstata refratário a hormonioterapia (CPRH). O CPRH pode surgir a partir de muitas mudanças celulares e moleculares. A via de sinalização do RA é a via mais comumente estudada no contexto do CPRH. Esta via tem sido mostrada aberrantemente desregulada em vários níveis, incluindo amplificações e mutações gênicas, e alterações na expressão de co-reguladores do RA ou de enzimas esteroidogênicas. Também ocorre ativação do RA de maneira independente de ligante, através de vias não convencionais, ocorrendo ativação por inúmeras proteínas diferentes. Além disso, vias independentes do RA, ou vias alternativas, também foram implicadas no desenvolvimento do CPRH. CR – co-reguladores; T - testosterona. (Adaptado de SARAON e cols., 2011)

1.2.1.8. Interação tumor-estroma

Durante a progressão tumoral, tanto as células tumorais quanto as estromais ao redor do tumor são gradativamente alteradas. Tal progressão se reflete em mudanças na sinalização heterotípica entre o tumor e o estroma e depende de interações recíprocas entre as células neoplásicas e as células estromais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O microambiente estromal no CaP encontra-se modificado, em comparação com o estroma não tumoral, exibindo características alteradas. No CaP, o estroma reativo, que é o estroma alterado durante seu desenvolvimento, possui interação dinâmica com o epitélio prostático, possuindo um papel crítico durante sua progressão. As células do CaP ativam as células estromais, que, em troca, estimulariam as células tumorais a se tornarem mais agressivas, ao secretarem proteínas e fatores específicos que induzem a progressão do CaP (NIU; XIA, 2009). O estroma reativo, aparentemente, inicia-se no NIP e

evolui durante a progressão do tumor, substituindo o estroma fibromuscular não tumoral (TUXHORN e *cols.*, 2002).

O estroma reativo é composto por miofibroblastos e fibroblastos que são estimulados a expressar alguns componentes da MEC. Assim, sabe-se que o estroma reativo do CaP possui alterações na expressão de genes de inúmeras vias de sinalização celular e fatores de crescimento (DAKHOVA e *cols.*, 2009). O estroma reativo facilita a tumorigênese por aumentar a sobrevivência, a proliferação e a migração das células tumorais, além de induzir a angiogênese (TUXHORN e *cols.*, 2002; PALUMBO e *cols.*, 2012). Além disto, o estroma reativo e seus marcadores podem ser informativos sobre a progressão do CaP (AYALA e *cols.*, 2003; TOMAS e *cols.*, 2010).

1.2.1.9. Cascata metastática

O CaP metastático é uma doença incurável. A definição de metástase é a formação de focos tumorais secundários que crescem progressivamente em locais não relacionados com o sítio de lesão primário (WELCH; RINKER-SCHAEFFER, 1999). O processo metastático é uma cascata complexa e a causa de 90% das mortes relacionadas com câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A metástase compreende os processos que vão desde a disseminação das células tumorais a partir do sítio primário para o estroma ao redor, intravasão no sistema vascular ou linfático, onde elas sobrevivem até chegarem a algum sítio distante, com extravasamento para o tecido, seguido de neo-angiogênese e desenvolvimento de massa tumoral secundária. A angiogênese ou a geração de novos vasos sanguíneos é um pré-requisito para a liberação das células tumorais na circulação, o que envolve a produção de vários fatores angiogênicos, que promovem vascularização e crescimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A última etapa da cascata metastática é o crescimento das células tumorais no sítio secundário.

Sabe-se que o padrão de distribuição das metástases não é aleatório e envolve o direcionamento seletivo das células tumorais para um órgão específico. Isso se deve a uma série de fatores, como migração direcional das células tumorais em direção a um gradiente de quimioatrativos específicos existentes em determinados órgãos; captura das células tumorais nos vasos sanguíneos destes órgãos; e extravasamento dos capilares para o tecido ao redor, com proliferação no microambiente ameno do órgão alvo. No CaP, as metástases preferencialmente

se formam no tecido ósseo. As metástases ósseas do CaP são extremamente heterogêneas e são, geralmente, osteoblásticas (ROUDIER e cols., 2004).

Porém, nem todas as células tumorais possuem a capacidade de metastatizar. Além disso, o processo metastático é ineficiente, pois somente um pequeno número de células que deixam o órgão primário possui o potencial para sobreviver e estabelecer colônias em sítios secundários e, eventualmente, proliferar e formar metástases detectáveis. O melhor entendimento da cascata metastática no CaP é clinicamente relevante para estratificar os pacientes de CaP dentro de grupos de diferentes prognósticos.

Ao longo da progressão do CaP para a formação de metástases, a transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um processo que tem recebido atenção considerável como um paradigma conceitual para explicar o comportamento invasivo e metastático durante a progressão do câncer. A EMT é um processo fisiológico normal pelo qual as células de origem epitelial são transformadas em células que possuem características mesenquimais. Tem sido proposto que a EMT é uma co-opção das células tumorais durante a sua disseminação metastática de um órgão principal inicial para locais secundários. Na EMT, as interações célula-célula e célula-MEC são alteradas para que as células tumorais possam ser capazes de migrar para locais metastáticos. As principais alterações relacionadas com a EMT são alterações na morfologia celular de epitelial para fusiforme, redução da expressão de E-caderina, que é o principal componente das junções aderentes, aumento da expressão de vimentina e aumento da capacidade de migração celular (NAUSEEF; HENRY, 2011; WHITBREAD e cols, 2006).

Sendo assim, a identificação de produtos gênicos alterados ao longo da tumorigênese e de progressão do CaP é fundamental para a identificação de novos biomarcadores ou alvos terapêuticos para o CaP. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa, cuja principal linha de pesquisa é a identificação de biomarcadores, identificou, através de intensa busca na literatura, a proteína a trombospondina 2, com perfil de expressão alterado em tumores e que possui características promissoras no que diz respeito a sua utilização como potencial alvo terapêutico em tumores. Dessa forma, esta proteína se tornou um interessante alvo de estudo no CaP.

1.3. Trombospondinas

As trombospondinas (TSPs) são uma família de glicoproteínas extracelulares,

oligoméricas, com multi-domínios e ligantes de cálcio. As TSPs de mamíferos possuem várias funções tecido-específicas complexas, incluindo funções na cicatrização, na angiogênese, na biologia da parede vascular, na organização do tecido conectivo e na sinaptogênese. Mecanicamente, estas atividades derivam de interações com proteínas da superfície celular, fatores de crescimento, citocinas e componentes da MEC (ADAMS; LAWLER, 2011).

1.3.1. Organização estrutural

A família das TSPs é dividida em duas subfamílias, A e B, que estão agrupadas de acordo com a oligomerização e arquitetura molecular das suas proteínas (ADAMS, 2001). As proteínas do subgrupo A, que são a TSP1 e a TSP2, compartilham uma estrutura de domínios similar e uma identidade de sequências significativa, e estão organizadas como homotrímeros, sendo cada subunidade com tamanho aproximado de 145 kDa. As subunidades são compostas por uma região C-terminal, que possui domínios tipo fator de crescimento epidermal (EGF), repetições ligantes de cálcio do tipo 3 e um domínio C-terminal estruturalmente homólogo ao domínio lectina do tipo L. A organização desta região C-terminal é a marca das TSPs e foi denominada sua região de assinatura. A região N-terminal possui o domínio laminina tipo G; o domínio de ligação, o qual possui os dois resíduos de cisteína envolvidos na trimerização; o domínio Von Willebrand tipo C (vWF-C); e três repetições do tipo 1, tipo properdina, ou repetições de trombospondinas (RTSs).

Já as proteínas do subgrupo B, que são a TSP3, a TSP4 e a TSP5 /COMP, estão organizadas como homopentâmeros, com cada subunidade possuindo, aproximadamente, 105 kDa, e tendo sua estrutura de organização bem similar à das proteínas do subgrupo A, exceto por possuírem quatro repetições do tipo EGF e por não possuírem o domínio vWF-C e as repetições do tipo 1 (DE FRAIPONT *et al.*, 2001; ADAMS; LAWLER, 2011) (Figura 10). As subunidades das TSPs são montadas em oligômeros, após a tradução.

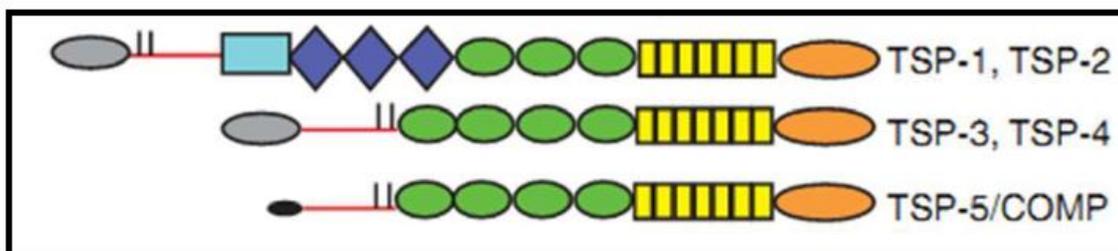


Figura 10. Membros da família das trombospondinas (TSPs) possuem estrutura multimodular. TSP1 e TSP2 são compostas por um domínio laminina tipo G (círculos cinza); um domínio de ligação (linhas vermelhas); um domínio Von Willebrand tipo C (retângulos azuis claros); três domínios de repetição do tipo 1, ou repetições de TSPs (losangos azuis escuros); domínios de repetição do tipo 2, ou tipo EGF (círculos verdes); domínios de repetição do tipo 3, ou ligantes de cálcio (retângulos amarelos); e um domínio C-terminal homólogo ao domínio lectina do tipo L (círculos laranja). (Adaptado de ADAMS e LAWLER, 2011)

As sequências primárias das TSPs são mais relacionadas nos domínios de repetição do tipo 3 e no domínio C-terminal. TSP1 e TSP2 têm 82% de identidade nesta região e os subgrupos A e B das TSPs possuem uma identidade média de 60% nesta região (ADAMS, 2001). As repetições do tipo 1 estão presentes em mais de 100 proteínas do genoma humano (TUCKER, 2004).

1.3.2. Trombospondina 2

TSP2 é uma molécula multifuncional primeiramente descrita como componente e regulador não estrutural da MEC, onde modula a atividade e a biodisponibilidade de proteases e fatores de crescimento (BORNSTEIN e *cols.*, 2000a). TSP2 afeta diversas funções celulares, como proliferação, motilidade, adesão, apoptose e agregação plaquetária, atuando na regulação da angiogênese, do crescimento tumoral, da cicatrização e da hemostasia (ADAMS; LAWLER, 2004).

TSP2 foi o segundo membro da família das TSPs a ser descoberto, sendo homólogo, mas diferente de TSP1 (BORNSTEIN e *cols.*, 1991). TSP2 e TSP1 possuem genes e expressão tecidual diferenciais, porém TSP2 tem grande similaridade estrutural com TSP1. Assim como TSP1, TSP2 interage com alguns receptores de superfície celular, como integrinas, proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) e proteoglicanas heparan sulfato (CHEN e *cols.*, 1996).

1.3.2.1. Estrutura gênica e regulação

O gene humano de TSP2 denomina-se THBS2, localiza-se no cromossomo 6q27 e foi identificado a partir de fibroblastos da derme (LABELL e *cols.*, 1992). THBS2 possui 38 Kb, 23 éxons e seu DNA codificante possui 5,8 Kb. Sua região

5' não transcrita possui os elementos repetitivos Tigger 1, associados a transposons do DNA, e MLTC1, associados a regiões subteloméricas. A região promotora de THBS2 possui grande identidade com a região promotora do gene *Thbs2* murino, entretanto possui baixa identidade sequencial com a região promotora do gene THBS1 humano. Assim, apesar da estrutura éxon/intron e sequências codificantes de THBS1 e THBS2 serem bem semelhantes, suas regiões regulatórias são bem diferentes, o que implica em modos distintos de regulação e funções específicas para estes dois genes. A região promotora de THBS2 possui sequências consenso para sítios de ligação de alguns fatores de transcrição, como NF-κB, NF-Y, p53, Myc-CF1, Sp1, CF-1, GATA e AP-1 (ADOLPH *e cols.*, 1997).

A expressão de TSP2 pode ser regulada pela metilação das ilhas CpGs da sua região promotora (WHITCOMB *e cols.*, 2003; CZEKIERDOWSKI *e cols.*, 2008), pela via de Hox5-Akt (ARDERIU *e cols.*, 2007), pelo hormônio adrenocorticotrófico (HATAKEYAMA *e cols.*, 2002), por hipóxia (DE FRAIPONT, 2001; LUO *e cols.*, 2012) e por óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (TANG *e cols.*, 2010; MACLAUHLAN *e cols.*, 2011). TSP2 é regulado negativamente, em nível pós-transcricional, através da regulação da estabilidade de seu RNA mensageiro (RNAm), por Myb (BEIN *e cols.*, 1998).

Transcritos alternativos para o gene THBS2 foram identificados. Tais transcritos foram descritos como podendo ter a retirada do éxon 3, ou retenção dos éxons 1A, 1B ou 2 (ADOLPH, 1999a). Recentemente, foram descritas duas isoformas proteicas de TSP2, em modelo murino, contendo 125 kDa e 200 kDa, porém ainda não foi esclarecido se tais isoformas são provenientes de processamento alternativo pós-transcrição ou pós-tradução (ALFORD *e cols.*, 2012).

1.3.2.2 Distribuição tecidual

A expressão de TSP2, durante a embriogênese murina, está relacionada com áreas de condrogênese, osteogênese e vasculogênese, células formadoras da derme e outros tecidos conectivos. Nos tecidos adultos murinos, foi observada a expressão de TSP2 em fibroblastos da derme, condrócitos articulares, células de Purkinje no cerebelo, células de Leydig no testículo e no córtex adrenal. Sua localização, no adulto, é no microambiente pericelular, onde TSP2 pode influenciar as interações célula-MEC associadas com migração celular e reparo de tecidos (KYRIAKIDES *e cols.*, 1998a).

Nos tecidos humanos, TSP2 é expresso amplamente em uma grande variedade de tecidos, mas tem seus maiores níveis de expressão na aorta e no

coração de feto. TSP2 também possui alta expressão em tecidos musculares, endócrinos, imunes e nervosos. Com relação aos tecidos musculares, seus maiores níveis são na aorta, útero, coração e bexiga. Nos tecidos fetais, os maiores níveis de TSP2 são no coração, pulmão, rins, baço e cérebro. Com relação aos tecidos endócrinos, são no ovário, glândula pituitária, estômago, testículos e glândula adrenal. Nos tecidos do sistema imune, ocorre expressão no apêndice e linfonodos. Dentre os tecidos com menor expressão de TSP2, encontram-se medula óssea, fígado, músculo esquelético, pâncreas e próstata (ADOLPH, 1999b).

1.3.2.3 Interações e funções

TSP2 atua na interface entre a superfície celular e a MEC, regulando a estrutura da MEC e o fenótipo celular durante o desenvolvimento e remodelamento tecidual associado com inflamação, cicatrização e tumorigênese (LAWLER; DETMAR, 2004). A regulação da estrutura da MEC ocorre por ligação direta a componentes fibrilares, como colágeno e fibronectina, e por modular proteases extracelulares, como metaloproteinases de matriz (MMPs) e plasmina. O efeito de TSP2 na estrutura da MEC fica evidenciado no camundongo *knock-out* para TSP2, onde as fibras de colágeno se apresentam de maneira anormal.

Atualmente, sabe-se que TSP2 interage com alguns receptores e proteínas específicos. Já foi caracterizada a interação de TSP2 com as integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_6\beta_1$, relacionadas com adesão, espalhamento e migração celulares (ADAMS; LAWLER, 2011). Também há interação de TSP2 com fatores de crescimento e proteases, como TGF β 1, com o qual estabelece uma interação complexa, através de seu domínio RTS, relacionando-se com a localização específica de TGF β 1 latente na MEC ou na proximidade da superfície celular (YOUNG; MURPHY-ULLRICH, 2004). Os domínios RTS de TSP2 também interagem com MMP2 e MMP9, inibindo suas atividades (BEIN; SIMONS, 2000), e com CD36, levando a apoptose das células endoteliais (CEs) (SIMANTOV e cols., 2005). Também é interessante citar a interação de TSP2 com Notch3 e seu ligante, Jagged1, que leva ao aumento da sinalização da via de Notch dependente de ligante (MENG e cols., 2010). Ocorre também interação de TSP2 com proteoglicanas heparan sulfato e LRP (CHEN e cols., 1996).

O fenótipo do camundongo *knock-out* para TSP2 acrescentou muitas informações acerca das funções endógenas de TSP2. Estes animais *knock-out* são

viáveis, entretanto eles apresentam uma série de características alteradas. Os camundongos *knock-out* para TSP2 possuem pele mais frágil, com baixa resistência, e seus fibroblastos possuem defeito na adesão celular (KYRIAKIDES e cols., 1998). Os defeitos de adesão dos fibroblastos da derme (Figura 11) foram associados com aumento dos níveis de MMP2 (YANG e cols., 2000). Também foi observado o aumento dos níveis de MMP2 em vários tipos teciduais do camundongo *knock-out* para TSP2, como em feridas cutâneas em cicatrização (AGAH e cols., 2004) e no miocárdio lesado (SCHROEN e cols., 2004). O aumento dos níveis de MMP2, MMP9 e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) solúvel nestes camundongos também leva a aumento da angiogênese (MACLAUHLAN e cols., 2009). Acredita-se que o aumento de MMP2 nesses tecidos é pela demonstração de que MMP2, geralmente, é removido do microambiente pericelular pela formação de um complexo com TSP2, o qual é endocitado pelo receptor LRP1 (YANG e cols., 2001).

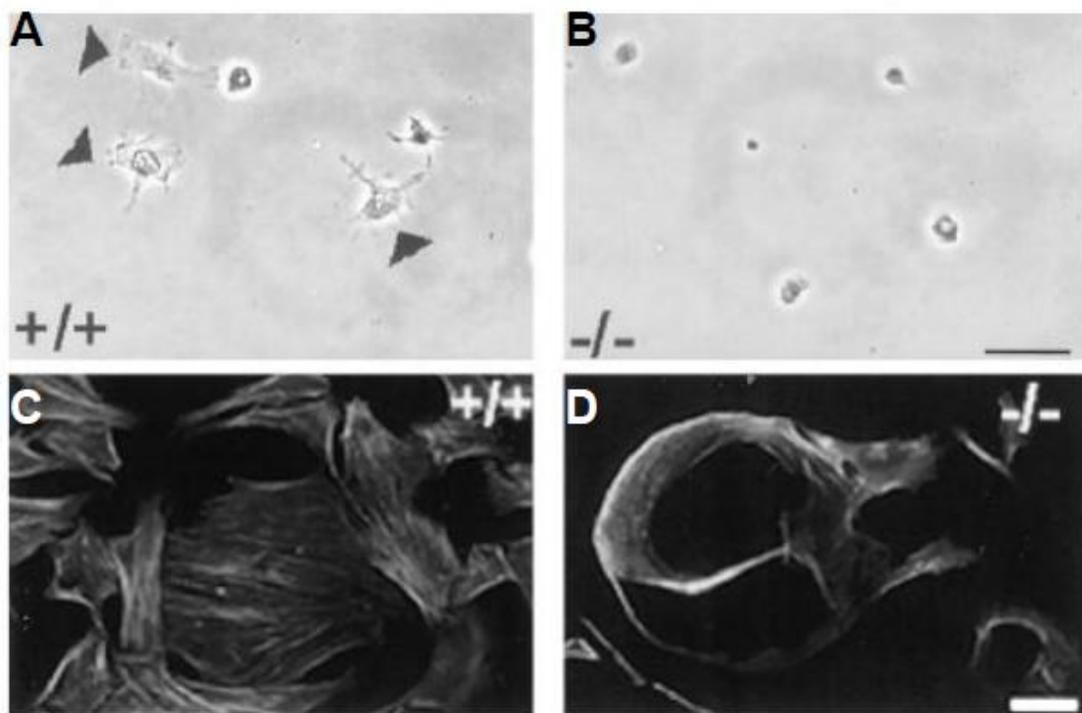


Figura 11. Espalhamento e morfologia do citoesqueleto de fibroblastos da derme. A e B - Micrografia de contraste de fase de fibroblastos controles (A) ou *knock-out* para TSP2 (B) plaqueados, por uma hora, em ausência de soro. As células controles aderem e apresentam morfologia espalhada (cabeças de seta), enquanto que as células sem TSP2 continuam arredondadas. Barra: 25 μ m. C e D - Fibroblastos controles (C) ou *knock-outs* para TSP2 (D) plaqueados, por 24 horas, na presença de soro. O citoesqueleto foi visualização através de marcação com faloidina. As células controles estão bem espalhadas, com fibras de estresse bem definidas, enquanto que as células mutantes apresentaram menor espalhamento e deposição periférica de actina. Barra: 100 μ m. (YANG e cols., 2000)

A cicatrização de feridas destes animais é mais rápida e com menor formação de cicatrizes do que os animais controles (KYRIAKIDES e cols., 1999). O fenótipo do

camundongo *knock-out* para TSP2 também inclui densidade vascular e angiogênese aumentadas, desordem de sangramento, aumento de crescimento ósseo e formação de fibras de colágeno anormais, associadas com frouxidão dos tendões e ligamentos (KYRIAKIDES *e cols.*, 1998b) (Figura 12). As fibras de colágeno são desorganizadas na derme (KYRIAKIDES *e cols.*, 1998b) e em tecido de granulação de feridas cutâneas em cicatrização (AGAH *e cols.*, 2004), além de também ocorrerem anormalidades nas interações fibroblastos-MEC (BORNSTEIN *e cols.*, 2000b). Nesses animais *knock-out*, também foi observada diminuição da tensão e da integridade teciduais no colo do útero de fêmeas grávidas (KOKENYESI *e cols.*, 2004) e no miocárdio lesado (SCHROEN *e cols.*, 2004).



Figura 12. Aparência do camundongo *knock-out* para TSP2. A deficiência do gene *Thbs2* não altera a aparência do camundongo, de maneira evidente, mas o aumento da flexibilidade dos tendões e dos ligamentos da cauda permite que se dê um nó na cauda, o que não é possível em um animal controle. (KYRIAKIDES *e cols.*, 1998b)

1.3.2.3.1 Inibição da angiogênese

A angiogênese é definida como a formação de novos capilares a partir de vasculatura pré-existente, pela migração e proliferação das CEs (BECK; D'AMORE, 1997). A angiogênese é um processo fundamental necessário para vários eventos fisiológicos e patológicos e é considerada um evento essencial para o crescimento, invasão e metástase tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A progressão da angiogênese é controlada por um balanço sensível entre reguladores positivos e negativos do processo (LIN; KELLY, 2012).

TSP2 é um inibidor natural da angiogênese, o que pode ocorrer em situações fisiológicas ou patológicas. Fisiologicamente, o papel de TSP2 fica evidente em

camundongos *knock-out*, os quais possuem densidade capilar aumentada em vários tecidos (Figura 13) (KYRIAKIDES e *cols.*, 1998b). Patologicamente, a ação de TSP2 na inibição da angiogênese também pode ser vista nos camundongos *knock-out*, os quais possuem aumento da angiogênese na cicatrização de feridas (KYRIAKIDES e *cols.*, 1999), ou apresentam características alteradas com relação à inibição da angiogênese tumoral (LAWLER; DETMAR, 2004).

Os mecanismos de inibição da angiogênese, por TSP2, podem ser caracterizados em efeitos diretos nas CEs e em efeitos indiretos nos reguladores da angiogênese. TSP2 inibe a migração e a mitogênese das CEs, em resposta a fatores angiogênicos, como fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), EGF, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) e VEGF (VOLPERT e *cols.*, 1995; PANETTI e *cols.*, 1997). A atividade anti-angiogênica de TSP2 está relacionada com seus domínios RTS (LAWLER; DETMAR, 2004), que estão associados à ligação a CD36 para produzir estes efeitos.

TSP2 também pode inibir a proliferação das CEs, limitando a progressão do ciclo celular e induzindo morte celular (ARMSTRONG e *cols.*, 2002). A associação da região C-terminal de TSP2 com o receptor VLDL também está envolvida em um mecanismo não-apoptótico de limitação da progressão do ciclo celular e da sinalização via MAP cinase (MAPK) em CEs (OGANESIAN e *cols.*, 2008).

Dados da literatura mostram que TSP2 e o fator pró-angiogênico óxido nítrico (NO) possuem efeitos antagônicos. NO é crucial para a regulação do estado proliferativo e anti-apoptótico das CEs, possuindo papel essencial na angiogênese fisiológica (YU e *cols.*, 2005). Estudos realizados por MacLauchlan e *cols.* demonstraram que parte das ações mediadas por NO ocorre pela modulação dos níveis de TSP2, inibindo a sua transcrição (MACLAUCHLAN e *cols.*, 2011).

A regulação da angiogênese fisiológica por TSP2 também está relacionada com a regulação da MEC, através da regulação dos níveis das MMPs que, por sua vez, facilitam o espalhamento e a invasão das CEs, além de modularem a disponibilidade de VEGF (KRADY e *cols.*, 2008).

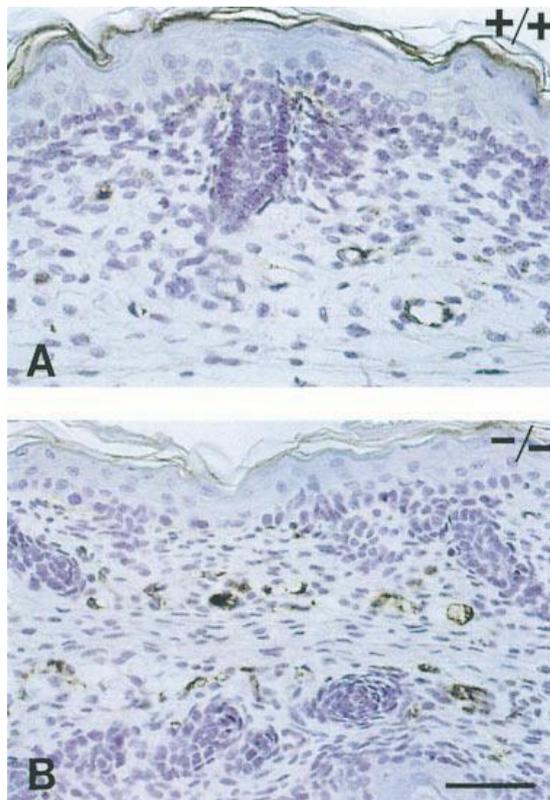


Figura 13. Micrografia de cortes histológicos de tecido da derme, representativos de tecidos com aumento de densidade vascular no camundongo sem TSP2. Análise imunohistoquímica para o fator von Willebrand da derme do camundongo controle (A) ou *knock-out* para TSP2 (B). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina. Barra: 50 μ m (KYRIAKIDES e cols., 1998b)

1.3.2.3.2 Papel funcional em tumores

Desde a descoberta do papel da angiogênese na patogênese do crescimento tumoral e das metástases, proteínas que possuem a capacidade de inibir a angiogênese vêm sendo estudadas, com o intuito de se descobrir novas estratégias terapêuticas para o câncer. Neste intuito, TSP2 vem sendo estudado, com relação a suas propriedades funcionais em modelos tumorais.

Os primeiros estudos realizados para elucidar o papel biológico da expressão de TSP2 no crescimento tumoral e na angiogênese utilizaram um modelo tumoral de carcinoma de células escamosas humanas A431. Estas células não expressam TSP2, e foram transfectadas estavelmente com um vetor de expressão de TSP2. A injeção dos clones de células A431 superexpressando TSP2 na derme de camundongos *nude* levou a inibição do crescimento tumoral, em comparação com os tumores formados pela injeção das células A431 superexpressando TSP1. Entretanto, a formação tumoral foi completamente abolida quando as células A431 estavam superexpressando TSP2 e TSP1. Nos tumores que superexpressavam TSP2, foram identificadas áreas de necrose, e tanto a densidade quanto o tamanho

dos vasos tumorais foram reduzidos, apesar dos níveis de VEGF continuarem altos (STREIT *et cols.*, 1999).

Em um estudo subsequente para avaliar o papel biológico de TSP2 durante a carcinogênese, camundongos deficientes em TSP2 e camundongos selvagens foram submetidos a um regime de carcinogênese induzida quimicamente na derme. Os animais deficientes para TSP2 apresentaram maior susceptibilidade a carcinogênese induzida na derme, o que resultou em formação tumoral maior e mais acelerada. Os papilomas da derme induzidos quimicamente tiveram seu período de latência diminuído de 14 semanas, nos camundongos selvagens, para 9 semanas, nos camundongos *knock-out* para TSP2. Estes animais deficientes em TSP2 também apresentaram maior formação de metástases linfonodais e favorecimento da angiogênese tumoral. Os tumores formados também possuíam maior tamanho e densidade vasculares. Além disso, foi levantada a hipótese de que o TSP2 expresso no estroma representava um mecanismo de defesa do hospedeiro contra o tumor (HAWIGHORST *et cols.*, 2001).

Em estudo posterior, avaliando a terapia gênica como terapia anti-angiogênica para inibir o crescimento tumoral, foi estabelecido um sistema de implante tecidual para a produção contínua de TSP2, *in vivo*. Neste sistema, fibroblastos foram transduzidos retroviralmente para superexpressar TSP2 e foram implantados em arcabouço de polímeros biodegradáveis. Após o implante na cavidade peritoneal de camundongos *nude*, os bioimplantes mantiveram altos níveis de secreção de TSP2 durante longos períodos de tempo, resultando em aumento dos níveis circulantes de TSP2. O TSP2 secretado pelos bioimplantes inibiu o crescimento tumoral e a angiogênese de carcinoma de célula escamosa, melanoma maligno e carcinoma de pulmão de Lewis que haviam sido implantados em sítios distantes. Neste modelo, nos tumores que conseguiram se estabelecer, foi apresentada diminuição do tamanho dos vasos e aumento da apoptose tumorais (STREIT *et cols.*, 2002).

Desde então, vários outros estudos avaliando a capacidade de TSP2 ou fragmentos recombinantes da sua proteína, vêm sendo avaliados em diversos modelos tumorais. Noh e colaboradores analisaram a potencial eficácia anti-tumoral de terapia de administração sistêmica de TSP2. Para tanto, um fragmento recombinante de TSP2 humano, de 80 kDa, possuindo a região N-terminal e as repetições RTS, foi administrado, intraperitonealmente, em camundongos, o que resultou em inibição do crescimento e vascularização tumorais de células A432 *in*

vivo. O fragmento recombinante de TSP2 também levou a inibição de migração e formação de tubos, induzidas por VEGF, e a apoptose de células endoteliais microvasculares da derme humanas (HDMEC) (NOH e cols., 2003). A região N-terminal de TSP2 também foi estudada por outro grupo, o qual utilizou o fragmento N-terminal de TSP2 murino clonado em vetores retrovirais e adenovirais para a terapia gênica. Neste trabalho, o tratamento de camundongos nos quais foram injetadas células TS/A, de carcinoma de mama, ou A431, subcutaneamente, foi feito através de injeção intratumoral de fibroblastos superexpressando o fragmento N-terminal de TSP2. Este tratamento levou a redução de 70% do volume tumoral e erradicou os tumores em 40% dos animais tratados, com diminuição significativa da área e tamanho dos vasos tumorais (HAHN e cols., 2004).

Em modelo de glioma murino em animais *knock-out* para TSP2, foi visto que o crescimento tumoral e a densidade vascular encontravam-se aumentadas. Nestes tumores, foram encontrados altos níveis de MMP2 e MMP9, com uma localização preferencial na microvasculatura. Neste estudo, foi visto que a adição de TSP2 recombinante a CEs de microvasculatura cerebral *in vitro* levou a redução da invasão e dos níveis de MMP2 (FEARS e cols., 2005).

A análise das funções de TSP2 também foi avaliada com relação à formação de metástases em alguns modelos. Dados da literatura mostram que a super expressão de TSP2 em células de melanoma maligno humanas A375 diminuiu sua capacidade de invasão *in vitro* e levou a diminuição da expressão e da atividade dos inibidores dos ativadores de plasminogênio (PAI) 1 e 2. Também foi observada diminuição do potencial de formação de metástases hepáticas em camundongos imuno deficientes nos quais foi feita injeção subcutânea destas células superexpressando TSP2. A vascularização das metástases hepáticas formadas encontrava-se significativamente reduzida (CHIJIWA e cols., 2009).

Para avaliar os efeitos sistêmicos de TSP2 em metástases e os mecanismos moleculares relacionados com suas funções anti-angiogênicas, Koch e colaboradores desenvolveram uma proteína de fusão recombinante contendo o fragmento N-terminal de TSP2 humana. Esta proteína recombinante levou a inibição da formação de tubos induzida por VEGF, das células HDMEC, além de induzir a apoptose destas células, por ativação de caspase 3 e perda de potencial de membrana da mitocôndria. Foi identificado que todos estes efeitos eram mediados pelo receptor de TSP2, CD36. Além disso, injeção intraperitoneal da proteína recombinante levou a inibição do crescimento tumoral e formação de metástases em

modelos de células MDA-MB-435 e MDA-MB-231 injetadas na glândula mamária de camundongos *nude* imuno-deficientes (KOCH e cols., 2011).

Entretanto, em um estudo com resultados contraditórios com relação à função de inibição tumoral de TSP2, foi demonstrado, em modelo de câncer pancreático, que as células tumorais pancreáticas derivadas de tumor estimulam a invasão das células tumorais através da secreção de TSP2 (FARROW e cols., 2009).

1.3.2.4 Expressão nos tumores

Existe uma reciprocidade entre os níveis de expressão de TSP2 e o crescimento tumoral, fato que vem sendo demonstrado para alguns modelos. Entretanto, resultados controversos têm sido encontrados com relação ao nível de expressão de TSP2, dependendo do modelo tumoral.

Foi visto que o RNAm de TSP2 encontra-se menos expresso nos tecidos tumorais, com relação aos tecidos normais, em estudos que avaliaram amostras de câncer de pulmão de não pequenas células (OSHIKA e cols., 1998) e câncer cervical (KODAMA e cols., 2001).

Em outro estudo, onde foram avaliadas amostras de tumores de ovário do tipo seroso, em comparação com o epitélio ovariano normal, TSP2 encontrou-se entre as proteínas menos expressas (SANTIN e cols., 2004).

Além disso, a presença de TSP2 encontra-se diretamente associada com melhor prognóstico em câncer de pulmão de não pequenas células, mas inversamente relacionada com a vascularização tumoral (OSHIKA e cols., 1998). A expressão de TSP2 também se encontra inversamente relacionada com a presença de metástases e contagem e densidade vasculares, mas diretamente associada com melhor prognóstico dos pacientes com câncer de cólon (TOKUNAGA e cols., 1999). Da mesma forma, a expressão de TSP2 é inversamente correlacionada com a vascularização e grau histológico de gliomas (KAZUNO e cols., 1999).

Todavia, em outros modelos tumorais, TSP2 encontra-se mais expresso em tumores, em comparação com suas amostras controles. Estes resultados foram encontrados em modelos de amostras de tumor de mama (BERTIN e cols., 1997), câncer colo-retal (YOSHIDA e cols., 1999), de tumor de ovário do tipo epitelial (KODAMA e cols., 2001), melanoma múltiplo (DANIELSEN e cols., 2007) e adenocarcinoma de pulmão (CHIJIWA e cols., 2009). No modelo de adenocarcinoma de pulmão, a expressão de TSP2 oriundo das células tumorais encontra-se

diretamente relacionada com bom prognóstico, mas a expressão de TSP2 estromal encontra-se relacionada com pior prognóstico (CHIJIWA e *co/s.*, 2009).

Já com relação às análises dos níveis de expressão de TSP2, comparando-se amostras tumorais primárias e metastáticas, já foi observada expressão diferencial de TSP2 nestes dois grupos tumorais em CaP (LATULIPPE e *co/s.*, 2002; CHANDRAN e *co/s.*, 2007), mieloma maligno (KUNZ e *co/s.*, 2002) e carcinoma supraglótico (BAI e *co/s.*, 2009).

Apesar do nível de expressão e a função de TSP2 já terem sido avaliados para diversos modelos tumorais, sua caracterização detalhada no CaP ainda não foi realizada. Existem apenas alguns estudos relacionados com o nível de expressão de TSP2 no CaP. Em um destes estudos, não foi encontrada expressão de TSP2 em tecidos prostáticos humanos (VALLBO e *co/s.*, 2004). Em estudo subsequente, a expressão de TSP2 foi identificada, em tecidos prostáticos de ratos, mas não foi observada nenhuma diferença na sua expressão, comparando-se amostras tumorais e não tumorais (VALLBO e DAMBER, 2005).

Conforme podemos observar, os dados a respeito do perfil de expressão de TSP2 no CaP são bastante limitados. É necessário que seja feita uma caracterização detalhada sobre a expressão de seu transcrito e de sua proteína, avaliando-se também esta expressão nos compartimentos epiteliais e estromais. Também não há informações acerca do potencial de TSP2 enquanto biomarcador para o diagnóstico ou prognóstico do CaP, apesar de já ter sido mostrada a alteração do perfil de expressão de TSP2 em vários modelos tumorais. Além disto, ainda não foram descritas as funções de TSP2 no CaP, não obstante seu conhecido papel na inibição de outros tumores. Dessa forma, torna-se interessante o estudo do perfil de expressão e função de TSP2 no CaP.

2. Objetivos

Caracterizar o perfil de expressão de TSP2 no CaP e no HPB e investigar o possível papel funcional de TSP2 no CaP.

2.1. Objetivos específicos

✓ Avaliar o perfil de expressão do transcrito e da proteína TSP2 em linhagens celulares e tecidos prostáticos.

✓ Avaliar o potencial da utilização da expressão de TSP2 como biomarcador para diagnóstico e/ou prognóstico do CaP.

✓ Investigar o possível papel funcional de TSP2 em células de CaP através da avaliação dos efeitos celulares do tratamento com TSP2 recombinante.

✓ Determinar o perfil fosfo-proteômico de linhagem celular de CaP após tratamento com TSP2 recombinante.

Capítulo 1 – Análise do perfil de expressão de TSP2 no CaP e no HPB e de sua potencial aplicação como biomarcador

A primeira parte dos resultados desta tese teve como objetivos avaliar o perfil de expressão de TSP2, com relação ao seu transcrito e a sua proteína, no CaP, em comparação com amostras prostáticas não malignas, e avaliar o seu potencial como biomarcador para o diagnóstico diferencial entre CaP e HPB. Parte deste trabalho foi recentemente aceita para publicação no periódico "*Experimental and Molecular Pathology*", cuja versão submetida encontra-se neste capítulo.

Este foi o primeiro estudo a mostrar que o transcrito TSP2 encontra-se menos expresso nos tecidos e linhagens de CaP, em comparação com os tecidos de HPB e linhagens não tumorais, respectivamente. Porém, não observamos diferenças no nível de expressão de TSP2 ao se comparar CaP e tecido adjacente ao tumor. Identificamos que o nível de expressão do transcrito TSP2 tem o potencial para ser utilizado como biomarcador para o diagnóstico diferencial destas duas doenças.

Demonstramos que a proteína TSP2 encontra-se presente nas células epiteliais e estromais de tecidos de CaP e HPB. Entretanto, não observamos sua expressão em linhagens tumorais de CaP. O escore da marcação da proteína TSP2 encontra-se diminuído no compartimento estromal de CaP, em comparação com este compartimento de HPB. Não observamos diferenças no escore da marcação da proteína TSP2 quando comparamos os compartimentos epiteliais de CaP e HPB. Avaliando-se os parâmetros de escore de marcação estromal, escore de marcação epitelial e razão do escore de marcação epitélio/estroma, este último obteve o melhor valor de acurácia para a distinção entre CaP e HPB. Adicionalmente, o escore de marcação epitelial de TSP2 foi correlacionado positivamente com a invasão vascular e com a recorrência bioquímica nas amostras teciduais de CaP. Observamos que o escore da marcação epitelial de TSP2 poderia prever a invasão vascular, a invasão de linfonodos, a recorrência bioquímica e a recorrência clínica. Já o escore da marcação estromal de TSP2 poderia prever a invasão de linfonodos. E a razão do escore da marcação epitélio/estroma de TSP2 poderia prever a invasão das vesículas seminais. Os resultados gerados por este estudo contribuem para o melhor entendimento do perfil de expressão de TSP2 nos tumores de próstata e de sua potencial aplicação como biomarcador para o diagnóstico diferencial entre CaP e HPB.

2 - Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o perfil de expressão do transcrito e da proteína TSP2 em linhagens celulares e tecidos prostáticos.
- ✓ Avaliar o potencial da utilização da expressão de TSP2 como biomarcador para diagnóstico do CaP.

Accepted Manuscript

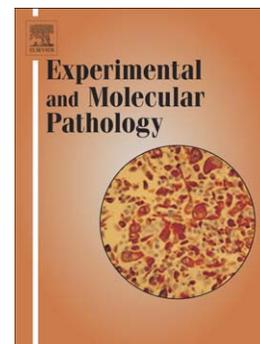
Expression analysis of Thrombospondin 2 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia

A.R. Matos, C.M. Coutinho-Camillo, L.C.S. Thuler, F.P. Fonseca, F.A. Soares, E.A. Silva, E.R. Gimba

PII: S0014-4800(13)00032-4
DOI: doi: [10.1016/j.yexmp.2013.02.002](https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.02.002)
Reference: YEXMP 3448

To appear in: *Experimental and Molecular Pathology*

Received date: 20 October 2012
Revised date: 18 February 2013



Please cite this article as: Matos, A.R., Coutinho-Camillo, C.M., Thuler, L.C.S., Fonseca, F.P., Soares, F.A., Silva, E.A., Gimba, E.R., Expression analysis of Thrombospondin 2 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia, *Experimental and Molecular Pathology* (2013), doi: [10.1016/j.yexmp.2013.02.002](https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.02.002)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Expression analysis of Thrombospondin 2 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia

Authors: Matos, A.R.¹; Coutinho-Camillo, C.M.²; Thuler, L.C.S.^{3,4}; Fonseca, F.P.⁵; Soares, F.A.²; Silva, E.A.⁶; Gimba, E.R.^{1,7}.

Running Title: TSP2 and prostate expression

Affiliations:

¹ Programa de Carcinogênese Molecular/Programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCa), CPQ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

² Departamento de Anatomia Patológica, Hospital AC Camargo, São Paulo, SP, Brasil

³ Coordenação de Pesquisa Clínica/INCA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴ Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁵ Serviço de Urologia, Departamento de Cirurgia Pélvica, Hospital A. C. Camargo

⁶ Serviço de Urologia, Hospital Pedro Ernesto, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁷ Departamento Interdisciplinar de Rio das Ostras - RIR, Polo Universitário de Rio das Ostras, Universidade Federal Fluminense, Rio das Ostras, RJ, Brasil

Corresponding author:

Dr. Etel Rodrigues Pereira Gimba

Universidade Federal Fluminense/Pólo Universitário de Rio das Ostras, Instituto

Nacional de Câncer

Rua André Cavalcante, 37, 6^o andar, Centro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Email: etelgimba@id.uff.br, etelgimba@hotmail.com

CEP: 20231050

Tel: 55 21 32076509

FAX: 55 21 32076509

Abstract

Thrombospondin 2 (TSP2) is a protein with important roles in different tumor types, mainly related to tumor inhibition. However, there are limiting data regarding TSP2 in prostate cancer (PCa) and benign prostate hyperplasia (BPH). We aimed to investigate TSP2 transcript and protein expression in tumoral and non-tumoral prostate tissues and cell lines, and its implications for PCa diagnosis and progression. TSP2 transcript expression was evaluated by real time PCR in PCa and BPH tissue samples and in tumoral and non-tumoral cells lines. TSP2 protein expression analysis was conducted by immunohistochemistry in a tissue microarray (TMA) containing PCa and BPH tissue samples. TSP2 transcript was down-regulated in PCa tissue samples and cell lines, when compared to BPH and non-tumoral samples ($p < 0.01$). Receiving Operating Curve (ROC) analysis demonstrated that TSP2 transcript levels can better distinguish PCa from BPH tissue samples ($p < 0.01$) than serum PSA levels ($p = 0.299$). TSP2 protein expression has been observed in the cytoplasm of both PCa and BPH epithelial and stromal compartments. TSP2 stromal staining scores were significantly lower in PCa than in BPH tissues ($p < 0.01$), while similar TSP2 epithelial staining patterns were observed in both diseases. Notably, the TSP2 epithelial staining score was significantly correlated to vascular invasion and biochemical recurrence in PCa tissue samples ($p < 0.05$). Our data indicate that TSP2 is down-regulated at PCa tissues and cell lines, especially at stroma compartment, which could be related to PCa progression. TSP2 levels could potentially be applied for differential PCa and BPH diagnosis.

Keywords: thrombospondin-2, prostate cancer, benign prostatic hyperplasia

Introduction

Prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are the most prevalent diseases that can affect the human prostate and are mainly related to the aging population. Histologically, the prostate has two tissue compartments, the stromal, mainly composed of extracellular matrix (ECM), smooth muscle and fibroblasts, and the glandular, mainly composed of luminal and basal epithelial cells. During PCa carcinogenesis, the epithelial glandular cells are the initiators of the disease, acquiring malignant characteristics, but its interactions with the stroma also have a critical role during PCa progression (Cunha et al. 1996; Cunha et al. 2002). Similarly, BPH development has also been closely associated with cellular proliferation in epithelial and stromal components (Yamashita et al. 2003). BPH and PCa have no clear molecular and genetic relationships, presenting two distinct pathogenetic pathways (Alcaraz et al. 2009). Some efforts have been made to identify the genetic and molecular differences between these two conditions in order to describe new biomarkers and potential therapeutic targets (Porkka et al. 2007; Zhang et al. 2010). Due to several limitations presented by PSA screening tests, several other biomarkers have been proposed for early detection of PCa and PCa and BPH differential diagnosis (You et al. 2010).

During PCa and BPH development, there are interactions between epithelia and stroma, which results in the formation of the reactive stroma, that exerts regulatory control over epithelial proliferation and differentiation and enhances tumorigenesis by supporting cancer cell survival, proliferation, migration, and by inducing angiogenesis (Tuxhorn et al. 2002a; Tuxhorn et al. 2002b). Moreover, reactive stroma and their markers are informative of PCa

progression (Ayala et al. 2003; Tomas et al. 2010). It is clear that stromal-epithelial interactions are important in both normal and abnormal prostatic growth, but the specific mechanisms and proteins altered in these interactions have not yet been fully elucidated.

Thrombospondin 2 (TSP2 or THBS2) is a secreted matricellular glycoprotein that participates in many physiological and pathological processes (Adams 2001; Armstrong and Bornstein, 2003). Several studies have demonstrated a role for TSP2 in inhibiting tumor growth and angiogenesis (Chijiwa et al. 2009; Hahn et al. 2004; Hawighorst et al 2001; Koch et al. 2011; Noh et al. 2003; Streit et al. 2002). However, TSP2 expression profiling in tumors is quite controversial, being down-regulated in some tumor types (Kodama et al. 2001; Oshika et al. 1998; Santin et al. 2004), while overexpressed in others (Chijiwa et al. 2009; Bertin et al. 2007; Danielsen et al. 2007). TSP2 expression in tumor stroma has been proposed to be a reactive phenomenon, caused by promotion of angiogenesis (Chijiwa et al. 2009) and also as a protective role in controlling *de novo* tumor growth (Hawighorst et al 2001). However, TSP2 specific roles in the tumor stroma compartment have not yet been fully elucidated. Despite the evaluation of TSP2 expression and functional roles has been shown for some tumor types, its detailed characterization in PCa is missing. There are only a few studies on TSP2 expression in PCa tissues (Vallbo et al. 2004; Vallbo and Damber 2005).

In this study, we investigated TSP2 expression in PCa and BPH tissue samples, as well as in PCa and non-tumor cell lines by analyzing TSP2 mRNA and protein expression levels, including the assessment of TSP2 protein expression in epithelial and stromal compartments using a tissue microarray

(TMA) approach. Here we show the down-regulation of TSP2 levels in PCa tissues, especially in the stromal compartment, and discuss its putative involvement in PCa carcinogenesis and application for PCa and BPH differential diagnosis.

Material and Methods

Cell lines and culture conditions

Human PC3, DU145 and LNCaP PCa cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). Cell lines were cultured in a humidified environment containing 5% CO₂ at 37°C. PC3 and LNCaP cells were maintained in RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich) and DU145 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen).

TSP2 transcript expression analysis

TSP2 transcript expression analysis was performed in 24 PCa and 13 BPH tissue samples, as well as PCa and non-tumoral cell lines. PCa samples were obtained from patients who underwent radical prostatectomy with no previous treatment and BPH samples were obtained from patients who underwent open adenectomy. BPH and PCa diagnosis have been confirmed by histopathological analysis. Tissue samples were collected during surgery, macroscopically dissected and then stored at -20°C in RNAlater (Ambion). Malignant and benign tumoral areas were histologically confirmed. Tissue samples were collected at the Urology Department of Pedro Ernesto Hospital and the Urology Service and Pathology Division of the Instituto Nacional do Cancer. Informed consent was obtained from all individuals included in this study and the project has been approved by the Brazilian National Cancer Institute and the Brazilian National Council on Ethics in Research, according to

protocol number 2701. The cell lines were cultivated until sub-confluence and RNA was prepared as described below.

RNA preparation, cDNA synthesis and quantitative real-time RT-PCR

RNA from tissue samples and cell lines was extracted using the RNeasy kit (Qiagen), according to manufacturer's protocol. Prior to cDNA synthesis, 1 μ g of total RNA was treated with DNaseI (Invitrogen) and cDNA synthesis was carried out using the SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR, using oligo (dT) primer (Invitrogen).

The TSP2 transcript amplicon, was obtained after quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) amplification using the oligonucleotides pair: 5'-CCACTGCATCAAGGATAACTGC-3' (forward) and 5'-GTCATCATCACAGGCATCGC-3' (reverse). 18S rRNA was used as the internal control and was amplified with the following oligonucleotides pair: 5'-AACCCGTTGAACCCCAT-3' (forward) and 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' (reverse). All qRT-PCR reactions were conducted using the SYBR Green detection reagent (Applied Biosystems). Conditions for TSP2 and 18S PCR amplifications were: 50°C for 2 minutes and 94°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 94°C for 30 seconds, 53°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds. A final melting curve analysis was performed to determine amplification specificity (60–90°C with a heating rate of 0.2°C/sec and continuous fluorescence measurement). Relative gene expression of the target gene was calculated by using the $\Delta\Delta$ CT method.

TMA construction and immunohistochemistry

Tissue samples included on the TMA were obtained from the Hospital do Cancer A.C. Camargo, São Paulo, Brazil, and handled in accordance to its Institutional Ethics in Research Guidelines. This TMA included 270 prostate tissue samples, 204 from PCa and 66 from BPH tissues. Tissue samples were embedded in paraffin and fixed in formaldehyde. Haematoxylin and eosin stained sections of each case were analyzed, and a representative area of the disease was selected. Tissues corresponding to these areas were sampled from the donor block using a tissue microarrayer (Beecher Instruments, USA). Each sample was arrayed once with a 1.0 mm diameter core, spaced 0.2 mm apart. After the arraying was completed 4 μm thick sections were cut from the TMA blocks.

The expression of TSP2 protein was investigated in PCa and BPH tissue samples arranged on the TMA by immunohistochemistry, which was performed on duplicate tissue slides from two different cores. Duplicate sections were 40 μm apart. The slides were deparaffinized in xylol, re-hydrated in ethanol and subjected to antigen retrieval with citrate pH 6.0. The sections were incubated in 3% aqueous hydrogen peroxide and with Protein Block Serum-Free (Dako, Carpinteria, CA, USA). Tissue sections were incubated with the primary anti-TSP2 antibody (sc-12313 - Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:100 in "Antibody Diluent with Background Reducing Components" (Dako). The antigen-antibody complexes were visualized using Advance Detection System (Dako) followed by incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) tetrachloride (Dako). Then, tissue sections were counterstained with haematoxylin, dehydrated and mounted with a glass cover slip and xylol-based mounting

media. A colon cancer tissue sample was used as a negative control, where the primary specific antibody was substituted by non-immune serum.

Scoring TSP2 protein expression

Immunohistochemistry evaluation for TSP2 staining was performed using the Aperio automated microscope system (Aperio Technologies). In order to quantitatively measure TSP2 tissue staining, TMA slides were scanned by the Aperio ScanScope XT Slide Scanner, generating colored virtual slides, which were then analyzed with the ImageScope software. Tissue areas corresponding to tumor epithelia and stromal compartments were analyzed independently for TSP2 protein staining, by using the Positive Pixel Count algorithm v.9, which converts the color staining signal into a numerical measurement (immunoreactivity intensity and positivity). TSP2 staining score (TSP2 staining intensity X TSP2 staining positivity) was the variable chosen for this analysis, being the most representative variable for the biological aspects of tissue samples included in this study. TSP2 staining patterns for epithelial and stromal tissue compartments were analyzed separately for each tissue sample. TSP2 staining ratio between epithelial/stromal score was also assessed.

Statistical analysis

Analysis of the differences of TSP2 transcript or protein expression levels between prostate tissues and cell lines were performed using the Student's t-test or Mann-Whitney Test. ROC curves were constructed by plotting sensitivity x 1-specificity, and cut-off values were calculated based on the largest area

under the curve. Analysis of the association between TSP2 protein levels and the clinicopathological data of the patients was performed using the Mann-Whitney test. The following clinicopathological parameters were analyzed: pre surgical PSA (≤ 10 or > 10 ng/ml), Gleason score (≤ 6 , > 6), tumor staging ($\leq T2a$, $> T2a$), perineural invasion (yes or no), vascular invasion (yes or no), capsular invasion (yes or no), positive margins (yes or no), seminal vesicle invasion (yes or no), lymph node metastasis (yes or no), biochemical recurrence (yes or no) and clinical recurrence (yes or no). P-values are indicated in the text and Figure legends.

Results

TSP2 mRNA is down-regulated in PCa tissues and cell lines

In order to characterize the TSP2 expression pattern in PCa, TSP2 transcript levels were evaluated in human PCa tissues and cell lines, as compared to prostate non-malignant tissue samples and a non-tumoral cell line. Mean TSP2 mRNA expression levels were found to be significantly lower in PCa tissue samples, when compared to BPH samples ($P = 0.005$; Figure 1A). In order to further validate the observation of down-regulated TSP2 expression in PCa tissue samples, we assessed TSP2 mRNA levels in prostate tumoral and non-tumoral cell lines. Mean TSP2 mRNA expression levels were also significantly lower in PCa cell lines (LNCaP, DU145 and PC3), in comparison to an immortalized non-tumoral prostate cell line, PrEC ($P = 0.003$, $P = 0.012$, $P = 0.007$, respectively, Figure 1B). These data indicate that TSP2 transcript levels are down-regulated in PCa tissue and cell lines samples, as compared to non-malignant samples.

Next, we investigated the applicability of TSP2 transcript expression levels as an auxiliary tool to better distinguish PCa from BPH samples, based on the differential TSP2 expression pattern in these prostatic diseases. ROC curve analysis of the TSP2 expression levels was performed, in comparison to analysis of the pre-surgical serum PSA levels, to distinguish PCa from BPH patients (Figure 1C). TSP2 mRNA expression levels efficiently differentiated PCa from BPH tissue sample groups (AUC = 0.78; CI = 0.62 - 0.93; $P = 0.004$), performing better than serum PSA levels (AUC = 0.62; CI = 0.40 - 0.83; $P = 0.299$) in this group of samples analyzed. For the discrimination between PCa

and BPH, the TSP2 mRNA expression level cut-off value was 28.18, at which sensitivity was 87.50% (CI = 67.64% - 97.34%) and specificity was 61.54% (CI = 31.58% - 86.14%), whereas the serum PSA value cut-off was 4.64, with a sensitivity of 80.00% (CI = 51.91% - 95.67%) and a specificity of 27.27% (CI = 6.02% - 60.97%). The cut-off values were estimated in order to obtain the best discriminatory power between PCa and BPH patients. These results suggest that TSP2 transcript levels can distinguish between PCa and BPH tissue samples, and that TSP2 mRNA expression is a better parameter than pre-surgical serum PSA level measurement for the differential diagnosis of these prostatic diseases: The lowest TSP2 expression levels are associated with the presence of PCa, while the highest are associated with the presence of BPH.

TSP2 protein is expressed in epithelial and stromal cells in PCa and BPH samples

In order to further characterize TSP2 expression, we assessed TSP2 protein expression in a patient cohort, by using a prostate TMA approach, containing 204 PCa and 66 BPH tissue samples. In this assessment, we observed that an heterogeneous TSP2 staining was present in the majority of the prostate tissue samples analyzed. We detected TSP2 staining in both the epithelial and in the stromal compartments of BPH and PCa tissues, and the staining was dispersed throughout the cytoplasm (Figure 2).

TSP2 protein is down-regulated in the PCa stromal compartment

Quantification of TSP2 protein staining in both BPH and PCa tissues in the TMA tissue spots was performed by using a semi-automated cellular image

analysis system. Herein, TSP2 staining pattern was represented as the TSP2 staining score, as detailed in the Materials and Methods section. When comparing PCa and BPH epithelial cell compartments, no significant differences in TSP2 staining scores were observed [median and range; 49.44 (9.95-115.90); 44.95 (9.94-109.23), respectively; $P = 0.199$; Figure 3A). However, a significant decrease in the TSP2 staining score was observed in PCa stromal compartments, as compared to the same compartment in BPH samples [median and range; 50.20 (8.55-128.32); 63.56 (9.98-122.55), respectively; $P = 0.008$; Figure 3B and Figures 2A, 2B]. These data indicate that TSP2 protein expression is specifically down-regulated in the PCa stromal compartment, as compared to the stroma in BPH samples. In order to further investigate putative relationships between epithelial and stromal TSP2 protein expression for each PCa and BPH tissue samples, we also assessed the ratio between epithelial and stromal TSP2 staining score on these samples (Figure 3C). We found that the TSP2 epithelial to stromal median staining score ratio was higher in PCa tissues, as compared to BPH samples [median and range; 0.94 (0.45-3.93); median and range; 0.74 (0.39-1.55); $P < 0.001$], indicating that there is a higher differential TSP2 protein expression between epithelia and stromal compartments in PCa samples.

We also constructed ROC curves to compare the ability of epithelial, stromal and epithelial to stromal ratio TSP2 staining scores as parameters for the differential diagnosis of PCa and BPH (Figure 3D). Among the tested parameters, the TSP2 epithelial to stromal ratio performed best to differentiate PCa and BPH samples (AUC = 0.69; CI = 0.608-0.778). TSP2 epithelial and stromal staining scores presented significantly lower values (AUC = 0.55, CI =

0.464-0.649; AUC = 0.37, CI = 0.280-0.460), indicating that differential TSP2 expression between the epithelial and stromal compartments could be a key event modulating PCa progression.

The differential TSP2 protein expression in the PCa stroma compartment, when compared to BPH stroma, prompted us to investigate whether TSP2 expression in stroma of PCa samples correlated with a particular clinical behavior (Table 1). The stromal TSP2 staining score did not correlate with any clinicopathologic parameters analyzed. However, there was a positive association between epithelial TSP2 staining score with vascular invasion ($P = 0.034$) and biochemical recurrence ($P = 0.033$). The area under the ROC curve for the TSP2 epithelial staining score and the prediction of vascular invasion was 0.63 (CI = 0.534-0.740; Figure 4A), and for the prediction of biochemical recurrence was 0.61 (CI = 0.511-0.708; Figure 4B). These results suggest that in this PCa samples cohort, epithelial TSP2 staining score is positively associated with some PCa prognostic factors.

Discussion

The present study describes the first characterization of TSP2 expression in PCa and BPH samples and its potential application for their differential diagnosis. Furthermore, based on the expression pattern of TSP2 protein in both epithelia and stromal compartments of BPH and PCa human tissues, we provided the first evidences that may suggest TSP2 putative roles in PCa tumorigenesis and progression. We found herein that the TSP2 transcript is down-regulated in PCa tissues, when compared to BPH tissue samples and non-tumoral prostate cell lines. This finding is consistent with TSP2 down-regulation also found in other tumor types (Kodama et al. 2001; Oshika et al. 1998; Santin et al. 2004). Corroborating these data, other authors also demonstrated diminished TSP1 levels in PCa tissues and cell lines, when compared to BPH and non-tumoral prostate samples (Vallbo et al. 2004; Bastian et al. 2005). Some previous studies also investigated TSP2 transcript and/or protein expression in PCa samples (Vallbo et al. 2004; Vallbo and Damber 2005; Chandran et al. 2007; LaTulippe et al. 2002). However, TSP2 protein expression has not been observed in human prostatic tissues (Vallbo et al. 2004). Conversely, although identifying TSP2 expression in rat prostatic tissues, no differential expression has been observed between tumoral and non-tumoral prostate samples (Vallbo and Damber 2005).

We also report for the first time that TSP2 protein expression was detected both in epithelium and stroma tissue compartments of PCa and BPH tissues studied. Consistent with our findings, similar data have been observed in tumor and stroma from lung adenocarcinoma (Chijiwa et al. 2009). We also demonstrated that TSP2 expression is down-regulated in PCa stromal cells, as

compared to BPH stroma. Based on this, we propose that diminished TSP2 levels in PCa stroma could be favoring PCa progression, once TSP2 is associated with angiogenesis inhibition (Koch et al. 2011) and could be modulating PCa progression as the result of the balance between TSP2 and other angiogenic regulators produced by both epithelial and stromal cells. This hypothesis was further reinforced based on our finding that the TSP2 epithelial to stromal ratio is even higher in PCa samples, indicating that prostate malignancy could be related to higher TSP2 differential expression levels between epithelial and stromal compartments. It is possible that, in non-tumoral conditions, there is an ideal balance between TSP2 epithelial and stromal tissue compartments. As a result of signals favoring tumor progression, such as several inflammatory mediators (Chughtai et al. 2001), stromal cells may down-regulate TSP2 expression, disrupting the normal prostate tissue homeostasis. Previous data showed that androgen and hypoxia differentially modulate TSP1 expression in prostate tissues, producing opposite responses in epithelial and stromal cells and that the angiogenic response, *in vivo*, may be modified by epithelial and stromal cell interactions (Fitchev et al. 2010). Corroborating this hypothesis, it was demonstrated that stromal cells from the prostate transitional zone, associated with BPH, suppress PCa cell growth, while those from the peripheral zone, associated with PCa, increase the tumor growth (Zhao et al. 2009). These data provide further evidence that cells from the PCa stroma, having down-regulated TSP2 levels, are more likely to favor tumor angiogenesis and progression, as compared to BPH transitional stromal cells, which express higher levels of TSP2. Thus, based on our data, we hypothesized that the decreased TSP2 transcript expression observed in PCa samples, when

compared to BPH samples, could be the result of decreased TSP2 expression primarily expressed at the stromal compartment of PCa samples. This possibility was also reinforced once there were no significant differences in TSP2 protein expression levels at epithelial compartments when comparing PCa and BPH tissues.

There is substantial evidence that paracrine signaling between the stroma and epithelium is essential for normal glandular development, tissue homeostasis and also for the disease process (Timms et al. 2011). Based on our data, we hypothesize that the prostate tumor cells could be differentially modulating TSP2 levels in PCa stroma, as a mechanism favoring tumor progression. The observed down-regulation of TSP2 expression in PCa stromal cells is in accordance with previous data demonstrating that important modifications should occur in stromal cells in order to promote prostate carcinogenesis (Lopaczynski et al. 2001). TSP2 down-regulation in PCa stromal cells could be one of these events, which could stimulate prostate epithelial cells to acquire specific tumorigenic profiles (Vallbo and Damber 2005). Also in accordance with this hypothesis, it has been shown that stromal components of the tumor microenvironment, such as the ECM, cooperate with tumor cells in regulating tumor development, with prominent roles in the angiogenic process as well (Vong and Kalluri 2011). According to our findings demonstrating differential TSP2 expression between the BPH and PCa stromal compartments, we suggest that TSP2 could be one of the proteins altered in the process of reactive stroma formation, since TSP2 is one of the proteins able to modulate tumor angiogenesis.

Based on our findings of TSP2 down-regulation in PCa, as compared to BPH, and on current known limitations of serum PSA levels measurement to distinguish these two prostatic diseases, we investigated the value of differential TSP2 transcript expression levels to better distinguish PCa from BPH samples. Our analysis revealed that TSP2 transcript expression levels could better differentiate PCa and BPH, when compared to serum PSA level measurements, and could be used independently as a valuable tool for their differential diagnosis. In this cohort of samples, the use of TSP2 transcript expression levels to distinguish PCa and BPH groups was efficient, with a good sensitivity (87.5%) and a reasonable specificity (61.5%). Conversely, in the same patient cohort, the use of serum PSA levels had lower sensitivity (80.0%) and poorer specificity (27.5%) to distinguish PCa and BPH samples. Even though serum PSA level measurement is still the best biomarker for PCa screening, it lacks a good specificity value because PSA is also elevated in benign conditions, such as BPH, warranting the search for new biomarkers to improve diagnosis (Laxman et al. 2008). We propose that TSP2 could be further analyzed as a complement to potentially improve diagnosis of PCa and BPH. Future studies should be carried out in a different and larger patient cohort, in order to demonstrate the usefulness of tissue TSP2 transcript expression evaluation for PCa diagnosis.

In addition to evaluating TSP2 transcript levels for PCa and differential diagnosis, we also investigated whether using TSP2 protein staining scores could be an auxiliary approach for this purpose. Similarly to what has been observed for TSP2 transcript measurements, using TSP2 protein epithelial to stromal ratio, we could also improve the differential diagnosis of PCa and BPH,

as compared to epithelial or stromal staining patterns alone. We hypothesize that in situations where there is a larger difference between the TSP2 epithelial and stromal expression, PCa development could be favored. As observed in different cancer models, epithelial and stromal expression patterns of different cancer biomarkers, such as MCT4 (Witkiewicz et al. 2012), TSP1 (Ioachim et al. 2012) and caveolin-1 (Ciocca et al. 2012) have also demonstrated prognostic importance and key roles in cancer progression. Therefore, our data provide evidence that not only TSP2 transcript expression analysis of total prostate tissue extracts could improve PCa diagnostic parameters, but also the TSP2 epithelial to stromal ratio could be a new potential tool to improve PCa diagnosis.

Despite no difference was detected in TSP2 epithelial staining between PCa and BPH samples, our study also shows that there is a positive association between the TSP2 epithelial staining pattern in PCa tissues and vascular invasion and biochemical recurrence. Even though the epithelial TSP2 protein staining profile may not have any significant potential application to the differential diagnosis of PCa and BPH, it may be of prognostic significance. Our findings may suggest that, during PCa progression, tumor epithelial TSP2 could have a distinct role from that performed during prostate tumorigenesis, which could be associated with previous data demonstrating differential TSP2 expression between primary and metastatic PCa (Chandran et al. 2007; LaTulippe et al. 2002). Based on these data, we speculate whether epithelial and stromal TSP2 expression and their crosstalks could also be potential PCa therapeutic targets by using strategies to interrupt the cancer cell–stroma

interactions, enhancing the effectiveness of anti-angiogenic therapies, as proposed by others (Dayyani et al. 2011).

ACCEPTED MANUSCRIPT

Conclusions

In summary, the present study shows that TSP2 is down-regulated in PCa samples and cell lines, when compared to BPH and a non-tumor prostate cell line, respectively. In addition, we also demonstrated that this down-regulation is specially localized in PCa stromal cells, when compared to BPH stromal cells. This TSP2 down-regulated pattern in PCa cells, besides providing important implications for PCa and BPH differential diagnosis, could provide the first evidence about the involvement of epithelial and stromal TSP2 on modulating PCa progression. Furthermore, TSP2 down-regulation in the PCa stromal compartment indicates that this could be one of the events contributing to PCa promotion, possibly by inhibiting angiogenesis. Our data stress the importance of the stromal compartment in malignant tumors, and strongly indicate that continuous interactions between the carcinoma and stromal cells are prerequisites for carcinoma development and progression. Thus, it will be important to gain a better understanding of how stromal and epithelial TSP2 can reciprocally modulate PCa progression in future studies.

Conflict of interest:

Nothing to declare.

Acknowledgments

This project was supported by INCT for Cancer Control, CNPq, CAPES, FAPERJ, MS/FAF and Swiss Bridge Foundation. We thank Antonio Palumbo for assistance with the tissue microarray pictures, Thomas Radimerski for critical reading of the manuscript, and the patients who kindly accepted to participate in this study.

References

- Adams, J.C., 2001. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 25-51.
- Alcaraz, A., Hammerer, P., Tubaro, A., Schröder, F.H., Castro, R., 2009. Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur. Urol.* 55(4), 864-873.
- Armstrong, L.C., Bornstein, P., 2003. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol.* 22(1), 63-71.
- Ayala, G., Tuxhorn, J.A., Wheeler, T.M., Frolov, A., Scardino, P.T., Ohori, M., Wheeler, M., Spitzer, J., Rowley, D.R., 2003. Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 9(13), 4792-4801.
- Bastian, M., Steiner, M., Schuff-Werner, P., 2005. Expression of thrombospondin-1 in prostate-derived cell lines. *Int. J. Mol. Med.* 15(1), 49-56.
- Bertin, N., Clezardin, P., Kubiak, R., Frappart, L., 1997. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in normal, benign, and neoplastic human breast tissues: correlation with prognostic factors, tumor angiogenesis, and fibroblastic desmoplasia. *Cancer Res.* 57(3), 396-399.

Chandran, U.R., Ma, C., Dhir, R., Bisceglia, M., Lyons-Weiler, M., Liang, W., Michalopoulos, G., Becich, M., Monzon, F.A., 2007. Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. *BMC Cancer* 7, 64.

Chijiwa, T., Abe, Y., Inoue, Y., Matsumoto, H., Kawai, K., Matsuyama, M., Miyazaki, N., Inoue, H., Mukai, M., Ueyama, Y., Nakamura, M., 2009. Cancerous, but not stromal, thrombospondin-2 contributes prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Oncol. Rep.* 22(2), 279-283.

Chughtai, B., Lee, R., Te, A., Kaplan, S., 2001. Role of inflammation in benign prostatic hyperplasia. *Rev. Urol.* 13(3), 147-150.

Ciocca, D.R., Cuello-Carrión, F.D., Natoli, A.L., Restall, C., Anderson, R.L., 2012. Absence of caveolin-1 alters heat shock protein expression in spontaneous mammary tumors driven by Her-2/neu expression. *Histochem. Cell Biol.* 137(2), 187-194.

Cunha, G.R., Hayward, S.W., Dahiya, R., Foster, B.A., 1996. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat.* 155(1), 63-72.

Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70(9-10), 473-485.

Danielsen, J.M., Knudsen, L.M., Dahl, I.M., Lodahl, M., Rasmussen, T., 2007. Dysregulation of CD47 and the ligands thrombospondin 1 and 2 in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 138(6), 756-760.

Dayyani, F., Gallick, G.E., Logothetis, C.J., Corn, P.G., 2011. Novel therapies for metastatic castrate-resistant prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 103(22), 1665-1675.

Fitchev, P.P., Wcislak, S.M., Lee, C., Bergh, A., Brendler, C.B., Stellmach, V.M., Crawford, S.E., Mavroudis, C.D., Cornwell, M.L., Doll, J.A., 2010. Thrombospondin-1 regulates the normal prostate in vivo through angiogenesis and TGF-beta activation. *Lab. Invest.* 90(7), 1078-1090.

Hahn, W., Ho, S-H., Jeong, J-G., Hahn, E-Y., Kim, S., Yu, S.S., Kim, S., Kim, J-M., 2004. Viral vector-mediated transduction of a modified thrombospondin-2 cDNA inhibits tumor growth and angiogenesis. *Gene Ther.* 11, 739-745.

Hawighorst, T., Velasco, P., Streit, M., Hong, Y.K., Kyriakides, T.R., Brown, L.F., Bornstein, P., Detmar, M., 2001. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J.* 20(11), 2631-2640.

Ioachim, E., Damala, K., Tsanou, E., Briasoulis, E., Papadiotis, E., Mitselou, A., Charhanti, A., Doukas, M., Lampri, L., Arvanitis, D.L., 2012. Thrombospondin-1 expression in breast cancer: prognostic significance and association with p53

alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. *Histol. Histopathol.* 27(2), 209-216.

Koch, M., Hussein, F., Woeste, A., Gründker, C., Frontzek, K., Emons, G., Hawighorst, T., 2011. CD36-mediated activation of endothelial cell apoptosis by an N-terminal recombinant fragment of thrombospondin-2 inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.* 128(2), 337-346.

Kodama, J., Hashimoto, I., Seki, N., Hongo, A., Yoshinouchi, M., Okuda, H., Kudo, T., 2001. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in invasive cervical cancer: correlation with angiogenesis and prognosis. *Clin. Cancer Res.* 7(9), 2826-2831.

LaTulippe, E., Satagopan, J., Smith, A., Scher, H., Scardino, P., Reuter, V., Gerald, W.L., 2002. Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res.* 62(15), 4499-4506.

Laxman, B., Morris, D.S., Yu, J., Siddiqui, J., Cao, J., Mehra, R., Lonigro, R.J., Tsodikov, A., Wei, J.T., Tomlins, S.A., Chinnaiyan, A.M., 2008. A First-Generation Multiplex Biomarker Analysis of Urine for the Early Detection of Prostate Cancer. *Cancer Res.* 68, 645.

Lopaczynski, W., Hruszkewycz, A.M., Lieberman, R., 2001. Preprostatectomy: A clinical model to study stromal-epithelial interactions. *Urology* 57(4 Suppl 1), 194-199.

Noh, Y.H., Matsuda, K., Hong, Y.K., Kunstfeld, R., Riccardi, L., Koch, M., Oura, H., Dadras, S.S., Streit, M., Detmar, M., 2003. An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 121, 1536–1543.

Oshika, Y., Masuda, K., Tokunaga, T., Hatanaka, H., Kamiya, T., Abe, Y., Ozeki, Y., Kijima, H., Yamazaki, H., Tamaoki, N., Ueyama, Y., Nakamura, M., 1998. Thrombospondin 2 gene expression is correlated with decreased vascularity in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 4(7), 1785-1788.

Porkka, K.P., Pfeiffer, M.J., Waltering, K.K., Vessella, R.L., Tammela, T.L., Visakorpi, T., 2007. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 67(13), 6130-6135.

Santin, A.D., Zhan, F., Bellone, S., Palmieri, M., Cane, S., Bignotti, E., Anfossi, S., Gokden, M., Dunn, D., Roman, J.J., O'Brien, T.J., Tian, E., Cannon, M.J., Shaughnessy, J.Jr., Pecorelli, S., 2004. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int. J. Cancer* 112(1), 14-25.

Streit, M., Stephen, A.E., Hawighorst, T., Matsuda, K., Lange-Asschenfeldt, B., Brown, L.F., Vacanti, J.P., Detmar, M., 2002. Systemic inhibition of tumor growth and angiogenesis by thrombospondin-2 using cell based antiangiogenic gene therapy. *Cancer Res.* 62, 2004–2012.

Timms, B.G., Hofkamp, L.E., 2011. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation* 82(4-5), 173-183.

Tomas, D., Spajić, B., Milosević, M., Demirović, A., Marusić, Z., Kruslin, B., 2010. Intensity of stromal changes predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 44(5), 284-290.

Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., Smith, M.J., Smith, V.C., Dang, T.D., Rowley, D.R., 2002. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin. Cancer Res.* 8, 2912-2923.

Tuxhorn, J.A., McAlhany, S.J., Dang, T.D., Ayala, G.E., Rowley, D.R., 2002. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Res.* 62, 3298-3307.

Vallbo, C., Damber, J.E., 2005. Thrombospondins, metallo proteases and thrombospondin receptors messenger RNA and protein expression in different tumour sublines of the Dunning prostate cancer model. *Acta Oncol.* 44(3), 293-298.

Vallbo, C., Wang, W., Damber, J.E., 2004. The expression of thrombospondin-1 in benign prostatic hyperplasia and prostatic intraepithelial neoplasia is decreased in prostate cancer. *BJU Int.* 93(9), 1339-1343.

Vong, S., Kalluri, R., 2011. The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes Cancer* 2(12), 1139-1145.

Witkiewicz, A.K., Whitaker-Menezes, D., Dasgupta, A., Philp, N.J., Lin, Z., Gandara, R., Sneddon, S., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2012. Using the "reverse Warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle* 11(6), 1108-1117.

Yamashita, M., Zhang, X., Shiraishi, T., Uetsuki, H., Kakehi, Y., 2003. Determination of percent area density of epithelial and stromal components in development of prostatic hyperplasia in spontaneously hypertensive rats. *Urology* 61(2), 484-489.

You, J., Cozzi, P., Walsh, B., Willcox, M., Kearsley, J., Russell, P., Li, Y., 2010. Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 73, 10-22.

Zhang, L., Sun, S.K., Shi, L.X., Zhang, X., 2010. Serum cytokine profiling of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia using recombinant antibody microarray. *Zhonghua Nan Ke Xue* 16(7), 584-588.

Zhao, F.J., Han, B.M., Yu, S.Q., Xia, S.J., 2009. Tumor formation of prostate cancer cells influenced by stromal cells from the transitional or peripheral zones of the normal prostate. *Asian J. And.* 11(2), 176-182.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure Legends:

Figure 1 – TSP2 is down-regulated in PCa tissue samples and cell lines and differentiates PCa and BPH groups. A - Relative TSP2 expression levels were analyzed by qRT-PCR in PCa and BPH tissue samples, using 18S rRNA for normalization. The horizontal bars represent the mean expression values. A representative experiment of two independent experiments performed in triplicate is shown. B – Relative TSP2 expression levels in tumoral (LNCaP, DU145 and PC3) and non-tumoral (PrEC) prostate cell lines, using 18S rRNA for normalization. The histograms represent the mean relative expression values of three independent experiments performed in triplicate. Relative TSP2 expression level in the cell lines was determined as compared to LNCaP cell line, which was used as a reference in this assay. Error bars indicate the standard deviation. C - ROC curve discrimination of PCa and BPH patients according to TSP2 transcript expression levels (AUC = 0.78; CI = 0.62 - 0.93; P = 0.004) and pre-surgical serum PSA (AUC = 0.62; CI = 0.40 - 0.83; P = 0.299). * p <0.05; ** P <0.01.

Figure 2 - Immunohistochemical staining for TSP2 protein. TSP2 immunostaining in (A) benign prostatic hyperplasia (BPH), (B) prostate cancer (PCa), and (C) colon cancer negative control. Positive immunostaining for TSP2 is indicated in epithelial (arrowheads) and stromal (arrows) cells in BPH and PCa. The inset represents a twofold magnification of each tissue sample. All panels were haematoxylin counter-stained and used DAB as chromogen. Scale bars – 20 μ m.

Figure 3 - TSP2 expression is down-regulated in stromal cell compartments of PCa as compared to BPH tissues. A – Epithelial TSP2 staining score comparison between BPH [median and range; 44.95 (9.94-109.23)] and PCa [median and range; 49.44 (9.95-115.90)] tissue samples. B – Stromal TSP2 staining score comparison between BPH [median and range; 63.56 (9.98-122.55)] and PCa [median and range; 50.20 (8.55-128.32)] tissue samples. C – Epithelial/Stroma TSP2 staining score ratio at BPH [median and range; 0.74 (0.39-1.55)] and PCa [median and range; 0.94 (0.45-3.93)] tissue samples. D - ROC curve discrimination of PCa and BPH samples according to epithelial (AUC = 0.55, CI = 0.464-0.649), stromal (AUC = 0.37, CI = 0.280-0.460) and epithelial/stroma (AUC = 0.69; CI = 0.608-0.778) staining scores. ** P<0.01 *** P<0.001

Figure 4 – Epithelial TSP2 staining score is positively associated with clinicopathological features of PCa. A - ROC curve discrimination of PCa patients with or without vascular invasion according to epithelial TSP2 staining score (AUC = 0.63; CI = 0.534-0.740). B - ROC curve discrimination of PCa patients with or without biochemical recurrence according to epithelial TSP2 staining score (AUC = 0.61; CI = 0.511-0.708).

Table 1 – Epithelial and stromal TSP2 staining score association with PCa clinicopathological features

Characteristic	Epithelial TSP2 staining			Stromal TSP2 staining		
	no. cases	score	P-value	no. cases	score	P-value
PSA (ng/ml)						
≤ 10	67	48.2	0.82	66	47.9	0.43
> 10	65	49.1		61	55.5	
Gleason score						
≤ 6	107	48.1	0.88	102	50.3	0.51
> 6	21	48.6		21	41.3	
Staging						
T1, T2a	118	48.8	0.85	115	49.5	0.81
T2b, T3	13	50.1		11	60.0	
Perineural invasion						
No	98	46.3	0.77	93	57.2	0.09
Yes	29	50.7		29	47.3	
Vascular invasion						
No	26	44.0	0.03	26	47.3	0.15
Yes	91	54.8		89	59.9	
Capsular invasion						
No	57	46.3	0.27	56	52.7	0.77
Yes	53	57.4		52	54.4	
Positive margins						
No	41	48.8	0.59	40	51.2	0.58
Yes	82	51.8		81	46.4	
Seminal vesicle invasion						
No	15	48.6	0.68	15	50.3	0.57
Yes	119	52.1		114	44.5	
Lymph nodes invasion						
No	5	47.3	0.20	4	49.0	0.36
Yes	121	58.5		118	60.7	
Biochemical recurrence						
No	82	42.4	0.03	81	48.5	0.23
Yes	52	52.0		48	51.4	
Clinical recurrence						
No	13	47.7	0.09	13	49.3	0.29
Yes	120	56.5		116	61.0	

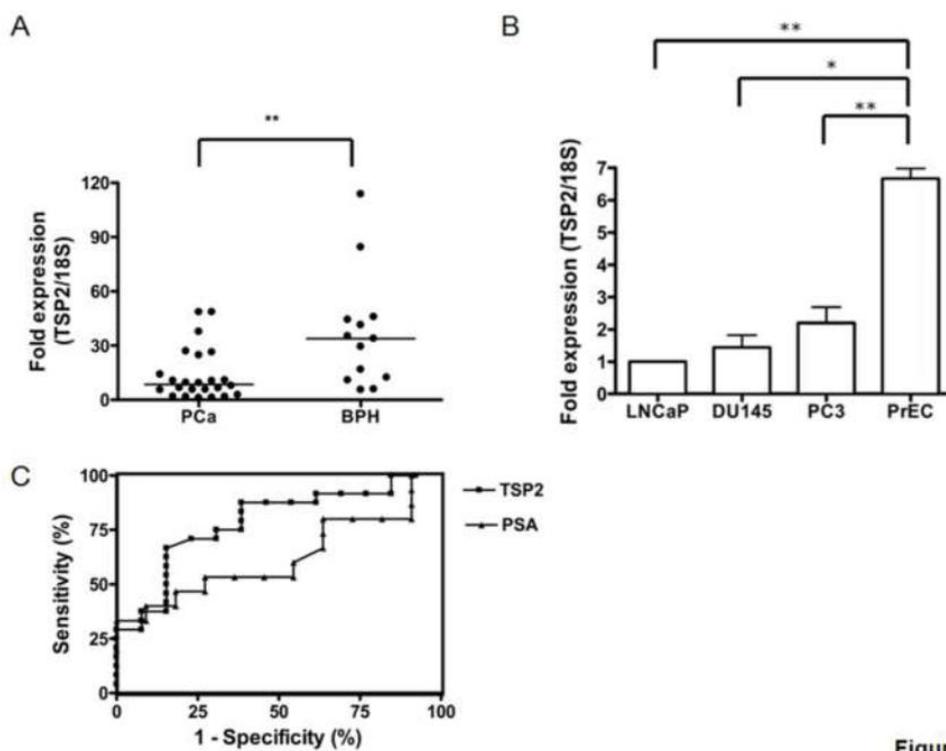


Figure 1

ACCEPTED

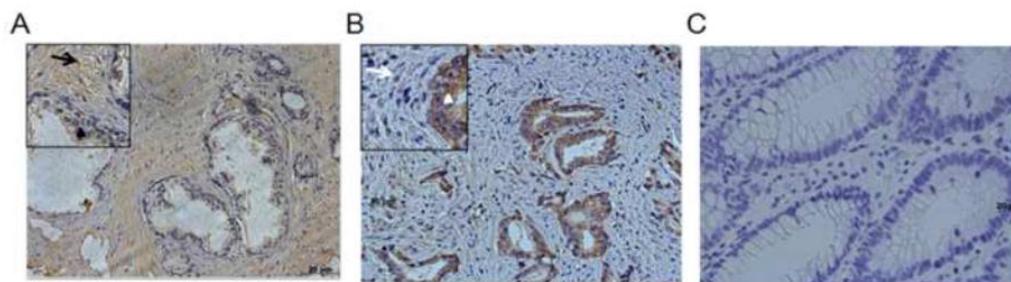


Figure 2

ACCEPTED

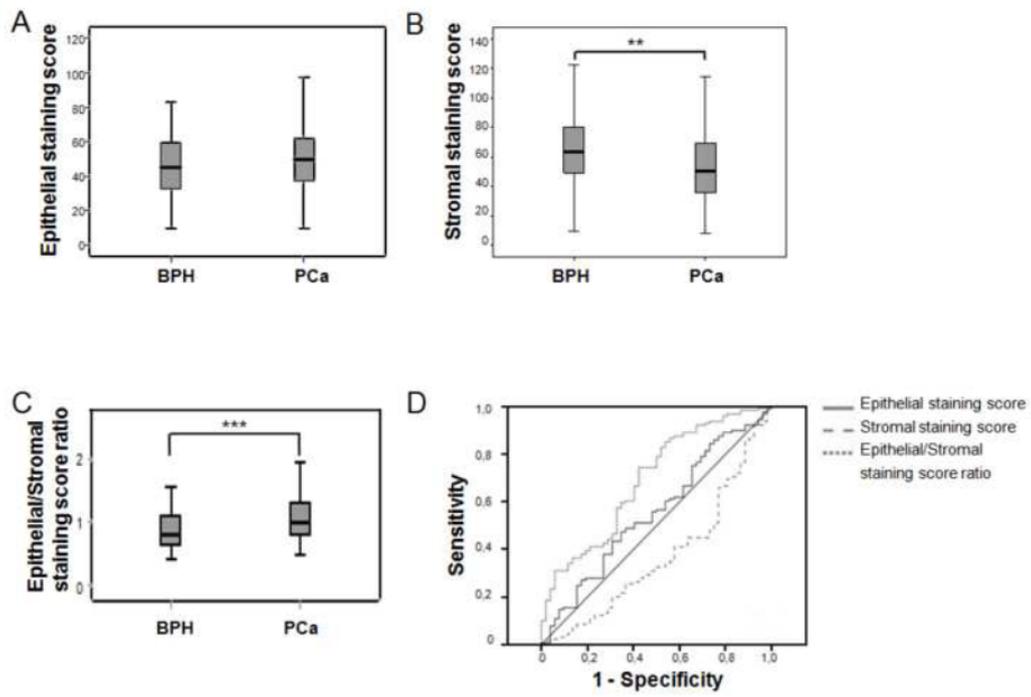


Figure 3

ACCEPTED

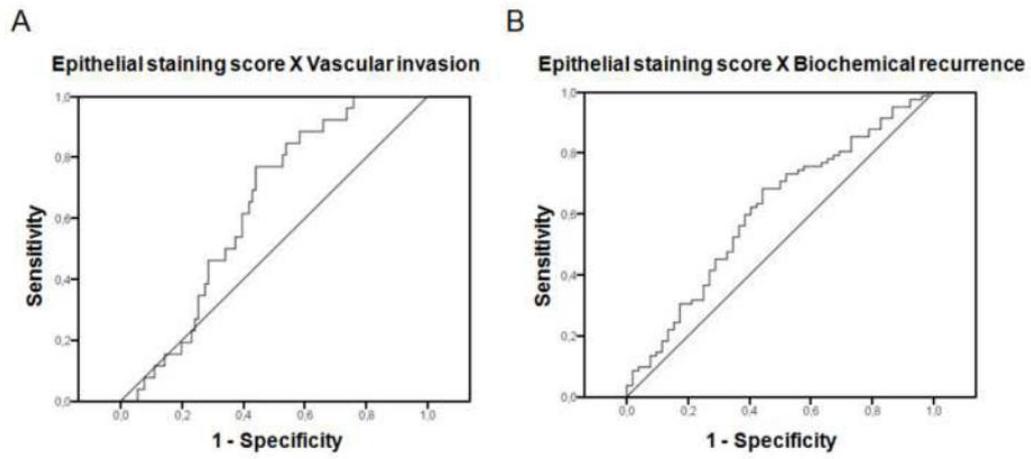


Figure 4

Highlights

- TSP2 is expressed in PCa and BPH.
 - TSP2 transcript is down-regulated in PCa, when compared to non-malignant samples.
 - TSP2 protein is expressed in stroma and epithelium in both PCa and BPH.
 - TSP2 protein is down-regulated in PCa stroma, as compared to BPH stroma.
- TSP2 expression has potential for differential diagnosis of PCa and BPH.

3. Materiais e Métodos complementares

3.1. Amostras teciduais

As amostras prostáticas foram obtidas através de colaboração com o Serviço de Urologia do Hospital Pedro Ernesto (UERJ), com o Serviço de Urologia do INCa e a com a Divisão de Patologia do INCa. Foram obtidos consentimentos livres e esclarecidos de todos os indivíduos incluídos neste projeto. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCa e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, segundo protocolo número 2701.

As amostras de tecidos tumorais de CaP ou adjacentes ao tumor incluídas neste estudo foram obtidas de pacientes submetidos à prostatectomia radical, não tendo sido submetidos a qualquer tipo de tratamento prévio à cirurgia. Todas as amostras foram coletadas durante a cirurgia e armazenadas a -20°C , em tubos contendo *RNAlater* (Ambion). Neste estudo, foram incluídas 24 amostras tumorais de CaP e 29 amostras não tumorais adjacentes ao tumor, sendo 14 delas pareadas, havendo tecido tumoral e adjacente ao tumor provenientes do mesmo paciente.

3.2. Extração de RNA total e síntese de cDNA

A partir das amostras teciduais, foi extraído RNA total, através da utilização do kit *RNeasy* (Qiagen), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. As amostras de RNA total foram dosadas, à 260 nm, no espectrofotômetro *NanoDrop* (Thermo Scientific). Para a síntese de cDNA, 1 μg de cada amostra de RNA total foi previamente tratada com DNaseI (Invitrogen), para degradação de DNA genômico contaminante proveniente da extração do RNA. Após o tratamento, foi feita a transcrição reversa para cDNA com a utilização de *SuperScript II First-Strand Synthesis System* (Invitrogen) para RT-PCR e oligonucleotídeos dT. Ao final, as amostras de cDNA sintetizadas foram novamente dosadas, à 260 nm.

3.3. PCR em tempo real

Para quantificar a expressão do transcrito de TSP2 nas amostras teciduais tumorais e adjacentes ao tumor, foi realizado PCR quantitativo em tempo real (qRT-

PCR), utilizando o sistema de detecção *SYBR Green*. A reação da PCR foi feita pela adição de 10 µL de *SYBR Green* (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems), 5 µL de uma mistura dos oligonucleotídeos dos dois sentidos de leitura, em uma concentração final na reação de 0,4 µM, e 5 µL de cada amostra de cDNA, a uma concentração final na reação de 32 ng/µL, estando em um volume final de 20 µL.

O programa de ciclagem utilizado para a reação do qRT-PCR para amplificação do TSP2 consiste em uma incubação inicial a 50°C por 2 minutos e 94°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 53°C por 30 segundos (anelamento dos oligonucleotídeos) e 72°C por 30 segundos (extensão), com leitura da fluorescência emitida pelas fitas duplas de DNA sintetizadas, ao final de cada ciclo. Após a reação de amplificação, foi realizada curva de dissociação, para determinação da especificidade da amplificação da reação de qRT-PCR. Para tanto, os fragmentos gerados pelas amplificações são submetidos a aumento gradativo da temperatura, desde 60°C até 90°C, com taxa de aquecimento de 0,2°C por segundo, e leitura da fluorescência a cada 0,2°C. A sequência dos oligonucleotídeos utilizados e o tamanho dos fragmentos amplificados estão listados na Tabela 1. O qRT-PCR foi realizado no aparelho *C1000 Thermal Cycler* (BioRad).

As amostras teciduais de próstata foram avaliadas em duplicatas, assim como os controles positivos e negativos de cada experimento. Para a padronização das condições qRT-PCR, foi utilizado cDNA da linhagem PC3 ou LNCaP, em diluições seriadas (64 ng/µL a 1 ng/µL), de forma a construir uma curva de correlação para TSP2 e seu gene normalizador, o 18S.

Foram realizadas análises estatísticas através do teste t de *Student's* para avaliar as diferenças do nível de expressão de TSP2 entre as amostras teciduais e verificar se existia associação entre o nível de expressão e as variáveis clínicas dos pacientes de CaP. O nível de significância adotado foi de 5%.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para o qRT-PCR de TSP2.

Gene	Nome do oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento amplificado
TSP2	THBS2F	CCACTGCATCAAGGATAACTGC	91 pb
	THBS2R	GTCATCATCACAGGCATCGC	
18S	18SF1	AACCCGTTGAACCCCAT	151 pb
	18SR1	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	

3.4. Detalhamento da construção e da análise dos ensaios de microarranjo de tecidos com imunohistoquímica para TSP2.

A fim de mensurar os níveis da proteína TSP2 em amostras teciduais de CaP e de HPB, foram realizados ensaios microarranjo de tecidos (TMA), com imunohistoquímica para TSP2, utilizando anticorpo policlonal anti-TSP2. Tais experimentos foram realizados em colaboração com o grupo do Dr. Fernando Soares, do Departamento de Anatomia Patológica, do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo, em São Paulo.

Todas as amostras utilizadas para a construção do TMA foram obtidas no Hospital do Câncer A. C. Camargo e manipuladas de acordo com as orientações de Ética em Pesquisa deste hospital. Dessa forma, foram utilizadas amostras teciduais prostáticas de 270 pacientes, dos quais 204 eram amostras teciduais de CaP e 66 de amostras de HPB, nos quais foi realizada prostatectomia retropúbica radical, no período entre 1992 e 2002. Todas as amostras de tecidos de CaP possuíam dados informativos sobre o grau histológico, pelo sistema de Escore de Gleason, e o estadiamento patológico, pelo Sistema de TNM, obtidos de relatórios patológicos médicos e cirúrgicos.

Os tecidos provenientes destes pacientes foram mantidos embebidos em parafina e fixados em formaldeído. Seções teciduais de cada caso foram coradas com hematoxilina e eosina e, em seguida, analisadas por um patologista, de forma a atestar a veracidade dos dados e selecionar regiões representativas dos tumores dentro de cada tecido. Os tecidos correspondentes a estas regiões foram retirados do bloco onde a amostra tecidual se encontrava, usando um instrumento manual de construção de microarranjos (Beecher Instruments, USA). As lâminas de TMA utilizadas neste estudo possuem 270 amostras teciduais medindo 1.0 mm de diâmetro e espaçadas entre elas por 0.2 mm. Após a finalização do microarranjo, seções com 4 µm de espessura foram cortadas dos blocos de TMA. Foram utilizadas lâminas em duplicata, sendo cada lâmina proveniente de cortes do tecido em profundidades diferentes, para garantir uma representatividade maior dos tecidos analisados. Neste estudo, as duplicatas das lâminas tinham separação de 40 µm.

Para a realização da imunohistoquímica, as lâminas sofreram, primeiramente, 3 banhos de 5 minutos em xilol, para desparafinização, e 4 banhos de imersão em etanol absoluto, para desidratação das amostras teciduais. A recuperação antigênica foi feita em sistema de alta pressão em solução de citrato de sódio 10 mM pH 6.0,

por 15 minutos. Em seguida, realizou-se bloqueio da peroxidase endógena, com 3 banhos de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 3%. O bloqueio de sítios de ligação inespecíficos para o anticorpo foi feito em banho em solução de bloqueio *Protein Block Serum-Free Ready-to-Use* (Dako), por 20 minutos, protegendo-se as lâminas da luz. Posteriormente, foi realizada incubação das lâminas com anticorpo primário policlonal anti-TSP2 (sc-12313 – Santa Cruz Biotechnology) diluído no reagente *Antibody Diluent with Background Reducing Components* (Dako), na proporção 1:100, por 2 horas.

Após a incubação das lâminas com o anticorpo primário, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com PBS, incubação de 20 minutos com cada reagente do Kit LSAB (Biotinylated Link Universal e Streptavidin-HRP – Dako), ocorrendo 3 lavagens de 5 minutos com PBS entre a adição de cada reagente e também ao final. Para a revelação dos sítios imuno-reativos, seguiu-se incubação por 5 minutos com solução 3,3'-diaminobenzidina (DAB) tetracloreto (Dako), o substrato cromogênico, na proporção 1:50. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, sendo realizada, em seguida, contra-coloração com hematoxilina de Harris por 2 minutos e posterior lavagem em água corrente. Ao final, as lâminas foram mergulhadas no diferenciador, lavadas por 5 minutos em água corrente e automaticamente montadas, no aparelho Tissue-Tek Prisma (Sakura Seiki Co., Ltda). Como controle negativo para a imunohistoquímica, foi utilizada uma amostra tecidual de câncer de cólon. O controle negativo foi realizado na ausência de incubação com o anticorpo primário. Ao final, alguns casos não puderam ser analisados para a marcação com o anticorpo, pois, em determinadas posições da lâmina de TMA, não havia amostras, devido a falhas no processamento do mesmo.

Para mensurar quantitativamente a marcação imunohistoquímica realizada, lâminas virtuais foram criadas a partir das lâminas marcadas, a partir do seu escaneamento pelo sistema *Aperio ScanScope XT Slide Scanner* (Aperio Technologies). O sistema gerou imagens digitais em cores de cada lâmina marcada, as quais foram visualizadas pelo programa *ImageScope v.10.2.2.2319* (Aperio Technologies), um programa de detecção de coloração, a partir da análise e quantificação de pixels das imagens escaneadas.

A partir daí, cada amostra de tecido no TMA foi analisada para a avaliação da coloração da marcação. Para tanto, foram selecionadas, separadamente, regiões representativas de tecido tumoral ou tecido estromal de cada amostra tecidual, com

a ferramenta de seleção manual do programa (Figura 14). A marcação tecidual de TSP2 foi analisada para cada região tumoral ou estromal, de maneira independente, em cada tecido, utilizando o algoritmo *Positive Pixel Count v.9* (Aperio Technologies) do programa. Este algoritmo converte o sinal de coloração em uma medição numérica (intensidade e positividade de marcação). O escore de marcação de TSP2 (intensidade de marcação de TSP2 X positividade de marcação de TSP2) foi a variável escolhida para esta análise, sendo a variável mais representativa dos aspectos biológicos das amostras de tecido deste estudo. A razão da marcação de TSP2 entre epitélio/estroma também foi avaliada. A positividade da marcação é uma medida da relação entre a área marcada positivamente para o anticorpo anti-TSP2 e a área total selecionada.

As análises estatísticas do nível de expressão de TSP2 entre os tecidos de CaP e HPB foram realizadas com os teste t de Student's ou o teste de Mann-Whitney. As curvas do tipo *Receiver Operating Curve* (ROC) foram construídas através da representação gráfica da sensibilidade x 1-especificidade e os valores de corte foram calculados a partir da maior área sob a curva. Análise da associação entre os níveis de proteína TSP2 e os dados clínico-patológicos dos pacientes foi feita através do teste de Mann-Whitney. Os seguintes parâmetros clínico-patológicos foram analisados: PSA pré-cirúrgico (≤ 10 , > 10 ng/mL), escore de Gleason (≤ 6 , > 6), estadiamento do tumor ($\leq T2a$, $> T2a$), invasão perineural (sim ou não), invasão vascular (sim ou não), invasão capsular (sim ou não), margens positivas (sim ou não), invasão da vesícula seminal (sim ou não), metástases linfonodais (sim ou não), recorrência bioquímica (sim ou não) e recorrência clínica (sim ou não).

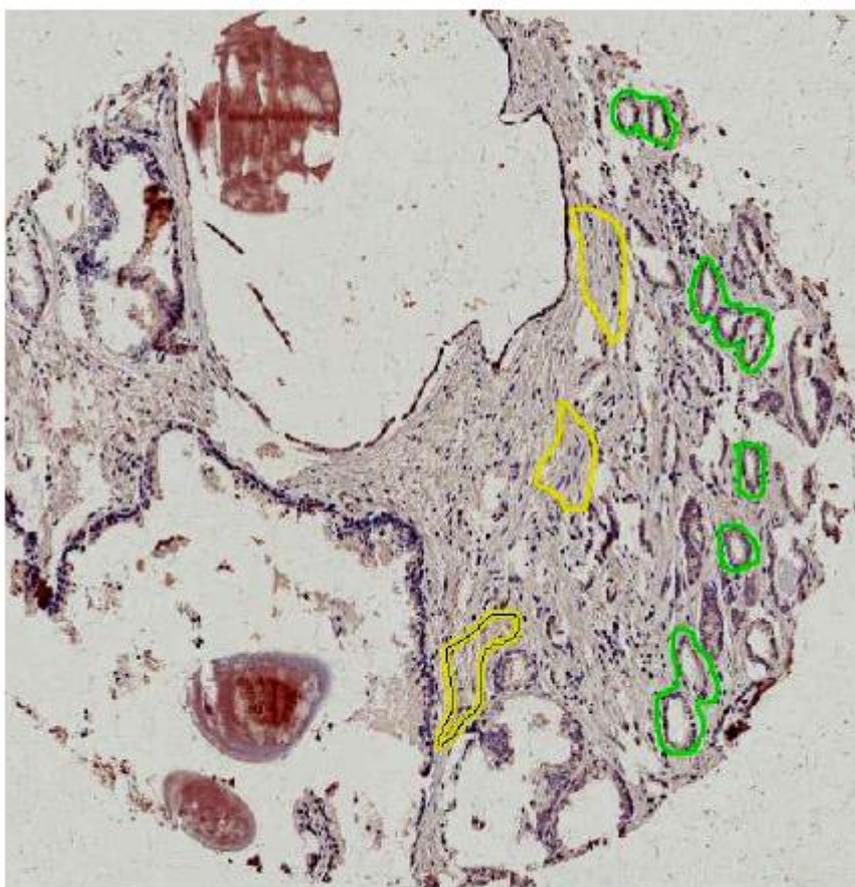


Figura 14. Figura representativa de uma amostra tecidual de CaP e a seleção de suas regiões tumorais e estromais. As amostras teciduais de CaP e HPB contidas no TMA de próstata deste estudo foram submetidas a imunohistoquímica com anticorpo anti-TSP2 e contra-coloração com hematoxilina. A seleção manual das regiões tumorais (seleção em verde) e estromais (seleção em amarelo) foi feita com a ferramenta de seleção do programa ImageScope (Aperio Technologies). Para cada conjunto de regiões, tumorais ou estromais, foram gerados os dados de intensidade e positividade da marcação de TSP2. Magnificação original 20X.

3.5. Cultura de células

Para a análise da expressão da proteína TSP2, foram utilizadas as linhagens celulares LNCaP, DU145 e PC3, provenientes de metástases linfonodais, cerebrais e ósseas do CaP, e a linhagem A2058, proveniente de melanoma, a qual foi utilizada como controle positivo da expressão de TSP2. As linhagens celulares LNCaP e PC3 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich), a linhagem DU145 foi cultivada em meio EMEM (Gibco) e a linhagem A2058 foi cultivada em meio DMEM (Gibco). Em todos os meios de cultura, houve suplementação com 10% de soro fetal de bezerro (FCS) inativado, 2 mmol/L de L-glutamina, 1% de piruvato de sódio e 1% (v/v) penicilina/estreptomicina. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

3.6. Extração e quantificação de proteínas

Para a extração de proteínas das linhagens citadas, as células foram mantidas em cultura até atingirem cerca de 80% de confluência, quando então foram retiradas da placa de cultura, com tripsina-EDTA 0,25% (Gibco), centrifugadas a 1500 rotações por minuto (RPM), por 5 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 3 mL de PBS ao precipitado celular formado, com posterior homogeneização e nova centrifugação a 1500 RPM, por 5 minutos. Em seguida, nova retirada do sobrenadante foi realizada e foram adicionados 100 µl de tampão de lise [50 mM Tris pH 7,5, 120 mM NaCl, 20 mM NaF, 1 mM EDTA pH 7,4, 6 mM EGTA pH 7-8, 15 mM pirofosfato de sódio, 1 mM benzamidina, 1% NP-40, 1 tablete de coquetel de inibidores de protease (Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche), 0,1 mM PMSF, 0,5 mM vanadato] as amostras, as quais foram armazenadas a -80°C, para posterior quantificação.

Para a determinação da quantificação do extrato total de proteínas, foi utilizado o kit BCA (Bio-Rad), através de ensaio colorimétrico. Para tanto, as amostras foram descongeladas, mantidas em gelo, e centrifugadas a 10.000 RPM, por 10 minutos, a 4°C, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo. Foi preparada uma curva padrão de BSA, com concentrações de BSA entre 2 mg/mL e 0,0625 mg/mL, em duplicata. As amostras foram analisadas em duplicata, em diluição de 1:5. Foram adicionados os reagentes do kit BCA (solução cúprica e solução de BCA) e as amostras com os reagentes foram postos em incubadora, a 37°C, por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram quantificadas, no espectrofotômetro, a 540 nm.

3.5. Detecção de TSP2 por imunoblot

Com o objetivo de realizar o imunoblot para determinar a expressão da proteína TSP2 nas linhagens citadas, foram utilizados 40 µg do extrato total de proteínas das amostras. As amostras foram aquecidas a 70°C por 10 minutos e resolvidas em Geis Midi Bis-Tris NuPAGE Novex gradiente de 4% a 12% (Invitrogen) por, aproximadamente, 1 hora e 30 minutos, a 130 Volts. Em seguida, foi realizada transferência das proteínas do gel para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) em tampão de transferência (0,58% de Tris-HCl, 0,29% de

glicina, 0,037% SDS e 20% de metanol), em sistema semi-seco. Em seguida, a membrana foi bloqueada, sob agitação, por 1 hora, em solução de leite desnatado 5%, diluído em tampão PBS Tween 0,01%. Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário anti-TSP2 (sc-136238 – Santa Cruz Biotechnologies), diluído 1:1000 em solução de bloqueio, ou o anticorpo primário anti-tubulina (T4026 - Sigma), diluído 1:5000 em solução de bloqueio, à 4°C, *overnight*, sob agitação. Após 4 lavagens de 5 minutos com PBS Tween 0,01%, sob agitação, as membranas foram incubadas, por 1 hora, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à peroxidase, diluído 1:2000. Após 4 lavagens de 10 minutos com PBS Tween 0,01%, a interação antígeno-anticorpo foi visualizada através da revelação das reações com o kit *ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare). A seguir, foi feita exposição da membrana a filmes sensíveis à quimioluminescência (KODAK BioMax Light Film – Sigma).

4. Resultados complementares

4.1. A expressão de TSP2 encontra-se similar em amostras teciduais de CaP e de tecido adjacente ao tumor.

Além da avaliação da expressão de TSP2 entre amostras teciduais de CaP e HPB, conforme descrito no artigo aceito para publicação, investigamos também o nível de expressão do transcrito TSP2 em amostras teciduais de CaP, em comparação com amostras não tumorais de tecido adjacente ao tumor. Nestas análises, não foram observadas diferenças significativas com relação ao nível de expressão de TSP2 entre estes dois grupos de amostras teciduais ($p = 0.4625$) (Figura 15a). A seguir, foram avaliadas as amostras pareadas, do mesmo doador, provenientes de tecidos tumorais de CaP e tecidos não tumorais adjacentes ao tumor (Figura 15b). Dentre as amostras pareadas analisadas, 57% delas apresentaram níveis semelhantes de expressão do transcrito TSP2. Por outro lado, em 14% das amostras analisadas, houve maior expressão de TSP2 no tecido tumoral de CaP, em relação ao tecido não tumoral adjacente. Em 29% das amostras, observou-se maior expressão de TSP2 no tecido não tumoral adjacente ao tumor, em comparação com o tecido tumoral de CaP (Tabela 2).

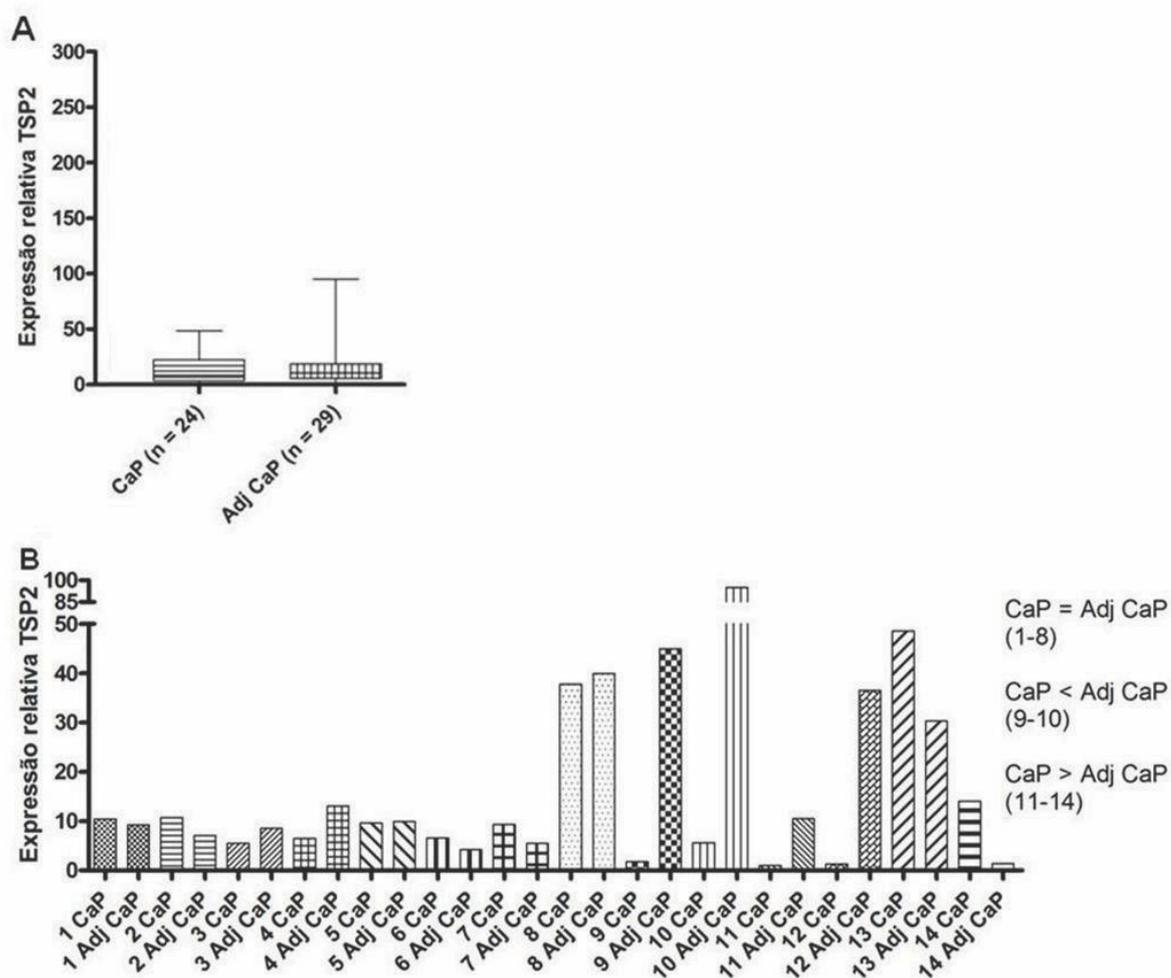


Figura 15. Expressão relativa de TSP2 em amostras teciduais tumorais de CaP e amostras não tumorais adjacentes ao tumor. O nível de expressão de TSP2 foi analisado por qRT-PCR, tendo como gene normalizador o 18S. A expressão relativa de TSP2 nas amostras foi determinada em comparação com uma amostra tecidual de CaP que foi usada como referência, neste ensaio. A - Expressão de TSP2 em amostras teciduais prostáticas de CaP e de tecido adjacente ao tumor (Adj CaP). O histograma representa os valores de média da expressão relativa de dois experimentos independentes realizados com amostras em triplicata. As barras de erro representam o desvio padrão. B - Expressão de TSP2 em amostras teciduais tumorais de CaP e não tumorais de tecido adjacente ao tumor (Adj CaP), pareadas individualmente, sendo provenientes do mesmo doador. Experimento representativo de dois experimentos independentes, realizados em triplicata.

Tabela 2 - Proporção do nível de expressão relativa de TSP2 entre amostras teciduais de CaP e não tumorais de tecido adjacente ao tumor (Adj CaP), pareadas individualmente.

Nível expressão TSP2	CaP = Adj CaP	CaP > Adj CaP	CaP < Adj CaP
Amostras pareadas (%)	8 (57%)	2 (14%)	4 (29%)

4.2. A expressão do transcrito TSP2 não se correlaciona com dados clínico-patológicos dos pacientes de CaP.

Uma vez que foi observada a diminuição dos níveis do transcrito TSP2 nas amostras teciduais de CaP, em comparação com as amostras teciduais de HPB, tornou-se interessante verificar se o nível de expressão de TSP2 se correlacionaria com dados clínico-patológicos disponíveis dos pacientes deste grupo. Os parâmetros incluídos nas análises foram: PSA sérico pré-cirúrgico (< 10, > 10 ng/mL), escore de Gleason (≤ 6 , ≥ 7) e idade ao diagnóstico (< 70 ou ≥ 70 anos) (Figura 16). Não foi encontrada nenhuma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão do transcrito TSP2 e os dados clínico-patológicos analisados, sugerindo que os níveis de expressão do transcrito TSP2 não apresentariam potencial aplicação como fator de avaliação prognóstica no CaP.

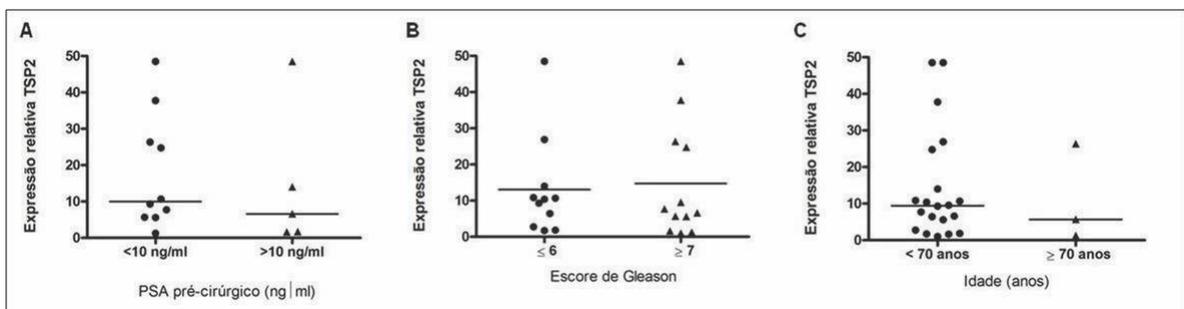


Figura 16. O nível de expressão do transcrito TSP2 não se correlaciona com os dados clínico-patológicos dos pacientes de CaP. O nível de expressão de TSP2 foi analisado por qRT-PCR tendo como gene normalizador o 18S e correlacionado com os dados clínico-patológicos das amostras teciduais provenientes dos pacientes de CaP. A expressão relativa de TSP2 nas amostras foi determinada em comparação com uma amostra tecidual de CaP que foi usada como referência, neste ensaio. A barra horizontal representa a média dos valores encontrados. Experimento representativo de dois experimentos independentes, realizados com as amostras em triplicata. Correlação do nível de expressão do transcrito TSP2 com os PSA pré-cirúrgico (A), escore de Gleason (B) e idade (C).

4.3. A expressão da proteína TSP2 não foi detectada por imunoblot em linhagens tumorais de CaP

Uma vez que caracterizamos que o nível de expressão do transcrito TSP2 encontra-se diminuído nas linhagens de CaP, em comparação com linhagem não tumoral, tornou-se importante caracterizar a expressão da proteína TSP2 nas mesmas linhagens. Para tanto, avaliamos as linhagens disponíveis para o estudo, LNCaP, DU145 e PC3, as quais são linhagens tumorais de CaP, e a linhagem A2058, uma linhagem tumoral de melanoma que possui altos níveis de expressão

de TSP2, sendo utilizada como controle positivo da análise. Por meio de ensaios de imunoblot, avaliamos a expressão da proteína TSP2 nas linhagens citadas. Através de ensaios de imunoblot, não foi possível detectar a expressão de TSP2 nas linhagens tumorais de próstata estudadas, apesar da sua detecção na linhagem A2058 (Figura 17). Assim sendo, este resultado corrobora com os dados obtidos previamente com relação aos baixos níveis de expressão do transcrito TSP2 nestas linhagens.

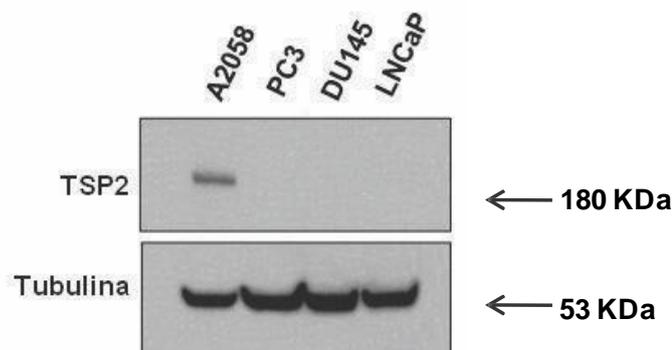


Figura 17. Caracterização da expressão da proteína TSP2 em linhagens celulares tumorais prostáticas. Experimento representativo da análise da expressão da proteína TSP2 foi analisada por imunoblot utilizando anticorpo anti-TSP2 (sc-136238 – Santa Cruz Biotechnologies) em extrato total de proteínas das linhagens tumorais de CaP, LNCaP, DU145 e PC3. A linhagem A2058 foi utilizada como controle positivo para a expressão de TSP2. A expressão de tubulina (T4026 - Sigma) foi utilizada como controle da corrida.

4.4. Análises adicionais da expressão da proteína TSP2 nos tecidos de CaP e HPB.

Para caracterizar a expressão da proteína TSP2, avaliamos a expressão da proteína TSP2 em amostras teciduais de CaP e HPB, através de imunohistoquímica, na forma de ensaios de TMA. Conforme apresentamos anteriormente, a expressão de TSP2 foi observada no compartimento estromal e no compartimento epitelial glandular tumoral dos tecidos estudados. O perfil de expressão da proteína TSP2 encontra-se diminuído no compartimento estromal das amostras teciduais de CaP, em relação as amostras de HPB. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas na expressão de TSP2 no compartimento epitelial glandular tumoral entre as amostras teciduais de CaP e HPB. Além disso, o escore de marcação estromal de TSP2 não se correlacionou com nenhum parâmetro clínico-patológico analisado. Porém, foi observada associação positiva entre o escore de marcação epitelial de TSP2 e a invasão vascular e a recidiva bioquímica (MATOS e cols, 2013).

De maneira adicional, representamos as 204 amostras de CaP e 66 de HPB (Figura 18). Além disso, vale acrescentarmos que nem todas as células epiteliais e estromais das amostras de CaP e HPB expressavam TSP2 e níveis variáveis de intensidade de marcação para esta proteína foram observados (Figura 19). Desta forma, o perfil de marcação de TSP2 nestas amostras mostrou-se heterogêneo.

Adicionalmente, realizamos análises da associação entre a razão do escore de marcação epitélio/estroma e os dados clínico-patológicos disponíveis (Tabela 3). Também investigamos, através de análise de curva ROC, a capacidade do nível de expressão da proteína TSP2 em prever outros dados clínicos correlacionados com o prognóstico dos pacientes de CaP. Esta análise de predição poderia ser de grande valia para entender o perfil de expressão da proteína TSP2 ao longo da progressão da doença, avaliando-se seu potencial preditivo de evolução da doença. Os parâmetros avaliados para estas potenciais correlações foram os citados na seção materiais e métodos, acima. Dessa forma, apresentamos, na tabela 4, os valores de acurácia, medida pela área sob a curva, para as curvas ROC do escore de marcação epitelial, do escore de marcação estromal e da razão do escore e a predição dos dados clínico-patológicos analisados. Por esta tabela, podemos observar que pode ser feita a associação do escore de marcação de TSP2 com a predição de alguns parâmetros analisados, visto que apresentaram acurácia superior ao valor mínimo, de 0,6. Assim, o escore da marcação epitelial de TSP2 poderia prever invasão vascular (AUC = 0,636), invasão linfonodos (AUC = 0,655), recorrência bioquímica (AUC = 0,614) e recorrência clínica (AUC = 0,652). Já o escore da marcação estromal de TSP2 poderia prever invasão de linfonodos (AUC = 0,630). E a razão do escore da marcação epitélio/estroma de TSP2 poderia prever invasão das vesículas seminais (AUC = 0,622). Estes resultados sugerem que, neste grupo de pacientes de CaP estudados, existe associação da marcação de TSP2 e a predição de fatores prognósticos do CaP.

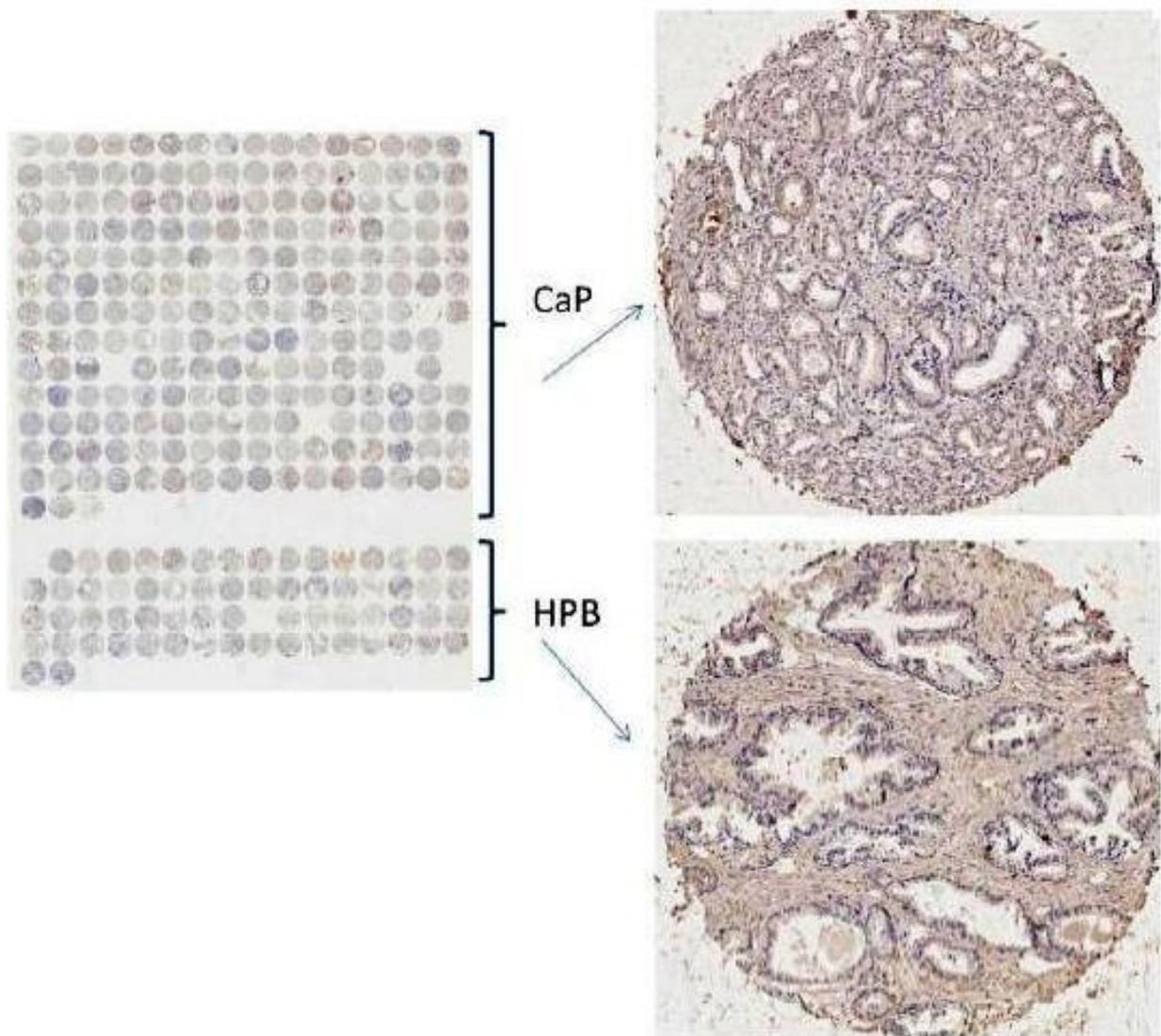


Figura 18. Esquema de uma seção do TMA utilizado para avaliar a marcação da proteína TSP2 nos tecidos prostáticos. À esquerda, fotografia de uma seção do TMA escaneada. O TMA utilizado foi composto de 204 amostras teciduais de CaP e 66 amostras teciduais de HPB. Magnificação original 4X. À direita, exemplos de amostras teciduais de CaP e HPB, em aumento de 20X. Marcação com anticorpo anti-TSP2 e contra-coloração com hematoxilina.

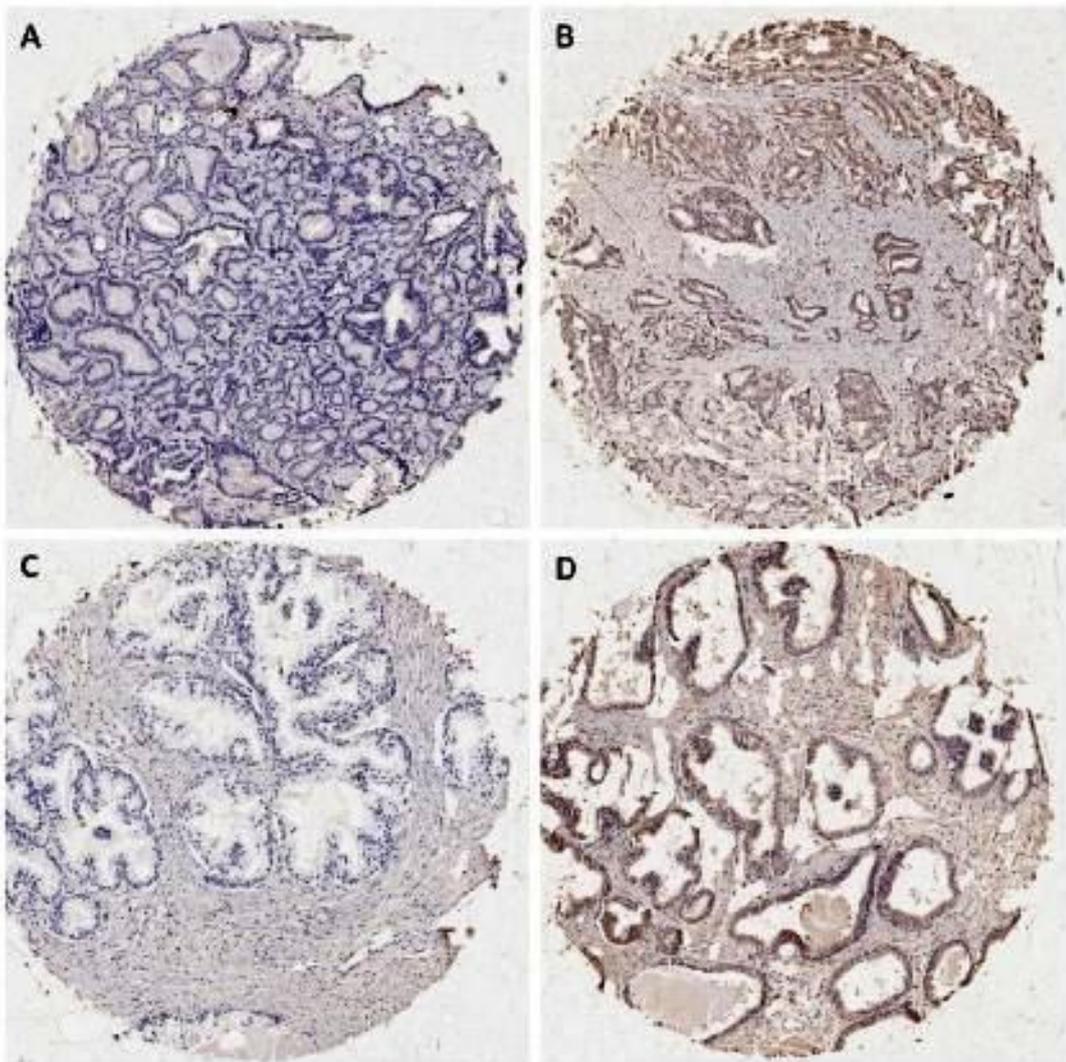


Figura 19. Foto representativa mostrando a marcação heterogênea para a proteína TSP2 em amostras teciduais de CaP e HPB, no TMA utilizado. Amostras teciduais de CaP e HPB do TMA foram submetidas a imunohistoquímica com anticorpo anti-TSP2 e contra-coloração com hematoxilina. A e C – Marcação com intensidade fraca, em amostras de CaP e HPB, respectivamente. B e D - Marcação com intensidade forte, em amostras de CaP e HPB, respectivamente. Magnificação original 20X.

Tabela 3 – Análise da associação da mediana da razão do escore de marcação epitélio/estroma de TSP2 e os dados clínico-patológicos dos pacientes de CaP.

Características	Razão escore epitélio/estroma		
	n. casos	Escore e intervalo	Valor de P
PSA (ng/mL)			
< 10	66	0,94 (0,52 – 3,94)	0,54
> 10	61	0,92 (0,45 – 2,43)	
Escore de Gleason			
< 6	102	0,93 (0,45 – 3,93)	0,31
> 6	21	0,97 (0,66 – 1,63)	
Estadiamento			
T1, T2a	115	0,94 (0,45 – 3,93)	0,85
T2b, T3	11	0,94 (0,57 – 1,55)	
Invasão Perineural			
Não	29	0,92 (0,45 – 2,12)	0,16
Sim	93	0,96 (0,51 – 3,93)	
Invasão Vascular			
Não	89	0,94 (0,45 – 2,43)	0,31
Sim	26	1,00 (0,61 – 3,93)	
Invasão Capsular			
Não	52	0,93 (0,45 – 1,87)	0,31
Sim	56	0,98 (0,57 – 3,93)	
Margens Positivas			
Não	81	0,92 (0,45 – 3,93)	0,23
Sim	40	1,02 (0,53 – 2,06)	
Invasão Vesículas Seminais			
Não	114	0,93 (0,45 – 3,93)	0,12
Sim	15	1,05 (0,61 – 2,12)	
Invasão Linfonodos			
Não	118	0,93 (0,45 – 3,93)	0,89
Sim	4	0,87 (0,68 – 1,42)	
Recorrência Bioquímica			
Não	48	0,83 (0,45 – 3,93)	0,18
Sim	81	0,96 (0,49 – 2,61)	
Recorrência Clínica			
Não	116	0,93 (0,45 – 3,93)	0,62
Sim	13	0,94 (0,61 – 1,87)	

Tabela 4 – Valores de área sob a curva, para as curvas ROC das medianas do escore de marcação epitelial de TSP2, do escore de marcação estromal de TSP2 e da razão do escore epitélio/estroma de TSP2 e os dados clínico-patológicos das amostras de CaP.

Características	Área sob a curva da curva ROC		
	Escore epitélio	Escore estroma	Razão escore epitélio/estroma
PSA (≤ 10 , > 10 ng/mL)	0,512	0,540	0,448
Escore de Gleason (≤ 6 , > 6)	0,514	0,455	0,570
Estadiamento ($\leq T2a$, $\geq T2b$)	0,476	0,521	0,483
Invasão Perineural (sim ou não)	0,517	0,439	0,589
Invasão Vascular (sim ou não)	0,636	0,591	0,565
Invasão Capsular (sim ou não)	0,598	0,551	0,549
Margens Positivas (sim ou não)	0,522	0,469	0,567
Invasão Vesículas Seminais (sim ou não)	0,539	0,455	0,622
Invasão Linfonodos (sim ou não)	0,655	0,630	0,479
Recorrência Bioquímica (sim ou não)	0,614	0,563	0,570
Recorrência Clínica (sim ou não)	0,652	0,588	0,542

Capítulo 2 – Investigação do possível papel funcional de TSP2 no CaP.

Anteriormente, observamos que TSP2 possui menor expressão nas amostras teciduais e linhagens de CaP, em comparação com amostras teciduais de HPB e linhagens não tumorais prostáticas (MATOS e cols, 2013). A partir daí, tornou-se interessante investigar o possível papel funcional de TSP2 em células de CaP, através da avaliação dos efeitos celulares após o tratamento com recTSP2. Além disso, investigamos os mecanismos moleculares e vias envolvidas com os efeitos celulares observados, através da determinação do perfil fosfo-proteômico de linhagem celular de CaP tratada com recTSP2.

Assim, para a investigação do possível papel funcional de TSP2 no CaP, avaliamos os efeitos celulares do tratamento com recTSP2 nas linhagens de CaP, DU145 e PC3. Avaliamos algumas das principais características do desenvolvimento tumoral, que são a viabilidade celular aumentada e a resistência a morte celular. Nos modelos experimentais utilizados, observamos que o tratamento com recTSP2 levou a uma diminuição da viabilidade das células PC3 e DU145. Além disso, a análise de ciclo celular das células PC3 e DU145 após o tratamento com recTSP2 mostrou aumento no percentual de células em fase sub-G1 do ciclo celular. Em conjunto, estes resultados indicam que o tratamento com recTSP2 induz ao aumento do processo de indução a morte celular e/ou a parada na progressão do ciclo celular nas células de CaP estudadas.

De forma a elucidar alguns dos mecanismos moleculares envolvidos com os efeitos celulares observados após o tratamento com recTSP2, realizamos uma análise de fosfo-proteômica, utilizando um microarranjo contendo anticorpos para 46 proteínas fosforiladas presentes em vias de sinalização celulares. Nestas análises, encontramos alteração dos níveis de fosforilação de várias proteínas envolvidas em vias de sinalização importantes para processos celulares. Dentre elas, os resíduos das proteínas ERK1/2 e JNK encontravam-se com menor nível de fosforilação nas células tratadas com recTSP2, em comparação com células controle, não tratadas. Entretanto, os resíduos das proteínas Akt, p70 S6, p53, paxilina, RSK1/2/3 e p27 possuíam maior nível de fosforilação após o tratamento com recTSP2.

Os resultados gerados por este estudo fazem a primeira descrição da potencial função de TSP2 no CaP, reforçando a possibilidade de TSP2 ser um inibidor tumoral em células de CaP, o que já foi demonstrado para outros tipos tumorais.

2 – Objetivos específicos

✓ Investigar o possível papel funcional de TSP2 em células de CaP através da avaliação dos efeitos celulares do tratamento com TSP2 recombinante.

✓ Determinar o perfil fosfo-proteômico de linhagem celular de CaP após tratamento com TSP2 recombinante.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultura de células

Neste estudo, foram utilizadas as linhagens celulares DU145 e PC3, provenientes de CaP. A linhagem celular PC3 foi cultivada em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) e a linhagem DU145 foi cultivada em meio EMEM (Gibco). Aos meios de cultura, houve suplementação com 10% de soro fetal de bezerro (FCS) inativado, 2 mmol/L de L-glutamina, 1% de piruvato de sódio e 1% (v/v) penicillina/estreptomicina. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

3.2. Tratamento celular com proteína recombinante TSP2 humana

As células PC3 e DU145 foram plaqueadas em placas de 96, 24 ou 12 poços, em diferentes densidades, dependendo do ensaio celular a ser realizado. Quatro horas após o plaqueamento das células, as mesmas foram tratadas com proteína recombinante TSP2 (recTSP2) humana (50 µg/mL) (1635-T2 - R&D Systems) ou PBS, como controle. As células foram tratadas por 24, 48 ou 72 horas, dependendo do ensaio celular. As células foram cultivadas em 5% de CO₂ à 37°C.

Para atestar a integridade e a confiabilidade da proteína recTSP2 utilizada, foram feitos ensaios de imunoblot adicionando-se quantidades crescentes da proteína (50-500 ng) e incubação com anticorpo anti-TSP2 (sc-136238 – Santa Cruz Biotechnologies). As amostras foram resolvidas em Geis Midi Bis-Tris NuPAGE Novex gradiente de 4% a 12% (Invitrogen) por, aproximadamente, 1 hora e 30 minutos, a 130 Volts. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF, em tampão de transferência (0,58% de Tris-HCl, 0,29% de glicina, 0,037% SDS e 20% de metanol), através de sistema semi-seco. Em seguida, a membrana foi bloqueada, sob agitação, por 1 hora, em solução de leite desnatado 5%, diluído em tampão PBS Tween 0,01%. Seguiu-se a incubação *overnight*, a 4°C com o anticorpo primário anti-TSP2 (sc-136238 – Santa Cruz Biotechnologies), diluído 1:1000 em solução de bloqueio. Após 4 lavagens de 5 minutos com PBS Tween 0,01%, as membranas foram incubadas, por 1 hora, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à peroxidase, diluído 1:2000. Após 4 lavagens de 10 minutos com PBS Tween 0,01%, a interação antígeno-

anticorpo foi visualizada através da revelação das reações com o kit *ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare). A seguir, as membrabas foram expostas à filmes sensíveis à quimioluminescência (Figura 20) (KODAK BioMax Light Film – Sigma).

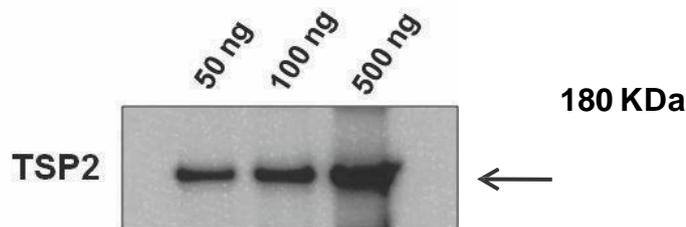


Figura 20. Resolução da proteína recombinante TSP2 (recTSP2) humana por imunobot. A proteína recTSP2 humana (1635-T2 - R&D Systems) foi resolvida por *western blot* utilizando anticorpo anti-TSP2 (sc-136238 – Santa Cruz Biotechnologies).

3.3. Ensaio de análise de viabilidade celular

As células PC3 e DU145 foram plaqueadas em placas de 96 poços, na densidade de 5×10^3 células por poço. Quatro horas após o plaqueamento, as células foram cultivadas por 72 hs na presença proteína TSP2 recombinante humana (recTSP2) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (1635-T2 - R&D Systems) ou em PBS, utilizado como controle negativo nestes experimentos. As células foram cultivadas em estufa a 37°C em 5% de CO_2 . O ensaio foi realizado em duplicata, em dois experimentos independentes.

Ao final do tempo de tratamento das células, foram adicionados 10 μl do reagente WST1 (Roche) a cada poço da placa de cultura, a qual foi então incubada a 37°C , por 30 minutos. Ao final, as células foram homogeneizadas com o reagente WST1 e a placa de cultura foi levada ao espectrofotômetro, sendo lidas a 450nm. A densidade ótica (D.O.) obtida é proporcional ao número de células viáveis.

O princípio da utilização deste reagente baseia-se no fato de que WST-1 é um sal de tetrazólio estável, o qual é clivado e reduzido a um formazan solúvel, um produto cromogênico, por um mecanismo celular complexo que ocorre principalmente na superfície da célula. Esta biorredução é largamente dependente da produção glicolítica do NAD(P)H em células viáveis. Portanto, a quantidade de corante de formazan formado está diretamente relacionada com o número de células metabolicamente ativas na cultura.

3.4. Ensaio de análise de ciclo celular

As células PC3 e DU145 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na densidade de 5×10^5 células por poço. Quatro horas após o plaqueamento das células, as mesmas foram tratadas por 48 horas com a proteína recTSP2 humana (50 µg/mL) (1635-T2 - R&D Systems) ou PBS, como controle. As células foram cultivadas em 5% de CO² à 37°C. O ensaio foi realizado em duplicata.

Para a análise de ciclo celular, as células foram retiradas da placa de cultura, ressuspensas em tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) e, em seguida, centrifugadas a 1500 RPM por 3 minutos. Em seguida, o precipitado de células foi ressuspendido e homogeneizado em PBS, sendo novamente centrifugadas a 1500 RPM, por 3 minutos. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 500 µl de PBS e transferidas para tubos de poliestireno de fundo redondo (tubos de FACS). Em seguida, foram adicionados 12 µl de RNase A 10 mg/mL, 60 µl de iodeto de propídeo 50 µg/mL, diluído em citrato de sódio 50 mM pH 7,6, e 150 µl de tampão de lise (0,6% NP40, 30mM EDTA, 30mM EGTA, 9,8 mM citrato de sódio pH 4,0, 0,1 mM NaCl), seguido de homogeneização. Seguiu-se incubação, por 30 minutos, a 4°C, com proteção da luz. Na análise por citometria de fluxo, a análise do conteúdo de DNA foi realizada pela coleta de 10.000 eventos utilizando o citômetro de fluxo FACS DiVa e o programa FACSDiva (BD Biosciences).

3.5. Ensaio de análise do perfil fosfo-proteômico da linhagem PC3 tratada com TSP2

As células PC3 foram plaqueadas em placas de 12 poços, na densidade de 3×10^6 células por poço. Quatro horas após o plaqueamento das células, as mesmas foram tratadas por 24 horas com a proteína recTSP2 humana (50 µg/mL) (1635-T2 - R&D Systems) ou PBS, como controle. As células foram cultivadas à 37°C em 5% de CO². O ensaio foi realizado em duplicata.

Para a análise do perfil de fosforilação das proteínas nas células tratadas, foi utilizado um arranjo contendo anticorpos para proteínas fosforiladas componentes do kit *Proteome Profiler Array - Human Phospho-Kinase Array Kit* (R&D Systems). Este kit possibilita a detecção dos níveis relativos de fosforilação de 46 sítios de fosforilação. As membranas de nitrocelulose do kit contêm os anticorpos para os

sítios de fosforilação das proteínas e anticorpos controles, utilizando o princípio da reação imunoenzimática do ELISA sanduíche.

Dessa forma, foram preparados extratos de proteínas totais de células PC3 tratadas ou não com a recTSP2. Em seguida, estes extratos foram reagidos com os anticorpos do kit, de acordo com as recomendações do fabricante. O extrato total de proteínas foi preparado segundo o protocolo que se segue. As células foram retiradas da placa de cultura com tripsina-EDTA 0,25% (Gibco), centrifugadas, por 5 minutos, a 1500 RPM. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 3 mL de PBS ao precipitado celular formado, com posterior homogeneização e nova centrifugação a 1500 RPM, por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente retirado e foram adicionados aos precipitados celulares 100 µl de tampão de lise do *Proteome Profiler Array - Human Phospho-Kinase Array Kit* (R&D Systems). Em seguida, os extratos celulares foram quantificados, através da utilização do kit BCA (Bio-Rad), através de ensaio colorimétrico, conforme descrito anteriormente. Foram utilizados 200 µg de extrato celular de cada amostra, diluídos em tampão do kit, que foram colocados sobre as membranas contendo os anticorpos. A incubação ocorreu *overnight* a 4°C, sob agitação. As membranas haviam sido pré-incubadas, por 1 hora, com tampão de bloqueio do kit. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 10 minutos, com o tampão de lavagem do kit. Foram, em seguida, adicionados às membranas coquetéis de detecção do kit, contendo anticorpos biotinizados. Seguiu-se tempo de incubação de 2 horas, com agitação, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas por 3 vezes, por 10 minutos, com tampão de lavagem do kit. As membranas foram, em seguida, incubadas, por 30 minutos, à temperatura ambiente com a solução de estreptavidina-HRP. A seguir, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 10 minutos, com tampão de lavagem do kit. Para revelar a interação antígeno-anticorpo, foi utilizado reagente quimioluminescente do kit. Assim, um sinal quimioluminescente foi produzido em cada ponto do microarranjo de anticorpos, sendo a intensidade do sinal proporcional ao nível de fosforilação proteica. As imagens dos sinais quimioluminescentes foram capturadas usando um sistema de imagem digital FUSION SOLO e o programa FUSION-CAPT Advance Software (Vilber, Germany). A análise da quantificação do nível de fosforilação relativa foi feita no programa Bio ID (Vilber, Germany). Os perfis de fosforilação de cada sítio de proteína cinase foram avaliados de maneira relativa aos controles positivos presentes nas membranas, os

quais tinham seu perfil de fosforilação com valores de 100%. Os níveis de fosforilação foram, então, comparados entre as células tratadas e não tratadas.

O princípio utilizado no ensaio do kit é o princípio da reação imunoenzimática do ELISA sanduíche, que mede a quantidade de antígeno presente entre duas camadas de anticorpos (Figura 21). Nesta análise, as proteínas cinases avaliadas estão representadas na Figura 22 e Tabela 5.

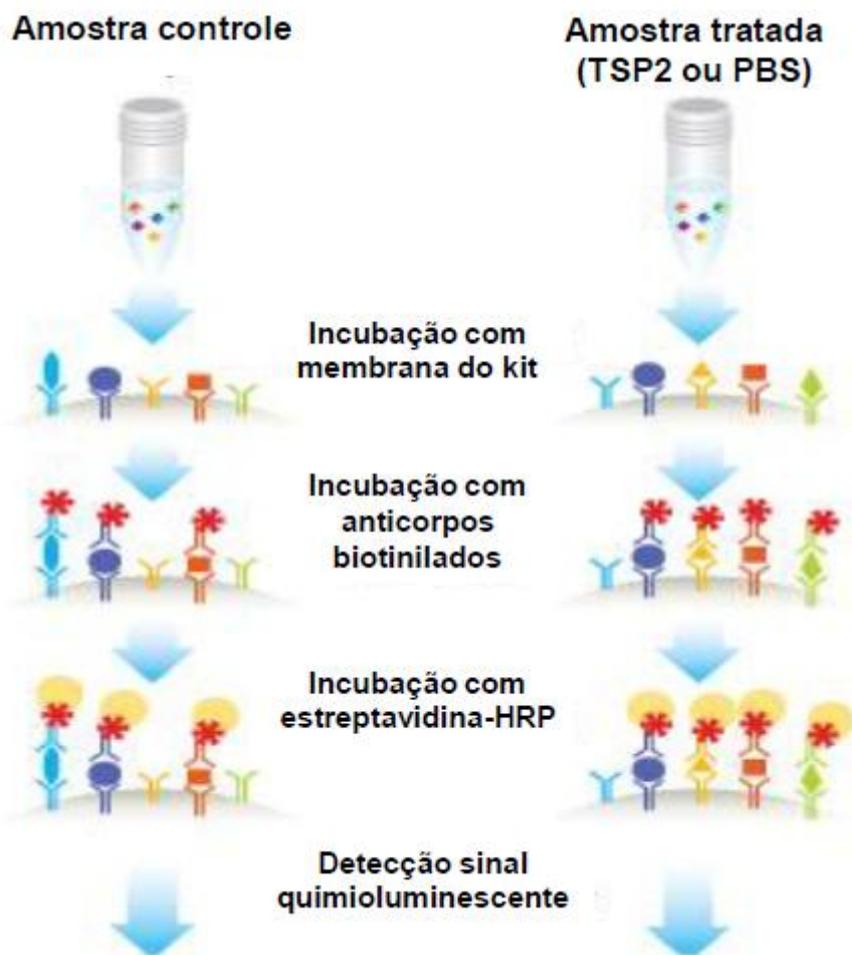


Figura 21. Figura representativa mostrando o princípio da reação imuno enzimática ELISA sanduíche, utilizada no kit *Proteome Profiler Array - Human Phospho-Kinase Array Kit* (R&D Systems). Neste estudo, as amostras de extratos proteicos totais de células PC3 controles e tratadas com TSP2 recombinante (50 µg/mL) ou PBS incubados com as membranas contendo os anticorpos para os sítios fosforilados das 46 cinases. A seguir, foi feita incubação com coquetel de detecção, contendo anticorpos biotinizados, seguida de outra incubação, com solução de estreptavidina-HRP, e finalização pela detecção do sinal quimioluminescente gerado, com captura em sistema de imagem digital FUSION SOLO e o programa FUSION-CAPT Advance Software (Vilber, Germany). A análise da quantificação do nível de fosforilação relativa foi feita no programa Bio ID (Vilber, Germany).

Coordenadas do arranjo de anticorpos
do kit *Human Phospho-Kinase*

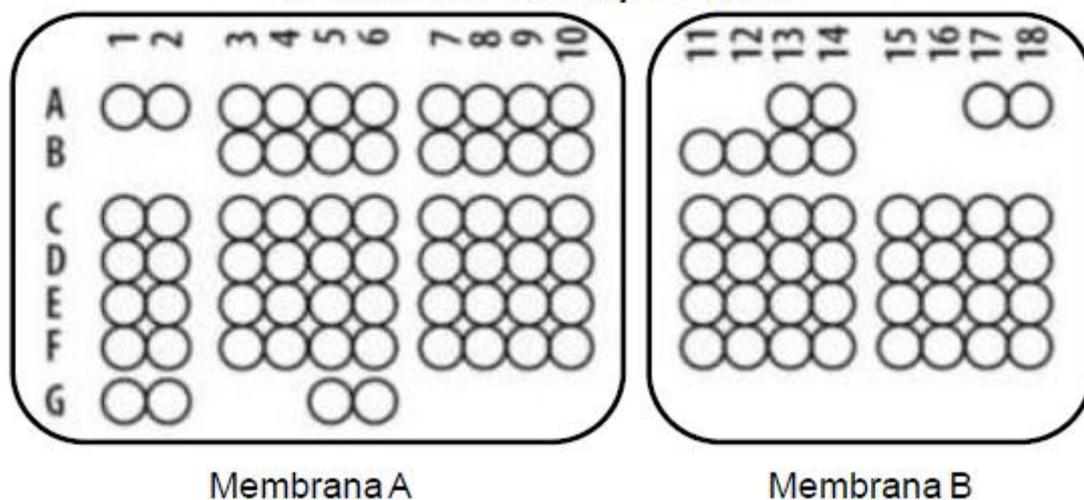


Figura 22. Figura representativa mostrando a localização dos anticorpos do kit *Proteome Profiler Array - Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D Systems)*. Neste arranjo, os anticorpos foram colocados em duplicata, nas membranas de nitrocelulose do kit, A e B.

Tabela 5 – Coordenadas das proteínas cinases fosforiladas alvos dos anticorpos do kit Proteome Profiler Array - Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D Systems).

Coordenada na membrana	Alvo/Controle	Sítio de fosforilacao
A - A1, A2	Referência	
A - A3, A4	p38 α	T180/Y182
A - A5, A6	ERK1/2	T202/Y204, T185/Y187
A - A7, A8	pan JNK	T183/Y185, T221/Y223
A - A9, A10	GSK-3 α/β	S21/S9
A - B3, B4	MEK1/2	S218/S222, S222/S226
A - B5, B6	MSK1/2	S376/S360
A - B7, B8	AMPK α 1	T174
A - B9, B10	Akt	S473
A - C1, C2	TOR	S2448
A - C3, C4	CREB	S133
A - C5, C6	HSP27	S78/S82
A - C7, C8	AMPK α 2	T172
A - C9, C10	β -Catenin	
A - D1, D2	Src	Y419
A - D3, D4	Lyn	Y397
A - D5, D6	Lck	Y394
A - D7, D8	STAT2	Y689
A - D9, D10	STAT5a	Y694
A - E1, E2	Fyn	Y420
A - E3, E4	Yes	Y426
A - E5, E6	Fgr	Y412
A - E7, E8	STAT3	Y705
A - E9, E10	STAT5b	Y699
A - F1, F2	Hck	Y411
A - F3, F4	Chk-2	T68
A - F5, F6	FAK	Y397
A - F7, F8	STAT6	Y641
A - F9, F10	STAT5a/b	Y694/Y699
A - G1, G2	Referência	
A - G5, G6	PBS (controle negativo)	
B - A13, A14	p53	S392
B - A17, A18	Referência	
B - B11, B12	Akt	T308
B - B13, B14	p53	S46
B - C11, C12	p70 S6	T389
B - C13, C14	p53	S15
B - C15, C16	p27	T198
B - C17, C18	Paxillina	Y118
B - D11, D12	p70 S6	T421/S424
B - D13, D14	RSK1/2/3	S380/S386/S377
B - D15, D16	p27	T157
B - D17, D18	PLC γ -1	Y783
B - E11, E12	p70 S6	T229
B - E13, E14	RSK1/2	S221/S227
B - E15, E16	c-Jun	S63
B - E17, E18	Pyk2	Y402
B - F11, F12	STAT1	Y701
B - F13, F14	STAT4	Y693
B - F15, F16	eNOS	S1177
B - F17, F18	PBS (controle negativo)	

4. Resultados

4.1. O tratamento com recTSP2 diminui a viabilidade de linhagens de CaP.

Dados da literatura mostram que TSP2 encontra-se relacionado com a inibição tumoral, por inibir o crescimento tumoral *in vivo* (KOCH e cols, 2011) e a proliferação das CEs *in vitro* (NOH e cols, 2003). Para dar início a caracterização funcional de TSP2 no CaP, investigamos os efeitos na viabilidade celular de linhagens celulares classicamente utilizadas como modelo de CaP, tais como PC3 e DU145, após o tratamento com a proteína recTSP2 humana (50 µg/mL). Esta abordagem de tratamento foi escolhida, a fim de aumentar os níveis da proteína TSP2 em contato com estas células, uma vez que observamos expressão diminuída do transcrito TSP2 e não detectamos a expressão da proteína TSP2 nas mesmas.

Como pode ser observado na Figura 23, houve diminuição da viabilidade das células DU145 após 72 horas de tratamento com recTSP2, apesar desta diminuição não ter sido estatisticamente significativa ($p = 0,08$). Entretanto, houve uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade de células PC3 tratadas com recTSP2 ($p < 0,01$). Tal resultado sugere que TSP2, por inibir a viabilidade das células tumorais de CaP tratadas com recTSP2, tenha papel importante na inibição da sobrevivências das células de CaP.

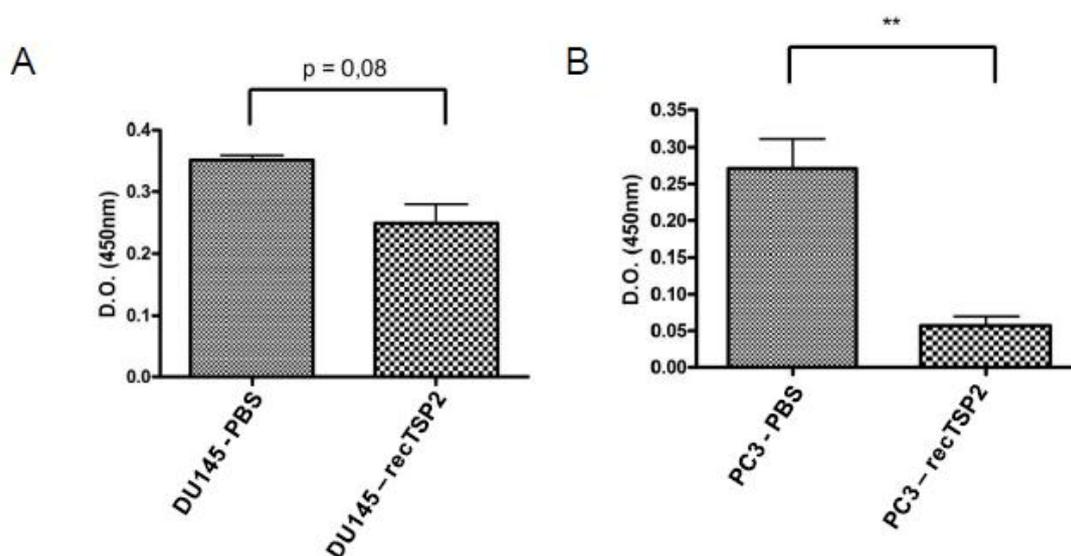


Figura 23. O tratamento com proteína recombinante TSP2 (recTSP2) humana diminui a viabilidade de linhagens de CaP. As linhagens DU145 e PC3 foram tratadas com recTSP2 (50 µg/mL) ou PBS, como controle, e avaliadas para sua viabilidade celular em ensaio com WST-1, conforme indicado na seção Materiais e Métodos. D.O. – densidade ótica medida a 450 nm. ** $P < 0,01$.

4.2. Tratamento com a proteína recTSP2 aumenta o percentual de células de CaP em fase sub-G1 do ciclo celular.

Uma vez observados os efeitos do tratamento com recTSP2 na diminuição da viabilidade de linhagens DU145 e PC3, investigamos em seguida qual seria o efeito deste tratamento sobre o ciclo celular destas. Desta vez, realizamos as análises após 48 horas de tratamento com recTSP2 (50 µg/mL), com o objetivo de mantermos o maior numero possível de células viáveis, uma vez que, após 72 horas de tratamento, muitas perdiam sua viabilidade, especialmente na linhagem PC3 (Figura 21).

Através de análise de ciclo celular por citometria de fluxo, após 48 horas de tratamento com recTSP2, observamos um aumento no percentual de células DU145 e PC3 hipodiploides em sub-G1 (Figura 24). Houve também diminuição do percentual de células DU145 e PC3 em G1. Por outro lado, não foram observadas alterações no percentual de células DU145 e PC3 nas fases S e G2/M do ciclo celular. Em conjunto, estes resultados indicam que TSP2 induz aumento da proporção de células de CaP em processo de morte celular e/ou que haja indução de parada na progressão do ciclo celular.

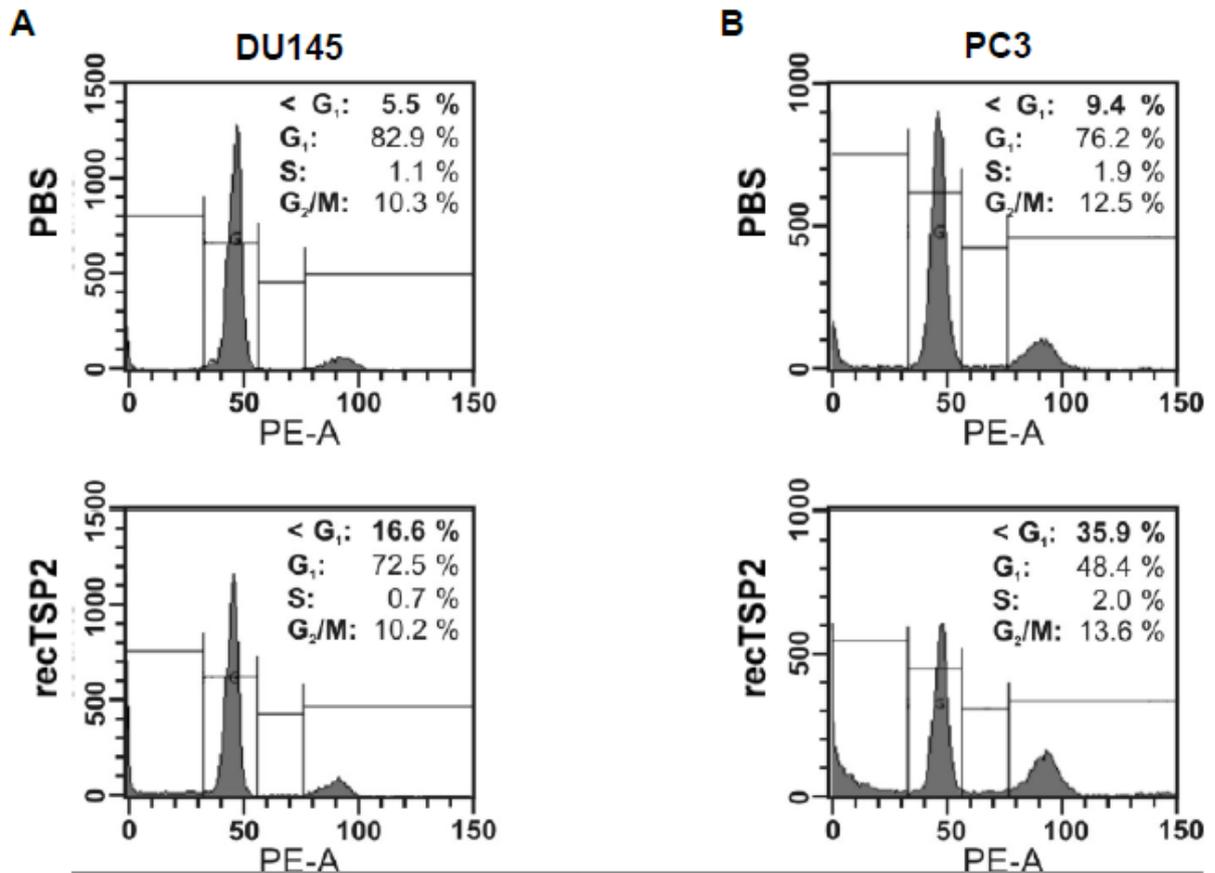


Figura 24. O tratamento com proteína recombinante TSP2 (recTSP2) humana aumenta o percentual de células DU145 e PC3 em sub-G1. As linhagens DU145 e PC3 foram tratadas com recTSP2 (50 µg/mL) ou PBS, como controle, por 48 horas, e avaliadas com relação a seu conteúdo de DNA e ciclo celular, por citometria de fluxo, com marcação com iodeto de propideo, conforme indicado na seção Materiais e Métodos. O eixo x representa as contagens de eventos utilizando o citometro de fluxo FACS DiVa e o programa FACSDiva (BD Biosciences). PE-A – marcação de iodeto de propideo.

4.3. Análise do perfil fosfo-proteômico da linhagem PC3 tratada com TSP2.

Como forma de investigar os mecanismos moleculares pelos quais o tratamento com recTSP2 induz os efeitos observados na diminuição da viabilidade celular e aumento da proporção de células de CaP em sub-G1, realizamos análises do perfil fosfo-proteômico de extratos celulares tratados ou não com recTSP2. O arranjo de anticorpos utilizado detecta a fosforilação de 46 resíduos de proteínas envolvidas em diferentes vias de sinalização celulares. Nestes ensaios, células PC3 foram tratadas por 24 horas com recTSP2 (50 µg/mL).

Desta forma, foi realizada uma análise em um arranjo contendo anticorpos para proteínas fosforiladas, no kit *Proteome Profiler Array - Human Phospho-Kinase Array Kit* (R&D Systems), o que possibilita a detecção dos níveis relativos de fosforilação de 46 sítios em proteínas (Figura 25). Assim, foi feita a análise do nível

de fosforilação das células tratadas com recTSP2, em relação ao nível de fosforilação observado em células com tratamento com PBS, a partir da captura digital das imagens geradas pelos sinais quimioluminescentes, conforme detalhado na seção Material e Métodos (Tabela 6).

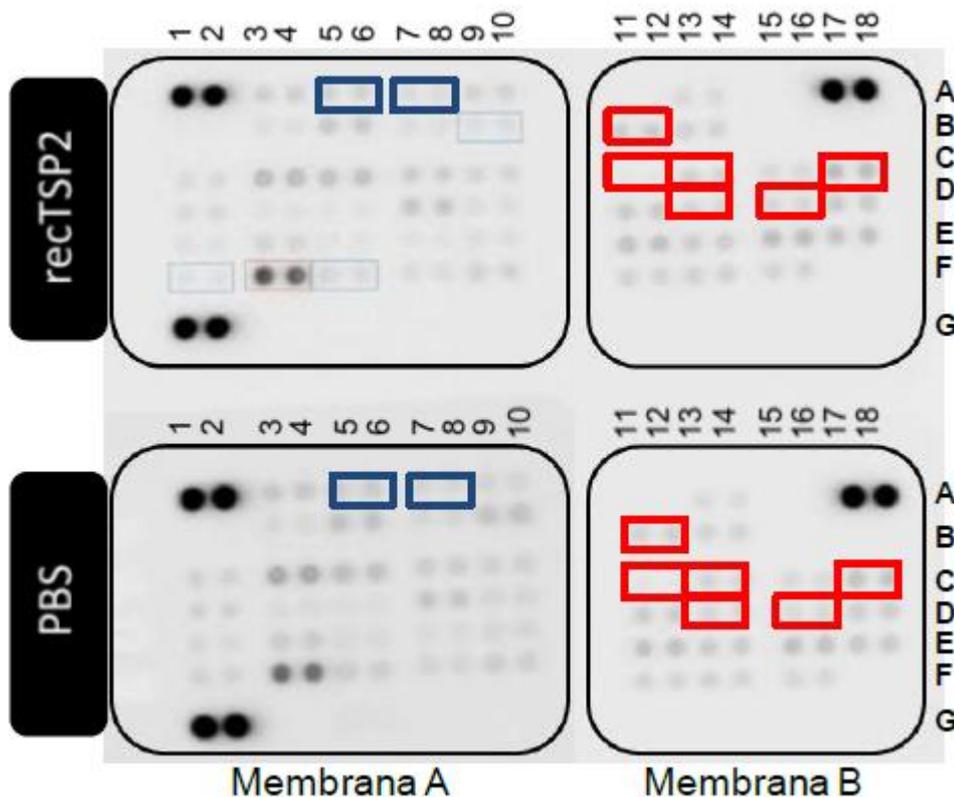


Figura 25. Análise do perfil fosfo-proteômico das células PC3 tratadas com recTSP2. A linhagem PC3 foi tratada com recTSP2 (50 µg/mL) ou PBS, como controle, por 24 horas. Os lisados celulares totais (200 µg) foram incubados com as membranas do kit *Proteome Profiler Array - Human Phospho-Kinase Array Kit* (R&D Systems), que contém anticorpos para detecção de fosforilação de 46 sítios em proteínas diferentes, conforme as instruções do fabricante e indicado na seção Materiais e Métodos. As análises foram realizadas através de captura do sinal quimioluminescente gerado, pelo sistema de imagem digital FUSION SOLO e o programa FUSION-CAPT Advance Software (Vilber, Germany). A análise da quantificação do nível de fosforilação relativa foi feita no programa Bio ID (Vilber, Germany). Os retângulos azuis indicam os anticorpos com menor sinal quimioluminescente em células tratadas com recTSP2, em comparação com tratamento com PBS. Os retângulos vermelhos indicam os anticorpos com maior sinal quimioluminescente em células tratadas com recTSP2, em comparação com tratamento com PBS.

Ao final da análise, observamos diferença significativa do nível de fosforilacao de algumas proteínas, comparando se as células tratadas com as não tratadas com recTSP2. Dentre elas, resíduos das proteínas ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187) ($p = 0,008$) e JNK (T183/Y185, T221/Y223) ($p = 0,004$) encontravam-se com menor nível de fosforilação nas células tratadas com recTSP2, em comparação com células controle, não tratadas. Entretanto, os resíduos das proteínas Akt (T308) ($p = 0,030$), p70 S6 (T389) ($p = 0,025$), p53 (S15) ($p = 0,030$), paxilina (Y118) ($p = 0,041$), RSK1/2/3 (S380/S386/S377) ($p < 0,001$), RSK1/2/3 (S221/S227) ($p = 0,021$) e p27

(T157) ($p = 0,018$) possuíam maior nível de fosforilação após o tratamento com recTSP2 (Figura 26). Estes resultados demonstram alterações no perfil de fosforilação de proteínas classicamente envolvidas em vias de sobrevivência, proliferação e ciclo celular, indicando serem estes mecanismos moleculares que podem estar envolvidos nas ações de recTSP2 sobre a sobrevivência e ciclo celular observados nas células de CaP.

Tabela 6 – Análise do perfil de fosforilação relativa de 46 proteínas envolvidas em vias de sinalização celulares, em células PC3 tratadas e não tratadas com recTSP2.

Proteína alvo	Sítio de fosforilação	PC3 não tratada/PC3 tratada	Valor de p
p38α	T180/Y182	1,59	0,180
ERK1/	T202/Y204, T185/Y187	2,53	0,008
pan JNK	T183/Y185, T221/Y223	2,02	0,004
GSK-3α/β	S21/S9	NA	NA
MEK1/2	S218/S222, S222/S226	0,99	0,970
MSK1/2	S376/S360	1,42	0,177
AMPKα1	T174	1,09	0,541
Akt	S473	NA	NA
TOR	S2448	1,15	0,122
CREB	S133	0,97	0,788
HSP27	S78/S82	1,52	0,171
AMPKα2	T172	1,26	0,248
β-Catenin		NA	NA
Src	Y419	1,39	0,067
Lyn	Y397	1,22	0,142
Lck	Y394	1,19	0,329
STAT2	Y689	1,16	0,203
STAT5a	Y694	NA	NA
Fyn	Y420	1,61	0,184
Yes	Y426	1,18	0,069
Fgr	Y412	1,18	0,093
STAT3	Y705	0,82	0,158
STAT5b	Y699	NA	NA
Hck	Y411	NA	NA
Chk-2	T68	0,94	0,747
FAK	Y397	1,16	0,323
STAT6	Y641	1,09	0,391
STAT5a/b	Y694/Y699	NA	NA
p53	S392	0,86	0,073
Akt	T308	0,9	0,030
p53	S46	0,92	0,070
p70 S6	T389	0,86	0,025
p53	S15	0,83	0,030
p27	T198	NA	NA
Paxillina	Y118	0,82	0,041
p70 S6	T421/S424	0,79	0,056
RSK1/2/3	S380/S386/S377	0,80	<0,001
p27	T157	0,85	0,018
PLCγ-1	Y783	0,84	0,063
p70 S6	T229	0,79	0,056
RSK1/2	S221/S227	0,90	0,021
c-Jun	S63	0,88	0,263
Pyk2	Y402	0,96	0,580
STAT1	Y701	0,87	0,178
STAT4	Y693	0,92	0,104
eNOS	S1177	0,92	0,924

NA – Não avaliada. Sítio de fosforização – localização da serina (S), treonina (T) ou tirosina (Y) fosforilada na proteína. PC3 não tratada/PC3 tratada – razão da quantificação de quimiluminescência.

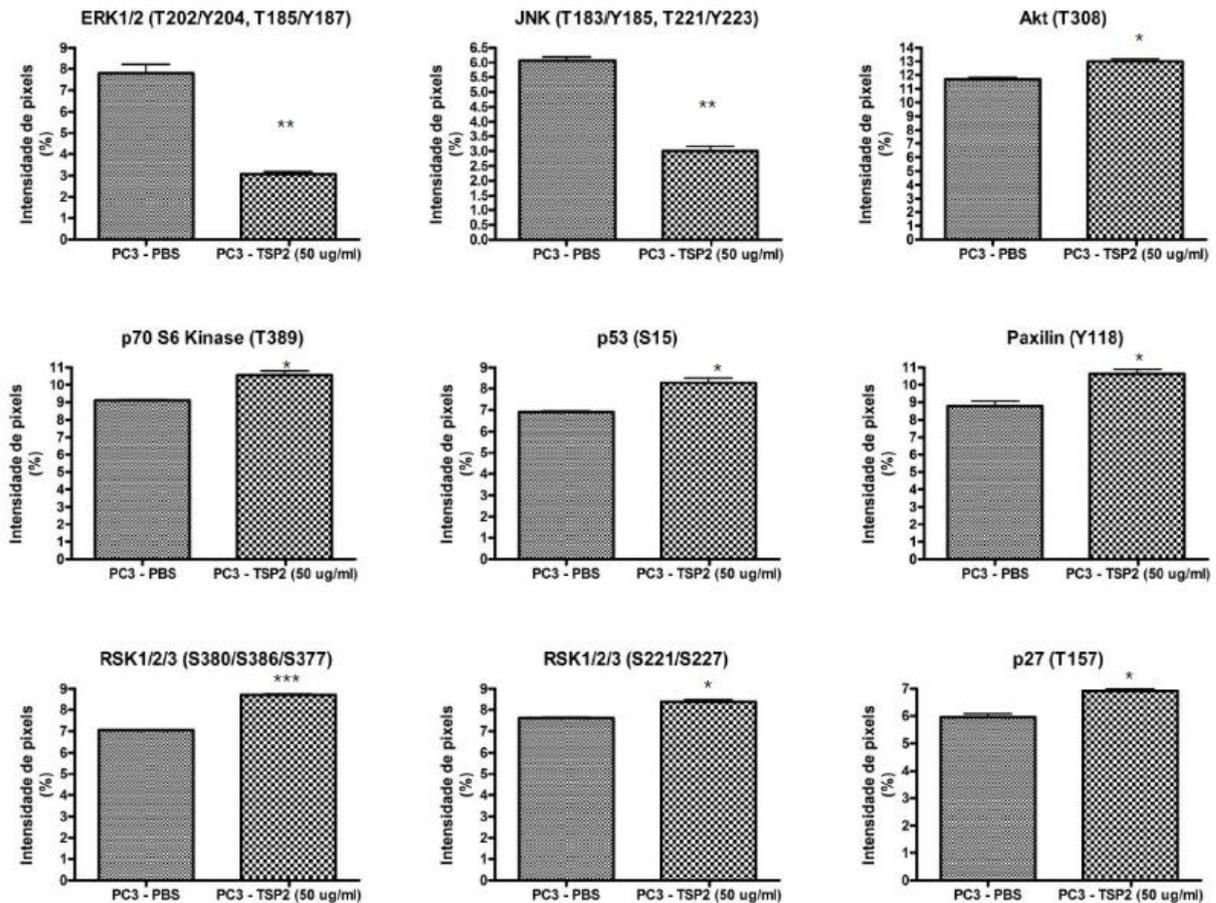


Figura 26. O tratamento com proteína recombinante TSP2 (rectTSP2) humana altera o nível de fosforilação relativa de determinadas proteínas nas células PC3. A linhagem PC3 foi tratada com rectTSP2 (50 µg/mL) ou PBS, como controle, por 24 horas, e avaliada com relação a seu perfil fosfo-proteômico, de acordo com o nível de fosforilação relativa de proteínas cinases estudados, conforme indicado na seção Materiais e Métodos. O nível relativo de fosforilação e representado pelo percentual da intensidade de pixels quantificada pelo programa de análise das imagens digitais geradas pelos sinais quimioluminescentes após a utilização do kit *Proteome Profiler Array - Human Phospho-Kinase Array Kit* (R&D Systems). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5. Discussão geral

O presente estudo consiste na primeira descrição da caracterização da expressão de TSP2 em CaP e HPB, sua potencial aplicação para o diagnóstico diferencial destas importantes doenças prostáticas e os efeitos celulares associados ao tratamento de células de CaP com TSP2 recombinante (recTSP2). Descrevemos também, no presente estudo, alterações fosfo-proteômicas relacionadas com estes efeitos celulares. Além disso, baseados no perfil de expressão de TSP2 nos compartimentos epiteliais e estromais de amostras teciduais de CaP e HPB, e nos efeitos celulares provenientes do tratamento com recTSP2, temos as primeiras evidências a respeito do papel funcional de TSP2 na tumorigênese e progressão do CaP.

TSP2 é uma proteína de MEC descrita por atuar na interface entre a superfície celular e a MEC, regulando sua estrutura e alguns eventos celulares associados com inflamação, cicatrização e tumorigênese (LAWLER; DETMAR, 2004). Com relação à inibição da tumorigênese, TSP2 relaciona-se principalmente com inibição da angiogênese tumoral, através da indução de apoptose e inibição do crescimento das CEs associadas ao tumor (KOCH e cols., 2011), assim como com a inibição do crescimento tumoral (HAHN e cols., 2004). A fim de realizar uma caracterização mais completa e detalhada da expressão de TSP2 no CaP, avaliamos inicialmente a expressão do seu transcrito em linhagens e amostras teciduais de CaP. Dessa forma, observamos que o transcrito TSP2 encontra-se menos expresso em amostras teciduais e linhagens celulares de CaP, em comparação com amostras teciduais de HPB e linhagens celulares prostáticas não tumorais, respectivamente. Esses resultados são consistentes com a diminuição dos níveis de TSP2 também encontrados em outros tipos tumorais, como no câncer de pulmão de não pequenas células (OSHIKA e cols., 1998), no câncer cervical (KODAMA e cols., 2001) e no câncer de ovário do tipo seroso (SANTIN e cols., 2004), também se relacionando com a tumorigênese nestes modelos tumorais. Alguns estudos prévios investigaram a expressão de TSP2 em amostras de CaP (VALLBO e cols., 2004; VALLBO e DAMBER, 2005; CHANDRAN e cols., 2007). Em um destes trabalhos, a expressão de TSP2 não foi observada em amostras teciduais prostáticas humanas (VALLBO e cols., 2004). Já em estudo subsequente, apesar da expressão de TSP2 ter sido observada em amostras prostáticas de rato, não foi observada expressão diferencial de TSP2 entre amostras prostáticas tumorais e não

tumorais (VALLBO; DAMBER, 2005). Tais contradições, em relação aos nossos resultados, podem ser explicadas por diferenças nas metodologias utilizadas e diferenças entre as espécies analisadas, respectivamente.

De maneira similar ao que foi encontrado em nosso estudo, também foi observada menor expressão do transcrito TSP1 em amostras teciduais humanas de CaP, em comparação com amostras de HPB (VALLBO e cols., 2004). Estes mesmos autores também associaram a diminuição da expressão de TSP1 no CaP como um dos mecanismos moleculares modulando a tumorigênese. Corroborando com estes dados, outros estudos também demonstraram que TSP1 apresenta menores níveis em amostras teciduais e linhagens de CaP, em relação a amostras não tumorais e de HPB (KWAK e cols., 2002; BASTIAN e cols., 2005). Vale ressaltar que tanto as amostras teciduais destes estudos citados quanto as utilizadas no presente trabalho não foram microdissecadas. Por esta razão, não podemos distinguir a expressão do transcrito TSP2 das células epiteliais tumorais e as células do microambiente ao redor, assim como já realizado em outros estudos, nos quais se investigou a expressão de transcritos utilizados com biomarcadores do CaP (ERNST e cols., 2002; GREGG e cols., 2010).

Os mecanismos que levam a diminuição da expressão de TSP1 e TSP2 no CaP ainda não foram elucidados, mas já foi sugerido que a perda de função, tanto de p53 quanto de PTEN (*phosphatase and tensin homologue*), através de mutações, leva a alteração da regulação das TSPs. Apesar disso, alguns estudos não encontraram correlação entre a expressão de TSPs e o status de p53, onde somente de 20 a 25% dos casos de CaP apresentam mutação em p53 (VALLBO; DAMBER, 2005). Além disso, dados da literatura apontam que a expressão de TSP2 pode ser regulada negativamente por hipóxia (LUO e cols., 2012) e eNOS (TANG e cols., 2010; MACLAUHLAN e cols., 2011). Da mesma forma, a expressão de TSP1 pode ser regulada negativamente por NO (WANI e cols., 2007).

Não observamos nenhuma correlação entre o nível de expressão do transcrito TSP2 com os dados clínico-patológicos da coorte estudada. Torna-se importante mencionar que os dados disponíveis para os pacientes desta coorte eram limitados, restringindo uma análise mais abrangente de correlação do perfil de expressão de TSP2 com dados clínico-patológicos. Dados da literatura mostram que a expressão de TSP2 encontra-se diretamente associada com melhor prognóstico em câncer de pulmão de não pequenas células (OSHIKA e cols., 1998) e com melhor prognóstico dos pacientes com câncer de cólon (TOKUNAGA e cols., 1999). Entretanto, a

expressão de TSP2 está inversamente relacionada com a vascularização tumoral (OSHIKA e *cols.*, 1998), com a presença de metástases e contagem e densidade vasculares (TOKUNAGA e *cols.*, 1999) e com a vascularização e grau histológico de gliomas (KAZUNO e *cols.*, 1999).

Não observamos diferenças com relação ao nível de expressão do transcrito TSP2, comparando-se as amostras teciduais de CaP e de tecido não tumoral adjacente ao tumor. Quando comparamos as amostras pareadas de CaP e tecido não tumoral adjacente ao tumor, provenientes do mesmo paciente, a maioria também não apresentou diferença quanto ao nível de expressão de TSP2. Este resultado está de acordo com dados da literatura que demonstram semelhança no perfil de expressão de proteínas do tumor e de seu tecido adjacente não tumoral. De acordo com estas publicações, no tecido não tumoral adjacente ao tumor, já são observadas alterações nas vias classicamente tumorais, pois esta região estaria geneticamente pré-disposta ao desenvolvimento dos tumores (WIDSCHWENDTER e *cols.*, 1997), fato que também se relaciona com os casos clínicos em que ocorre recidiva após a ressecção tumoral (LI e *cols.*, 2002).

A análise do perfil de expressão da proteína TSP2 foi verificada, através de imunohistoquímica com anticorpo anti-TSP2 em ensaio em TMA com 204 amostras teciduais de CaP e 66 amostras de HPB. Assim, demonstramos, pela primeira vez, a detecção de imunorreatividade para TSP2 tanto no compartimento epitelial glandular tumoral quanto no compartimento estromal de amostras teciduais prostáticas. A presença da proteína TSP2 em ambos os compartimentos de CaP e HPB indica que TSP2 foi sintetizado e/ou secretado por estas células, independentemente da malignização tecidual, como também já foi sugerido para a expressão da proteína MMP-9 em amostras de carcinoma de ovário (HUANG e *cols.*, 2000). De maneira consistente com nossos resultados, a expressão da proteína TSP2 também foi observada no epitélio e no estroma de tecidos de adenocarcinoma pulmonar (CHIJIWA e *cols.*, 2009). Da mesma forma, a expressão da proteína TSP1 também foi encontrada no epitélio e no estroma de amostras de carcinoma de células uroteliais da bexiga (IOACHIM e *cols.*, 2006), estando seus níveis inversamente correlacionados com o estadiamento e o tamanho tumorais.

Nossos resultados apontam para um perfil de menor expressão da proteína TSP2 no compartimento estromal das amostras teciduais de CaP, em comparação com o mesmo nicho das amostras teciduais de HPB. Baseados nesta observação, propomos que os níveis diminuídos de TSP2 nas células estromais de CaP podem

ser um dos eventos favorecendo a tumorigênese do CaP, assim como já foi evidenciado para TSP1 (FITCHEV e cols., 2010). Esta hipótese foi reforçada com base em nossas observações de que a razão do escore de marcação epitélio/estroma de TSP2 é ainda maior em amostras de CaP, indicando que a doença maligna da próstata pode estar relacionada com maiores discrepâncias entre os níveis de expressão de TSP2 entre os compartimentos epiteliais e estromais. É possível que, em condições não-tumorais, exista um equilíbrio ideal da expressão de TSP2 entre compartimentos epiteliais e estromais. Como resultado de sinais que favoreçam a progressão tumoral, como alguns mediadores inflamatórios (CHUGHTAI e cols., 2011), células do estroma poderiam regular negativamente a expressão de TSP2, interrompendo a homeostase do tecido não tumoral prostático. Dados da literatura mostram que o androgênio e a hipóxia modulam diferencialmente a expressão de TSP1, em tecidos prostáticos, produzindo respostas opostas em células epiteliais e estromais. Estes autores também discutem que, *in vivo*, a resposta angiogênica pode ser modificada por interações entre as células epiteliais e as células estromais (FITCHEV e cols., 2010). Considerando-se que a razão do escore de marcação epitélio/estroma de TSP2 é maior em CaP, propomos que uma importante diminuição da regulação dos níveis de TSP2 em células estromais de CaP favoreceria a tumorigênese da próstata através da estimulação da angiogênese e de outras características de progressão tumoral. Corroborando com esta hipótese, foi demonstrado que as células do estroma da zona de transição da próstata, associada ao surgimento do BPH, suprimem o crescimento de células de CaP, enquanto que as células do estroma da zona periférica, associada com surgimento do CaP, favorecem o crescimento do tumor (ZHAO e cols., 2009). Estes dados fornecem evidências adicionais de que as células de estroma de CaP, por terem diminuição dos níveis de expressão da proteína TSP2, são mais propensas a favorecerem a angiogênese e a progressão tumorais, em comparação com células de estroma de HBP, os quais expressam maiores TSP2 níveis da proteína TSP2. Já foi descrita a associação de TSP2 com inibição da angiogênese, e sabe-se que o grau de angiogênese tumoral depende do balanço entre fatores pró e anti-angiogênicos. Além disso, estes fatores podem ser produzidos pelas próprias células tumorais ou por células estromais ou inflamatórias associadas. Assim, as ações de TSP2 e de outros reguladores angiogênicos na modulação da angiogênese e da progressão tumorais podem ser resultado da produção destes fatores tanto por células epiteliais quanto por células estromais (FITCHEV e cols., 2010).

Observamos que é possível distinguir a expressão da proteína TSP2 entre o compartimento epitelial e estromal de amostras teciduais, através de imunohistoquímica. Assim, levantamos a hipótese de que a diminuição da expressão do transcrito TSP2, observada em amostras de CaP, em comparação com as amostras de HPB, poderia ser o resultado da diminuição da expressão do transcrito TSP2 principalmente no compartimento estromal das amostras de CaP. Esta hipótese também é favorecida porque não foram observadas diferenças significativas na expressão da proteína TSP2 entre as células epiteliais entre CaP e HPB.

Há cada vez mais evidências de que a sinalização parácrina entre o epitélio e o estroma é essencial para o desenvolvimento glandular normal, para a homeostase tecidual e também para o processo desencadeador da doença (TIMMS; HOFKAMP, 2011). Com base nos dados apresentados no presente trabalho, levantamos a hipótese de que as células do tumor de próstata podem modular diferencialmente os níveis de TSP2 no estroma do CaP, como um mecanismo de favorecimento da progressão do tumor, visto que as proteínas da MEC têm sua expressão altamente influenciada pelas células tumorais. Já foi observada anteriormente a capacidade das células tumorais na modulação da expressão gênica e atividade do estroma normal adjacente. A regulação negativa observada na expressão de TSP2 em células do estroma do CaP está de acordo com descrições anteriores de modificações importantes que ocorrem em células do estroma, a fim de promover a carcinogênese da próstata (LOPACZYNSKI e *cols.*, 2001). A regulação dos níveis de expressão de TSP2 em células do estroma do CaP poderia ser um desses eventos, o que poderia estimular as células epiteliais da próstata a adquirir perfis tumorais específicos (VALLBO; DAMBER, 2005). Também de acordo com esta hipótese, foi demonstrado que as células tumorais mutantes em *Ras* secretam fatores solúveis que têm a capacidade de suprimir os níveis de expressão TSP1 em fibroblastos circundantes (KALAS e *cols.*, 2005). Componentes do estroma do microambiente tumoral, tais como a MEC, cooperam com as células tumorais, regulando o desenvolvimento do tumor, com papéis importantes no processo angiogênico (VONG; KALLURI, 2011). De acordo com os nossos resultados, os quais demonstram a expressão diferencial de TSP2 no compartimento estromal, entre CaP e HPB, sugerimos que TSP2 pode ser uma das proteínas alteradas no processo de formação de estroma reativo, uma vez que TSP2 é uma das proteínas capazes de modular a angiogênese tumoral.

Também já foi proposto que TSP2 expresso no estroma possui papel de defesa do organismo contra o tumor (HAWIGHORST e *co/s.*, 2001). Assim, quando os níveis de TSP2 estão diminuídos, o tumor teria mais chance de progredir. Tanto as células tumorais quanto as estromais ao redor do tumor são alteradas gradativamente, durante a progressão tumoral. Tais alterações refletem em mudanças na sinalização heterotípica entre o tumor e o estroma e depende de interações recíprocas entre as células neoplásicas e as células estromais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). No CaP, o estroma reativo, o qual modifica-se ao longo da progressão tumoral, possui interação dinâmica com o epitélio prostático, possuindo um papel crítico durante sua progressão (NIU; XIA, 2009). O microambiente estromal no CaP encontra-se alterado, em comparação com o estroma não tumoral, exibindo características alteradas. O estroma reativo é composto por miofibroblastos e fibroblastos que são estimulados a expressar alguns componentes da MEC. O estroma reativo, aparentemente, inicia-se no NIP e evolui durante a progressão do tumor, substituindo o estroma fibromuscular não tumoral (TUXHORN e *co/s.*, 2002). Assim, alguns eventos podem ser regulados pelo estroma reativo do CaP, como a angiogênese sustentada (TUXHORN e *co/s.*, 2002). A angiogênese é um evento que possui múltiplas etapas, ocorrendo alterações na composição da MEC e na proliferação, migração e diferenciação das CEs. Há uma rede complexa de interações autócrinas e parácrinas entre células tumorais, estromais e endoteliais, que por sua vez, são influenciadas pela composição da MEC (IOACHIM e *co/s.*, 2006).

De acordo com nossos resultados, o transcrito TSP2 mostrou-se menos expresso nas amostras teciduais de CaP, em relação às amostras de HPB. Dessa maneira, baseados nestes resultados e nas conhecidas limitações do uso da quantificação dos níveis do PSA sérico para distinguir entre estas doenças prostáticas, tornou-se interessante avaliar se o nível de expressão do transcrito TSP2 nestas amostras apresentaria potencial auxiliar no diagnóstico diferencial entre os pacientes de CaP e HPB. Para estas análises, realizamos a construção de curvas ROC. Nesse tipo de curva, o eixo das ordenadas mostra a sensibilidade e o das abscissas a especificidade. O teste ideal é aquele com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade e aparece plotado no canto superior esquerdo do gráfico. A linha diagonal reta que corta o gráfico da esquerda para a direita, de baixo para cima, representa a nulidade do teste. Quando se avalia a acurácia de um novo teste diagnóstico, algumas situações devem ser consideradas. Uma delas é substituir um

teste existente por outro, o qual pode ser menos invasivo ou de menor custo. Então, o objetivo é avaliar se a sensibilidade e a especificidade do novo teste são semelhantes às do antigo. Outra seria de se ter interesse em um teste adicional, de alta especificidade, para confirmar uma doença detectada inicialmente por um teste de rastreamento (IARED; VALENTE, 2009).

Estas análises revelaram que o nível de expressão do transcrito TSP2, em comparação à quantificação do nível de PSA sérico, é capaz de melhor diferenciar entre amostras de CaP e HPB. Dessa forma, a análise da expressão de TSP2 poderia ser utilizada de maneira independente ou complementar a dosagem do PSA sérico, como uma ferramenta valiosa para o diagnóstico diferencial entre estas duas doenças. Nesta coorte de amostras, o uso de nível de expressão do transcrito TSP2 distinguiu entre os grupos de CaP e HPB de maneira mais eficiente que o PSA sérico. A distinção dos grupos através do nível do transcrito TSP2 apresentou uma sensibilidade boa (87,5%) e uma especificidade razoável (61,5%). Por outro lado, no mesmo grupo de pacientes, o nível de PSA sérico apresentou menor sensibilidade (80,0%) e menor especificidade (27,5%) para distinguir entre as amostras de CaP e HPB.

Apesar do PSA sérico ainda ser o melhor biomarcador em uso para a triagem do CaP, este biomarcador não apresenta alta especificidade, uma vez que se apresenta aumentado mesmo em condições de tumores benignos da próstata, como na HPB e em algumas prostatites. Assim, o teste de dosagem do PSA sérico apresenta baixa especificidade, em torno de 20%, admitindo-se sensibilidade de 80% (CATALONA e *co/s.*, 1994). Assim, a busca por novos biomarcadores ainda deve ser aprimorada para melhorar o diagnóstico do CaP (LAXMAN e *co/s.*, 2008). Propomos ainda que o nível do transcrito TSP2 poderia ser mais amplamente analisado como um complemento a triagem pelo PSA sérico para a melhoria do diagnóstico diferencial entre CaP e HPB, assim como já vem sendo demonstrado para outros biomarcadores (NEVES e *co/s.*, 2012; HANSEN e *co/s.*, 2013). Estudos futuros devem ser realizados com diferentes grupos de pacientes, em uma coorte maior, a fim de demonstrar a utilidade do nível de expressão do transcrito TSP2 em tecidos para sua utilização no diagnóstico de CaP. Estudos futuros que também avaliem as amostras de CaP testadas para os níveis do transcrito TSP2 com relação ao nível de expressão de outros biomarcadores para o CaP, já descritos anteriormente, como PCA3 (DURAND e *co/s.*, 2011), CRISP3 (KOSARI e *co/s.*, 2002), AMACR (OUYANG e *co/s.*, 2011) e hepsina (KELLY e *co/s.*, 2008),

reforçariam nossos dados. Assim, é possível que o diagnóstico do CaP possa ser ainda mais aprimorado se a análise da expressão do transcrito TSP2 for combinada com a análise de outros biomarcadores tumorais teciduais, como previamente proposto (TROYER e *co/s.*, 2004; RIGAU e *co/s.* 2011; TILLI e *co/s.*, 2012).

Além de avaliar os níveis do transcrito TSP2 para o diagnóstico diferencial de CaP e HPB, também foi investigado se o uso do escore de marcação da proteína TSP2 poderia ser uma abordagem auxiliar para este fim. À semelhança do que foi observado para as análises do transcrito TSP2, a utilização dos valores da razão do escore de marcação epitélio/estroma de TSP2 também poderia melhorar o diagnóstico diferencial entre CaP e HPB, em comparação com os valores dos escores de marcação epiteliais e estromais, individualmente. Nossa hipótese é de que, em situações onde existe uma maior diferença entre a expressão da proteína TSP2 entre epitélio e estroma, o desenvolvimento do CaP pode ser favorecido. Conforme foi observado em outros modelos tumorais, diferentes padrões de expressão entre epitélio e estroma, para biomarcadores tumorais, tais como MCT4 (WITKIEWICZ e *co/s.*, 2012), TSP1 (IOACHIM e *co/s.*, 2012) e caveolina-1 (CIOCCA e *co/s.*, 2012), também demonstraram importância prognóstica e funcional na progressão tumoral. Por conseguinte, nossos dados fornecem evidência de que não só a análise da expressão do transcrito TSP2, a partir de extratos teciduais de próstata total, pode melhorar os parâmetros para o diagnóstico do CaP, mas também a razão do escore de marcação epitélio/estroma de TSP2 poderia ser utilizada com uma potencial ferramenta adicional para melhorar o diagnóstico do CaP. Torna-se importante citar que é possível detectar os níveis séricos de TSP2 através de ensaio por ELISA (STENCZER e *co/s.*, 2011; KAJIHARA e *co/s.*, 2012), sendo esta mais uma opção de análise de TSP2, em ensaios futuros. Ademais, já foi sugerido que títulos de anticorpos contra TSP2 podem ser utilizados como marcadores tumorais para o diagnóstico e seguimento de pacientes com mesotelioma maligno de pleura (SHIGEMATSU e *co/s.*, 2009).

Também realizamos análises com relação à acurácia dos escores de marcação de TSP2 na predição de características clínico-patológicas, associadas ao prognóstico da coorte estudada. Por estas análises, o escore da marcação epitelial de TSP2 poderia prever a invasão vascular, a invasão de linfonodos, a recorrência bioquímica e a recorrência clínica. Já o escore da marcação estromal de TSP2 poderia prever a invasão de linfonodos e a razão do escore da marcação epitélio/estroma de TSP2 poderia prever a invasão das vesículas seminais. Estas

análises de predição tiveram como valor limiar a acurácia de 0,6, considerada limite para a significância do teste. Todas estas características possuem grande importância com relação a progressão tumoral, estando diretamente associadas com pior prognóstico da doença. Desta forma, também se torna importante uma análise futura e mais detalhada sobre a capacidade do nível de TSP2 na predição destes fatores prognósticos.

Apesar de não termos detectado diferença no escore de marcação epitelial para TSP2, entre amostras de CaP e HBP, nosso estudo também mostrou que há uma associação positiva entre o escore de marcação epitelial para TSP2 e invasão vascular e recorrência bioquímica. Mesmo que o escore de marcação epitelial para TSP2 não tenha qualquer aplicação potencial significativa para o diagnóstico diferencial de CaP e HPB, este parâmetro pode ser de significado prognóstico. Os nossos resultados podem indicar que, durante a progressão do CaP, a proteína TSP2 no epitélio tumoral pode ter um papel distinto do papel que realiza durante a tumorigênese da próstata, o que pode ser associada com os dados que demonstram a expressão diferencial de TSP2 entre CaP primário e metastático (LATULIPPE e *cols.*, 2002; CHANDRAN e *cols.*, 2007). Além disso, em modelo de adenocarcinoma de pulmão, a expressão de TSP2 oriundo das células tumorais encontra-se diretamente relacionada com bom prognóstico, mas a expressão de TSP2 estromal encontra-se relacionada com pior prognóstico (CHIJIWA e *cols.*, 2009). Tais dados mostram o papel dual de TSP2, dependendo do compartimento tecidual tumoral.

A partir dos dados de expressão diferencial de TSP2 em células de CaP, justifica-se a investigação de suas funções neste modelo tumoral. Escolhemos, no presente estudo, a estratégia de avaliar os efeitos celulares relacionados com o tratamento com recTSP2 nas linhagens celulares PC3 e DU145, linhagens celulares tumorais de CaP bem estabelecidas como modelos *in vitro* e *in vivo* de estudos funcionais de CaP. Além disso, demonstramos que nenhuma destas duas linhagens possui níveis detectáveis da proteína TSP2. O tratamento com recTSP2 é uma abordagem que já vem sendo utilizada por outros grupos, para entender as funções de TSP2 em diversos modelos (PANETTI e *cols.*, 1997; ARMSTRONG e *cols.*, 2002; FEARS e *cols.*, 2005; DAVIS e *cols.*, 2009).

Desta forma, resolvemos iniciar a análise do papel funcional de TSP2 no CaP através da avaliação dos efeitos do seu tratamento em alguns dos principais pilares do desenvolvimento tumoral, que são a viabilidade celular aumentada e a resistência a morte celular. Assim, nos modelos utilizados em nosso estudo, o tratamento com

recTSP2 levou a diminuição da viabilidade celular, especialmente da linhagem PC3, apesar da diminuição da viabilidade celular de DU145 não ter sido tão proeminente. Além disso, a análise de ciclo celular das células PC3 e DU145 após o tratamento com recTSP2 mostrou que houve aumento do percentual de células na fase sub- G1 do ciclo celular. Em conjunto, estes resultados indicam que o tratamento com recTSP2 induz ao aumento do processo de indução a morte celular e/ou a parada na progressão do ciclo celular nas células de CaP estudadas.

Já foram relatados papéis similares de TSP2 com relação à indução de morte celular, inibição da viabilidade celular e parada da progressão do ciclo celular. Dados da literatura mostram o papel funcional de TSP2 na inibição da proliferação e da progressão do ciclo celular de CEs (ARMSTRONG e *cols.*, 2002; OGANESIAN e *cols.*, 2008), além do seu papel na indução de morte celular por apoptose das CEs (NOH e *cols.*, 2003; KOCH e *cols.*, 2011). De maneira similar, já foi observada indução de apoptose das células tumorais em camundongos *knock-out* para TSP2 (HAWIGHORST e *cols.*, 2001; FEARS e *cols.*, 2005).

De forma a elucidar alguns dos mecanismos moleculares envolvidos com os efeitos celulares observados após o tratamento com recTSP2, realizamos um estudo de fosfo-proteômica utilizando um microarranjo de anticorpos fosforilados comercialmente disponível. Através desta ferramenta, é possível realizar a análise da fosforilação, mediada por proteínas cinases e fosfatases, que regula as vias de transdução de sinais (MANNING; CANTLEY, 2002). O resultado dessas atividades de transferência de grupamento fosfato está além dos simples modelos de transdução de sinal lineares. A análise do perfil de fosforilação representa uma abordagem para se obter os dados da atividade de cinases e suas vias respectivas (PARIKH; PEPPELENBOSCH, 2010). A análise das vias alteradas ao longo da progressão tumoral, através desta abordagem, também pode ser utilizada para identificação de novos alvos terapêuticos ou entender mecanismos de resistência celular (MORISHITA e *cols.*, 2010; OLIVERAS-FERRAROS e *cols.*, 2010).

Nestas análises, encontramos alteração dos níveis de fosforilação de várias proteínas envolvidas em vias de sinalização importantes para processos celulares. Dentre elas, os resíduos das proteínas ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187) e JNK (T183/Y185, T221/Y223) encontravam-se com menor nível de fosforilação nas células tratadas com recTSP2, em comparação com células controle, não tratadas. Entretanto, os resíduos das proteínas Akt (T308), p70 S6 (T389), p53 (S15), paxilina (Y118), RSK1/2/3 (S380/S386/S377 e S221/S227) e p27 (T157) possuíam maior

nível de fosforilação após o tratamento com recTSP2.

A diminuição dos níveis de fosforilação de resíduos de ERK e JNK pode ser correlacionada com a diminuição da viabilidade celular observada nas células tratadas. A cascata de sinalização de ERK é o protótipo da cascata de MAPK, em mamíferos, que regula uma série de processos, incluindo a proliferação, diferenciação, sobrevivência, migração, respostas ao estresse e apoptose. Em células tumorais, dados da literatura demonstram a associação da ativação aberrante desta via com maior sobrevivência e proliferação destas células (OSBORNE e *co/s.*, 2012). Estudos anteriores já haviam demonstrado a capacidade de TSP1 na inibição da fosforilação de ERK induzida por NO, relacionada como um dos mecanismos de inibição da angiogênese (RIDNOUR e *co/s.*, 2005).

Já com relação às proteínas JNK, estas são ativadas por múltiplos e diversos estímulos, levando a respostas celulares variadas e aparentemente contraditórias. Em particular, já foi relatado que JNK possui papel na indução de apoptose, mas que também teria sido implicada na sobrevivência e no aumento da proliferação celular. As proteínas JNKs são membros da família de proteínas MAPK (WESTON; DAVIS, 2002). A fosforilação de JNK está intimamente ligada à ativação de AP-1. AP-1 regula a transcrição de diversos genes e é potencialmente ativada por uma variedade de estímulos, incluindo promotores tumorais. A ativação de AP-1 pode resultar na ligação ao DNA de vários genes envolvidos em proliferação, inflamação e apoptose (ANGEL; KARIN, 1991). AP-1 também está envolvido na tumorigênese, progressão tumoral e formação de metástases (DONG e *co/s.*, 1994). Além disso, também já foi observado que TSP1 possui a capacidade de modular os níveis de fosforilação de JNK, através de mecanismos regulados por sua ligação a CD-36 (ROBERTS e *co/s.*, 2010).

De maneira similar, o aumento do nível de fosforilação dos resíduos de p53 e p27 aponta para uma associação com os efeitos relacionados à diminuição da viabilidade e aumento do percentual celular em sub-G1 das células tratadas com recTSP2. Sabe-se que p53 e p27 são duas proteínas envolvidas com a regulação da progressão do ciclo celular, além da regulação de vias envolvidas com sobrevivência e proliferação celular, como PI3K/PTEN/Akt e Raf/MEK/ERK. A proteína p53 atua como um regulador da transcrição dentro de uma rede complexa, que envolve a trans-ativação e trans-repressão seletiva de múltiplos genes envolvidos no controle do ciclo celular e da apoptose. A proteína p27 é um mediador central da progressão do ciclo celular, cujo papel como um inibidor de cinase dependente de

ciclina (CDK) é perdido em muitos casos de CaP avançado (LEE e *co/s.*, 2008). Além disso, dados da literatura mostram que o aumento de fosforilação de p53 no resíduo serina 15 também está associado com diminuição de fosforilação de ERK, de maneira similar aos nossos resultados. Tais dados estão relacionados com aumento dos níveis de TSP1, uma vez que p53 é um regulador positivo de TSP1 (RIDNOUR e *co/s.*, 2005).

Neste estudo, também observamos aumento do nível de fosforilação de Akt, p70 S6 e RSK1/2/3 nas células tratadas com recTSP2, o que é contraditório ao que se observou com relação a diminuição de viabilidade destas células. A ativação da via de PI3K leva a produção de PIP3, um segundo mensageiro desta via de sinalização, que então ativa a fosforilação de várias cinases celulares, incluindo Akt, p70 S6 e RSK (KIM; LEE, 2007). Akt é uma cinase serina/treonina de importância crítica no que respeito à sinalização de fatores de crescimento, proliferação celular, sobrevivência e oncogênese. Responsivo à via PI3K/Akt, a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é um efetor que é especificamente importante na regulação do crescimento celular (ALTOMARE; KHALED, 2012). A proteína p70 S6 é uma cinase serina/treonina substrato direto de mTOR e que possui funções especialmente relacionadas com regulação de síntese de proteínas, progressão do ciclo celular, além de crescimento, sobrevivência e migração celulares (IP; WONG, 2012). Já os membros da família RSK desempenham um papel-chave no crescimento celular ativado por mitógenos, na diferenciação e na sobrevivência celular (PIM; LEE, 2007). Estudos anteriores já demonstraram a ativação da via de PI3K por TSP1, estando relacionada com resistência a morte celular por anoikia (SHORT e *co/s.*, 2005) ou através da interação com integrina β 1, relacionando-se com desmontagem da adesão focal de CEs (ORR e *co/s.*, 2002).

Também observamos o aumento da fosforilação de paxilina. Paxilina é uma proteína multidomínio adaptadora que integra diversos sinais de integrinas, receptores da superfície celular e fatores de crescimento. Através destas interações, paxilina regula uma variedade de funções fisiológicas, incluindo a organização da MEC, a motilidade celular, a remodelação de tecidos, metástase, expressão gênica, sobrevivência e proliferação celular. Em CaP, paxilina está envolvida na remodelação do citoesqueleto e de adesão focal, e medeia sinalização tanto extra e quanto intranuclear de RA e ERK (SEN e *co/s.*, 2010).

Desta forma, os efeitos celulares encontrados relacionados com o tratamento com recTSP2 podem ser ocasionados devido a um balanço entre a ativação e a

inativação de determinadas vias de sinalização envolvidas com a sobrevivência celular. Neste caso, observamos a ativação da fosforilação de proteínas envolvidas com a via de sinalização PI3K e a inativação da fosforilação de proteínas das vias de sinalização Raf/MEK/ERK e MAPK/JNK.

Com relação aos diferentes graus de inibição da viabilidade celular causada pelo tratamento com recTSP2 em PC3 e DU145, torna-se interessante ressaltar que uma das diferenças principais entre estas duas linhagens de CaP é que elas possuem status diferentes para a presença de PTEN, apesar de ambas serem linhagens celulares provenientes de metástases. Enquanto PC3 é PTEN^{-/-}, DU145 é PTEN^{+/-}. Perdas mono e bialélicas do gene PTEN têm sido implicadas na progressão do CaP e associadas com piores desfechos clínicos desta doença (TAYLOR e cols., 2010; CHEN e cols., 2011). Numa série de modelos, foi observado que a proteína PTEN medeia os seus efeitos antitumorais através de sinalização que pode ser dependente da inibição da via de PI3K/AKT ou independente desta via, pelo aumento da integridade cromossômica nuclear (SHEN e cols., 2007). O tratamento com recTSP2 em PC3 apresentou os efeitos mais significativos na diminuição de sua viabilidade, em comparação com os efeitos na viabilidade de DU145, e levou ao aumento da fosforilação de Akt (T308). Dessa forma, é possível que as diferenças encontradas com relação aos diferentes graus de resposta de PC3 e DU145 ao tratamento recTSP2s estejam relacionadas com a ativação, por PTEN, de vias independentes da sinalização PI3K/Akt.

Estudos futuros irão validar a alteração da fosforilação e o envolvimento destas proteínas e vias de sinalização com relação aos efeitos celulares relacionados com o tratamento com recTSP2, assim como identificar os receptores envolvidos com estes efeitos.

Todas essas observações são consistentes com a possibilidade de TSP2 ser um inibidor tumoral em células de CaP, o que já foi demonstrado para outros tipos tumorais. Proteínas que possuem seus níveis alterados no câncer estão, provavelmente, correlacionadas com os inúmeros processos e vias biológicas que são alterados nesta doença. Esses processos são alterados durante o surgimento e a progressão tumorais, em prol do favorecimento de vias que possibilitem o crescimento tumoral de potencial ilimitado. Ao mesmo tempo, ocorre inibição das vias que regulam e limitam este crescimento.

Adicionalmente, é importante ressaltar que TSP2 e TSP1 compartilham

muitos domínios e funções similares (KAZEROUNIAN e *cols.*, 2008) e pode-se sugerir que estas proteínas têm padrões similares de expressão e, possivelmente, papéis complementares como inibidores da angiogênese e da progressão tumorais, como já foi indicado por outros autores (BORNSTEIN, 2009). Dados da literatura mostram que TSP1 diminui a proliferação e leva a apoptose das células tumorais prostáticas humanas LNCaP (BASTIAN e *cols.*, 2005), além de regular o crescimento prostático epitelial e estromal, através de inibição da angiogênese e ativação de TGF β latente (FITCHEV e *cols.*, 2010). Recentemente, foi demonstrado que TSP1 também está envolvido na inibição da formação de metástases em modelo de CaP resistente a castração hormonal (JENNBACKEN e *cols.*, 2012).

A progressão tumoral se baseia em alguns pilares fundamentais (HANAHAN; WEINBERG, 2011), que são as vias e eventos mais comumente alterados e fundamentais para o sucesso do tumor. Além disso, torna-se cada vez mais evidente que os processos de surgimento e progressão tumorais não são dependentes unicamente das células tumorais. A participação das células do estroma e dos fatores liberados por elas se mostra cada vez mais presente e fundamental nesses processos. Com relação a angiogênese sustentada, processo que poderia ser inibido por TSP2, as células tumorais, ao longo da progressão do câncer, adquirem a capacidade de desequilibrar a balança entre fatores que promovem e inibem a angiogênese. TSP2, uma vez com sua expressão diminuída no microambiente estromal, poderia ter papel importante neste processo de interação tumor-estroma. Também é importante mencionar que a expressão epitelial e estromal de TSP2 e suas interações também poderiam ser potenciais alvos terapêuticos para o CaP, por meio de estratégias para interromper as interações entre as células tumorais e as células do estroma, aumentando a eficácia de terapias anti-angiogênicas (SOKOLOFF; CHUNG, 1999; DAYYANI e *cols.*, 2011).

6. Conclusão geral

Em conclusão, o presente estudo apresenta a primeira caracterização detalhada da expressão de TSP2 no CaP, com relação a seu transcrito e sua proteína. Nossos resultados demonstram que TSP2 possui menor nível de expressão em amostras teciduais e linhagens celulares de CaP, quando comparadas com amostras teciduais de HPB e linhagens celulares não tumorais, respectivamente. Também demonstramos que esta diminuição da expressão no CaP ocorre especialmente no compartimento estromal de CaP, indicando que este poderia ser um dos mecanismos pelos quais a tumorigênese e a progressão tumorais são favorecidas. O menor nível de expressão de TSP2 no CaP apresentou potencial aplicação no diagnóstico diferencial de CaP e HPB.

Adicionalmente, apresentamos as primeiras evidências acerca da potencial função de TSP2 no CaP e das vias associadas com estas funções. O tratamento de linhagens celulares de CaP, PC3 e DU145, com recTSP2 levou a diminuição da viabilidade celular e aumento do percentual de células na fase sub-G1 do ciclo celular. Além disso, nossos resultados sugerem que os efeitos celulares observados após o tratamento com recTSP2 podem ser ocasionados devido a um balanço entre a ativação e a inativação de determinadas vias de sinalização envolvidas com a sobrevivência celular, como as vias de PI3K, Raf/MEK/ERK e MAPK/JNK, e proteínas envolvidas na regulação de ciclo celular.

7. Perspectivas

✓ Avaliação do potencial de TSP2 como auxiliar na complementação do diagnóstico diferencial CaP e HPB, através de análise do perfil de expressão do transcrito e da proteína TSP2, em maior número de amostras de CaP e HPB e em diferentes coortes.

✓ Investigar os efeitos da interação tumor-estroma na alteração dos níveis de TSP2, através de ensaios de co-cultura de linhagens celulares tumorais e estromais. Também serão feitos ensaios de cultura das células tumorais com o meio condicionado das células estromais, avaliando o nível de TSP2 e correlacionando os dados obtidos com marcadores para funções conhecidas de TSP2, como angiogênese.

✓ Validar a alteração dos níveis de fosforilação diferencialmente encontrados através da análise fosfo-proteômica das células tratadas com recTSP2, além de validar funcionalmente a importância da alteração da fosforilação das proteínas encontradas.

8. Referências

Adams, J.C.; Lawler, J. The thrombospondins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v.3, n. 10, p. a009712, 2011.

Adams, J.C.; Lawler, J. The thrombospondins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, p. 961-8, 2004.

Adams, J.C. Thrombospondins: Multifunctional Regulators of Cell Interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 17, p. 25-51, 2001.

Adams, J. The case of scirrhus of the prostate gland with corresponding affliction of the lymphatic glands in the lumbar region and in the pelvis. *Lancet*, v. 62, p. 393, 1853.

Adolph, K.W.; Liska, D.J.; Bornstein, P. Analysis of the promoter and transcription start sites of the human thrombospondin 2 gene (THBS2). *Gene*, v. 193, n. (1), p. 5-11, 1997.

Adolph, K.W. Detection of Exon Skipping and Retained Introns in Transcription of the Human Thrombospondin 2 Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 258, p. 792–796, 1999a.

Adolph KW. Relative Abundance of Thrombospondin 2 and Thrombospondin 3 mRNAs in Human Tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 258, p. 792–796, 1999b.

Agah, A.; Kyriakides, T.R.; Letrondo, N.; Bjorkblom, B.; Bornstein, P. Thrombospondin 2 levels are increased in aged mice: consequences for cutaneous wound healing and angiogenesis. *Matrix Biology*, v. 22, p. 539–547, 2004.

Ahmed, M.; Li, L.C. Adaptation and clonal selection models of castration-resistant prostate cancer: Current perspective. *International Journal of Urology*, in press, 2012.

Alford, A.I.; Reddy, A.B.; Goldstein, S.A. e cols. Two Molecular Weight Species of Thrombospondin-2 Are Present in Bone and Differentially Modulated in Fractured and Nonfractured Tibiae in a Murine Model of Bone Healing. *Calcified Tissue International*, v. 90, p. 420–428, 2012.

Altomare, D.A.; Khaled, A.R. Homeostasis and the Importance for a Balance Between AKT/mTOR Activity and Intracellular Signaling. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 22, p. 3748–3762, 2012.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society, 2012.

Andriole, G.; Djavan, B.; Fleshner, N. e cols. The case of prostate cancer screening with prostate-specific antigen. *European Urology*, v. 5, p. 737–45, 2004.

Angel, P.; Karin, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1072, p. 129–157, 1991.

Arderiu, G.; Cuevas, I.; Chen, A. e cols. HoxA5 stabilizes adherens junctions via increased Akt1. *Cell Adhesion & Migration*, v. 1, n. 4, p 185-95, 2007.

Armstrong, L.C.; Bjořrkblom, B.; Hankenson, K.D. e cols. Thrombospondin 2 Inhibits Microvascular Endothelial Cell Proliferation by a Caspase-independent Mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, p. 1893–1905, 2002.

Aschelter, A.M.; Giacinti, S.; Caporello, P. e cols. Genomic and epigenomic alterations in prostate cancer. *Frontiers in Endocrinology*, v. 3, p. 128, 2012.

Attard, G.; Cooper, C.S.; De Bono, J.S. Steroid hormone receptors in prostate cancer: a hard habit to break? *Cancer Cell* v. 16, p. 458–62, 2009.

Ayala, G.; Tuxhorn, J.A.; Wheeler, T.M. e cols. Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 9, n. 13, p. 4792-801, 2003.

Babaian, R.J.; Johnston, D.A.; Naccarato, W. e cols. The incidence of prostate cancer in a screening population with a serum prostate specific antigen between 2.5 and 4.0 ng/mL: Relation to biopsy strategy. *Journal of Urology*, v. 165, p. 757–760, 2001.

Bai, W.; Wang, L.; Ji, W. e cols. Expression profiling of supraglottic carcinoma: PTEN and thrombospondin 2 are associated with inhibition of lymphatic metastasis. *Acta Otolaryngologica*, v. 129, n. 5, p. 569-74, 2009.

Bastian, M.; Steiner, M.; Schuff-Werner, P. Expression of thrombospondin-1 in prostate-derived cell lines. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 15, n. 1, p. 49-56, 2005.

Beck, L.Jr.; D'Amore, P.A. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB Journal*, v. 11, n. 5, p. 365-73, 1997.

Bein, K.; Simons, M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 32167–32173, 2000.

Bein, K.; Ware, J.A.; Simons, M. Myb-dependent regulation of thrombospondin 2 expression. Role of mRNA stability. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 33, p. 21423-9, 1998.

Berglund, R.K.; Jones, J.S.; Ulchaker, J.C. e cols. Radical prostatectomy as primary treatment modality for locally advanced prostate cancer: a prospective analysis. *Urology*, v. 67, n. 6, p. 1253–1256, 2006.

Bertin, N.; Clezardin, P.; Kubiak, R. e cols. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in normal, benign, and neoplastic human breast tissues: correlation with prognostic factors, tumor angiogenesis, and fibroblastic desmoplasia. *Cancer Research*, v. 57, n. 3, p. 396-9, 1997.

Borley, N.; Feneley, M.R. Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian Journal of Andrology*, v. 11, p. 74–80, 2009.

Bornstein, P.; Armstrong, L.C.; Hankenson, K.D. e cols. Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions. *Matrix Biology*, v. 19, p. 557-568, 2000a.

Bornstein, P.; Kyriakides, T.R.; Yang, Z. e cols. Thrombospondin 2 modulates collagen fibrillogenesis and angiogenesis. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, v. 5, p. 61–66, 2000b.

Bornstein, P.; O'Rourke, K.; Wikstrom, K. e cols. A second, expressed thrombospondin gene *Thbs2* exists in the mouse genome. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 12821-12824, 1991.

Bostwick, D.G.; Gould, V.E.; Qian, J.Q. e cols. Prostate cancer detected by uPM3:Radical prostatectomy findings. *Modern Pathology*, v. 19, p. 630–633, 2006.

Bostwick, D.G.; Qian, J.Q.; Frankel, K. The incidence of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in needle biopsies. *Journal of Urology*, v. 154, p. 1791–1794, 1995.

Bostwick, D.G. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia—The most likely precursor of prostate-cancer. *Cancer*, v. 75, p. 1823–1836, 1995.

Boyle, P.; Levin, B. editors. World cancer report 2008. Lyon: IARC Press; 2008. Boyle, P.; Levin, B. editors. World cancer report 2008. Lyon: IARC Press;

Bracarda, S.; Logothetis, C.; Sternberg, C.N. e cols. Current and emerging treatment modalities for metastatic castration resistant prostate cancer. *BJU International*, v. 107 (Suppl 2), p. 13–20, 2011.

Brawer, M.K. Prostatic intraepithelial neoplasia: A premalignant lesion. *Human Pathology*, v. 23, p. 242–248, 1992.

Bubendorf, L.; Schöpfer, A.; Wagner, U. e cols. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Human Pathology*, v. 31, n. 5, p. 578-83, 2000.

Bunting, P.S. Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen: beware the biases. *Clinica Chimica Acta*, v. 315, n. 1-2, p. 71-97, 2002.

Catalona, W.J.; Hudson, M.A.; Scardino, P.T. e cols. Selection of optimal prostate specific antigen cutoffs for early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *Journal of Urology*, v. 152, p. 2037–42, 1994.

Chandran, U.R.; Ma, C.; Dhir, R. e cols. Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. *BMC Cancer*, v. 12, n. 7, p. 64, 2007.

Chen, G.; Gharib, T.G.; Huang, C.C. e cols. Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 1, n. 4, p. 304-313, 2002.

Chen, H.; Strickland, D.K.; Mosher, D.F. Metabolism of thrombospondin 2. Binding and degradation by 3t3 cells and glycosaminoglycan-variant Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 15993–15999, 1996.

Chen, M.; Pratt, C.P.; Zeeman, M.E. e cols. Identification of PHLPP1 as a tumor suppressor reveals the role of feedback activation in PTEN-mutant prostate cancer progression. *Cancer Cell*, v. 20, n. 2, p. 173-86, 2011.

Chijiwa, T.; Abe, Y.; Inoue, Y. e cols. Cancerous, but not stromal, thrombospondin-2 contributes prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Oncology Reports*, v. 22, n. 2, p. 279-83, 2009.

Chughtai, B.; Lee, R.; Te, A. e cols. Role of inflammation in benign prostatic hyperplasia. *Reviews in urology*, v. 13, n. 3, p. 147-150, 2001.

Ciocca, D.R., Cuello-Carrión, F.D., Natoli, A.L. e cols. Absence of caveolin-1 alters heat shock protein expression in spontaneous mammary tumors driven by Her-2/neu expression. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 137, n. 2, p. 187-194, 2012.

Coffey, K.; Robson, C.N. Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *Journal of Endocrinology*, v. 215, n. 2, p. 221-37, 2012.

Coppola, V.; De Maria, R.; Bonci, D. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, v. 17, p. F1–17, 2010.

Cunha, G.R.; Hayward, S.W.; Dahiya, R. e cols. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anatomica*, v. 155, n. 1, p. 63-72, 1996.

Cunha, G.R.; Hayward, S.W.; Wang, Y.Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation*, v. 70, n. 9-10, p. 473-485, 2002.

Czekierdowski, A.; Czekierdowska, S.; Danilos, J. e cols. Microvessel density and CpG island methylation of the THBS2 gene in malignant ovarian tumors. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 59, n. 4, p. 53-65, 2008.

D'Amico, A.V.; Whittington, R.; Malkowicz, S.B. e cols. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*, v. 280, n. 11, p. 969–974, 1998.

Dakhova, O.; Ozen, M.; Creighton, C.J. e cols. Global gene expression analysis of reactive stroma in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 12, p. 3979-89, 2009.

Danielsen, J.M.; Knudsen, L.M.; Dahl, I.M. e cols. Dysregulation of CD47 and the ligands thrombospondin 1 and 2 in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, v. 138, n. 6, p. 756-60, 2007.

Davis, A.K.; Makar, R.S.; Stowell, C.P. e cols. ADAMTS13 binds to CD36: a potential mechanism for platelet and endothelial localization of ADAMTS13. *Transfusion*, v. 49, n. 2, p. 206-13, 2009.

Dayyani, F.; Gallick, G.E.; Logothetis, C.J. e cols. Novel therapies for metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 103, n. 22, p. 1665-1675, 2011.

De Fraipont, F.; Nicholson, A.C.; Feige, J.J. e cols. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends in Molecular Medicine*, v. 7, n. 9, p. 401-7, 2001.

DeMarzo, A.M.; Nelson, W.G.; Isaacs, W.B. e cols. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet*, v. 361, p. 955–964, 2003.

Deutsch, E.; Maggiorella, L.; Eschwege, P. e cols. Environmental, genetic, and molecular features of prostate cancer. *Lancet Oncology*, v. 5, p. 303–13, 2004.

Diaw, L.; Roth, M.; Schwinn, D.A. e cols. Characteristics of a human prostate stromal cell line related to its use in a stromal-epithelial coculture model for the study of cancer chemoprevention. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, v. 41, n. 5-6, p. 142-8, 2005.

Dong, Z.; Birrer, M.J.; Watts, R.G. e cols. Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, p. 609–613, 1994.

Durand, X.; Moutereau, S.; Xylinas, E. e cols. ProgensisTM PCA3 test for prostate cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 11, n. 2, p. 137-44, 2011.

Edwards, J.; Bartlett, J.M. The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: androgen-receptor cofactors and bypass pathways. *BJU International*, v. 95, p. 1327–35, 2005.

Edwards, S.M.; Eeles, R.A. Unravelling the genetics of prostate cancer. American journal of medical genetics. Part C. *Seminars in medical genetics*, v. 129, p. 65–73, 2004.

Ernst, T.; Hergenhahn, M.; Kenzelmann, M. e cols. Decrease and gain of gene expression are equally discriminatory markers for prostate carcinoma: a gene expression analysis on total and microdissected prostate tissue. *The American Journal of Pathology*, v. 160, n. 6, p. 2169-80, 2002.

Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA 2011.

Faith, D.; Han, S.; Lee, D.K. e cols. p16 is upregulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate. *Prostate*, v. 65, p. 73–82, 2005.

Farrow, B.; Berger, D.H.; Rowley, D. Tumor-derived pancreatic stellate cells promote pancreatic cancer cell invasion through release of thrombospondin-2. *Journal of Surgical Research*, v. 156, n. 1, p. 155-60, 2009.

Fears, C.Y.; Grammer, J.R.; Stewart, J.E.Jr. e cols. Low-density lipoprotein receptor-related protein contributes to the antiangiogenic activity of thrombospondin-2 in a murine glioma model. *Cancer Research*, v. 65, n. 20, p. 9338-46, 2005.

Feldman, B.J.; Feldman, D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 1, p. 34-45, 2001.

Fitchev, P.P.; Wcislak, S.M.; Lee, C. e cols. Thrombospondin-1 regulates the normal prostate in vivo through angiogenesis and TGF-beta activation. *Laboratory Investigation*, v. 90, n. 7, p. 1078-90, 2010.

Gann, P.H.; Hennekens, C.H.; Stampfer, M.J. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostate cancer. *JAMA*, v. 273, p. 289–94, 1995.

Gilbert, S.M.; Cavallo, C.B.; Kahane, H. e cols. Evidence suggesting PSA cutpoint of 2.5 ng/mL for prompting prostate biopsy: Review of 36,316 biopsies. *Urology*, v. 65, p. 549–553, 2005.

Gittelman, M.; Hertzman, B.; Bailen, J. e cols. PROGENSA®PCA3 molecular urine test as a predictor of repeat prostate biopsy outcome in men with previous negative biopsies: A prospective multicenter clinical study. *Journal of Urology*, in press, 2013.

Gleason, D.F.; Mellinger, G.T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *Journal of Urology*, v. 111, n. 1, p. 58-64, 1974.

Gregg, J.L.; Brown, K.E.; Mintz, E.M. e cols. Analysis of gene expression in prostate cancer epithelial and interstitial stromal cells using laser capture microdissection. *BMC Cancer*, v. 10, p. 165, 2010.

Grönberg, H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet*, v. 361, n. 9360, p. 859-64, 2003.

Hahn, W.; Ho, S-H.; Jeong, J-G. e cols. Viral vector-mediated transduction of a modified thrombospondin-2 cDNA inhibits tumor growth and angiogenesis. *Gene Therapy*, v. 11, p. 739–745, 2004.

Hamberg, P.; Verhagen, P.C.; de Wit, R. When to start cytotoxic therapy in asymptomatic patients with hormone refractory prostate cancer? *European Journal of Cancer*, v. 44, p. 1193–1197, 2008.

Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, p. 57–70, 2000. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, p. 57–70, 2000.

Hansen, J.; Rink, M.; Graefen, M. e cols. Assays for prostate cancer : changing the screening paradigm? *Molecular diagnosis & therapy*, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2013.

Hatakeyama, H.; Nishizawa, M.; Nakagawa, A. e cols. Thrombospondin expression in aldosterone-producing adenomas. *Hypertension Research*, v. 25, n. 4, p. 523-7, 2002.

Hawighorst, T.; Velasco, P.; Streit, M. e cols. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO Journal*, v. 20, n. 11, p. 2631-40, 2001.

Hayes, R.B.; Liff, J.M.; Pottner, L.M. e cols. Prostate cancer risk in US blacks and whites with a family history of cancer. *International Journal of Cancer*, v. 60, p. 361–64, 1995.

Heidenreich, A.; Bellmunt, J.; Bolla, M. e cols. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *European Urology*, v. 59, n. 1, p. 61–71, 2011.

Hori, S.; Jabbar, T.; Kachroo, N. e cols. Outcomes and predictive factors for biochemical relapse following primary androgen deprivation therapy in men with bone scan negative prostate cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 137, n. 2, p. 235–241, 2011.

Huang, L.W.; Garrett, A.P.; Bell, D.A. e cols. Differential expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein and mRNA in epithelial ovarian tumors. *Gynecology Oncology*, v. 77, n. 3, p. 369-76, 2000.

Iared, W.; Valente, O. Revisões sistemáticas de estudos de acurácia. *Diagnostico & Tratamento*, v. 14, n. 2, p. 85-8, 2009.

Ioachim, E.; Michael, M.C.; Salmas, M. e cols. Thrombospondin-1 expression in urothelial carcinoma: prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. *BMC Cancer*, v. 6, p. 140, 2006.

Ip, C.K.; Wong, A.S. p70 S6 kinase and actin dynamics: A perspective. *Spermatogenesis*, v. 2, n. 1, p. 44-52, 2012.

Jennbacken, K.; Welén, K.; Olsson, A. e cols. Inhibition of metastasis in a castration resistant prostate cancer model by the quinoline-3-carboxamide tasquinimod (ABR-215050). *Prostate*, v. 72, n. 8, p. 913-24, 2012.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. 10ª Edição. Editora Guanabara Koogan, 2004.

Kajihara, I.; Jinnin, M.; Yamane, K. e cols. Increased accumulation of extracellular thrombospondin-2 due to low degradation activity stimulates type I collagen expression in scleroderma fibroblasts. *American Journal of Pathology*, v. 180, n. 2, p. 703-14, 2012.

Kalas, W.; Yu, J.L.; Milsom, C. e cols. Oncogenes and Angiogenesis: down-regulation of thrombospondin-1 in normal fibroblasts exposed to factors from cancer cells harboring mutant ras. *Cancer Research*, v. 65, n. 19, n. 8878-86, 2005.

Kawakami, J.; Cowan, J.E.; Elkin, E.P. e cols. Androgen-deprivation therapy as primary treatment for localized prostate cancer: data from Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor (CaPSURE). *Cancer*, v. 106, n. 8, p. 1708–1714, 2006.

Kazerounian, S.; Yee, K.O.; Lawler, J. Thrombospondins in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, n. 5, p. 700-12, 2008.

Kazuno, M.; Tokunaga, T.; Oshika, Y. e cols. Thrombospondin-2 (TSP2) expression is inversely correlated with vascularity in glioma. *European Journal of Cancer*, v. 35, n. 3, p. 502-6, 1999.

Kelly, K.A.; Setlur, S.R.; Ross, R. e cols. Detection of early prostate cancer using a hepsin-targeted imaging agent. *Cancer Research*, v. 68, n. 7, p. 2286-91, 2008.

Kim, S.G.; Lee, S.J. PI3K, RSK, and mTOR Signal Networks for the GST Gene Regulation. *Toxicological Sciences*, v. 96, n. 2, p. 206–213, 2007.

Klotz, L. Active surveillance with selective delayed intervention for favorable risk prostate cancer. *Urologic Oncology*, v. 24, n. 1, p. 46-50, 2006.

Koch, M.; Hussein, F.; Woeste, A. e cols. CD36-mediated activation of endothelial cell apoptosis by an N-terminal recombinant fragment of thrombospondin-2 inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 128, n. 2, p. 337-46, 2011.

Kodama, J.; Hashimoto, I.; Seki, N. e cols. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in invasive cervical cancer: correlation with angiogenesis and prognosis. *Clinical Cancer Research*, v. 7, n. 9, p. 2826-31, 2001.

Kokenyesi, R.; Armstrong, L.C.; Agah, A. e cols. Thrombospondin 2 deficiency in pregnant mice results in premature softening of the uterine cervix. *Biology of Reproduction*, v. 70, n. 2, p. 385-90, 2004.

Kopper, L.; Timar, J. Genomics of prostate cancer: is there anything to "translate"? *Pathology & Oncology Research*, v. 11, p. 197–203, 2005.

Kosari, F.; Asmann, Y.W.; Cheville, J.C. e cols. Cysteine-rich secretory protein-3: a potential biomarker for prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 11, n. 11, p. 1419-26, 2002.

Krady, M.M.; Zeng, J.; Yu, J. e cols. Thrombospondin-2 modulates extracellular matrix remodeling during physiological angiogenesis. *American Journal of Pathology*, v. 173, n. 3, p. 879-91, 2008.

Kral, M.; Rosinska, V.; Student, V. e cols. Genetic determinants of prostate cancer: a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, v. 155, n. 1, p. 3-9, 2011.

Kunz, M.; Koczan, D.; Ibrahim, S.M. e cols. Differential expression of thrombospondin 2 in primary and metastatic malignant melanoma. *Acta Dermatovenereologica*, v. 82, n. 3, p. 163-9, 2002.

Kwak, C.; Jin, R.J.; Lee, C. e cols. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU International*, v. 89, n. 3, p. 303-9, 2002.

Kyriakides, T.R.; Tam, J.W.; Bornstein P. Accelerated wound healing in mice with a disruption of the thrombospondin 2 gene. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 113, p. 782–787, 1999.

Kyriakides, T.R.; Zhu, Y.H.; Smith, L.T. *e cols.* Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *Journal of Cell Biology*, v. 140, p. 419–430, 1998b.

Kyriakides, T.R.; Zhu, Y.H.; Yang, Z. *e cols.* The distribution of the matricellular protein thrombospondin 2 in tissues of embryonic and adult mice. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 46, n. 9, p. 1007-15, 1998a.

LaBell, T.L.; Milewicz, D.J.M.; Disteché, C.M. *e cols.* Thrombospondin II: partial cDNA sequence, chromosome location, and expression of a second member of the thrombospondin gene family in humans. *Genomics*, v. 12, p. 421–429, 1992.

LaTulippe, E.; Satagopan, J.; Smith, A. *e cols.* Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Research*, v. 62, n. 15, p. 4499-506, 2002.

Lawler, J.; Detmar, M. Tumor progression: the effects of thrombospondin-1 and -2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, n. 6, p. 1038-45, 2004.

Laxman, B.; Morris, D.S.; Yu, J. *e cols.* First-Generation Multiplex Biomarker Analysis of Urine for the Early Detection of Prostate Cancer. *Cancer Research*, v. 68, p. 645, 2008.

Lee, J.T.; Lehmann, B.D.; Terrian, D.M. *e cols.* Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways. *Cell Cycle*, v. 7, n. 12, p. 1745-62, 2008.

Li, L.C.; Carroll, P.R.; Dahiya, R. Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 97, p. 103–115, 2005.

Li, L.C.; Okino, S.T.; Dahiya, R. DNA methylation in prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1704, p. 87–102, 2004.

Li, Z.; Moore, D.H.; Meng, Z.H. e cols. Increased risk of local recurrence is associated with allelic loss in normal lobules of breast cancer patients. *Cancer Research*, v. 62, p. 1000-1003, 2002.

Lin, J.; Kelly, W.K. Targeting angiogenesis as a promising modality for the treatment of prostate cancer. *Urologic Clinics of North America*, v. 39, n. 4, p. 547-60, 2012.

Lipsky, B.A.; Byren, I.; Hoey, C.T. Treatment of Bacterial Prostatitis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 50, n. 12, p. 1641–1652, 2010.

Lopaczynski, W.; Hruszkewycz, A.M.; Lieberman, R. Preprostatectomy: A clinical model to study stromal-epithelial interactions. *Urology*, v. 57, n. 4 (Suppl 1), p. 194-199, 2001.

Luo, J.; Martinez, J.; Yin, X. e cols. Hypoxia induces angiogenic factors in brain microvascular endothelial cells. *Microvascular Research*, v. 83, n. 2, p. 138-45, 2012.

Macintosh, C.A.; Stower, M.; Reid, N. e cols. Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypic heterogeneity. *Cancer Research*, v. 58, n. 1, p. 23-28, 1998.

Maclauchlan, S.; Skokos, E.A.; Agah, A. e cols. Enhanced angiogenesis and reduced contraction in thrombospondin-2-null wounds is associated with increased levels of matrix metalloproteinases-2 and -9, and soluble VEGF. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 57, p. 301–313, 2009.

MacLauchlan, S.; Yu, J.; Parrisha, M. e cols. Endothelial nitric oxide synthase controls the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 46, p. 1137–1145, 2011.

Maluf, F.C.; Smaletz, O.; Herchenhorn, D. Castration-resistant prostate cancer: systemic therapy in 2012. *Clinics*, v. 67, n. 4, p. 389-94, 2012.

Manning, B.D.; Cantley, L.C. Hitting the target: emerging technologies in the search for kinase substrates. *Signal Transduction Knowledge Environment*, v. 2002, n. 162, p. 49, 2002.

Meng, H.; Zhang, X.; Lee, S.J. e cols. LDL-receptor related protein (LRP1) regulates Thrombospondin-2 (TSP2) enhancement of Notch3 signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, p. 23047–23055, 2010.

Morishita, A.; Gong, J.; Nomura, T. e cols. The use of protein array to identify targetable receptor tyrosine kinases for treatment of human colon cancer. *International Journal of Oncology*, v. 37, n. 4, p. 829-35, 2010.

Mosquera, J.M.; Mehra, R.; Regan, M.M. e cols. Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 14, p. 4706–4711, 2009.

Mottet, N.; Bellmunt, J.; Bolla, M. e cols. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *European Urology*, v. 59, n. 4, p. 572–583, 2011.

Nauseef, J.T.; Henry, M.D. Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? *Nature Reviews Urology*, v. 8, n. 8, p. 428-39, 2011.

Nelson, W. G.; Carter, B.; DeWeese, T.L. e cols. "Prostate cancer," in *Clinical Oncology*, 4 edicao v. 2, Philadelphia, PA: Elsevier, p. 1656–1657, 2008.

Neves, A.F.; Dias-Oliveira, J.D.; Araújo, T.G. e cols. Prostate cancer antigen 3 (PCA3) RNA detection in blood and tissue samples for prostate cancer diagnosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, p. 1-7, 2012.

Nickel, J.C. Inflammation and benign prostatic hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*, v. 35, n. 1, p. 109-15, 2008.

Nieto, M.; Finn, S.; Loda, M. e cols. Prostate cancer: Re-focusing on Androgen Receptor Signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, n. 9, p. 1562–1568, 2007.

Niu, Y.N.; Xia, S.J. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, v. 11, n. 1, p. 28-35, 2009.

Noh, Y.H.; Matsuda, K.; Hong, Y.K. e cols. An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 121, p. 1536–1543, 2003.

Oganesian, A.; Armstrong, L.C.; Migliorini, M.M. e cols. Thrombospondins use the VLDL receptor and a nonapoptotic pathway to inhibit cell division in microvascular endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 19, n. 2, p. 563-71, 2008.

Oliveras-Ferraros, C.; Vazquez-Martin, A.; Martin-Castilló, B. e cols. Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: new insights into de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *International Journal of Oncology*, v. 37, n. 3, p. 669-78, 2010.

Orr, A.W.; Pallero, M.A.; Murphy-Ullrich, J.E. Thrombospondin stimulates focal adhesion disassembly through Gi- and phosphoinositide 3-kinase-dependent ERK activation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 23, p. 20453-60, 2002.

Osborne, J.K.; Zaganjor, E.; Cobb, M.H. Signal control through Raf: in sickness and in health. *Cell Research*, v. 22, n. 1, p. 14-22, 2012.

Oshika, Y.; Masuda, K.; Tokunaga, T. e cols. Thrombospondin 2 gene expression is correlated with decreased vascularity in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 4, n. 7, p. 1785-8, 1998.

Ouyang, B.; Leung, Y.K.; Wang, V. e cols. α -Methylacyl-CoA racemase spliced variants and their expression in normal and malignant prostate tissues. *Urology*, v. 77, n. 1, p. 249e1-7, 2011.

Palumbo, A.Jr.; Ferreira, L.B.; Reis de Souza, P.A. e cols. Extracellular matrix secreted by reactive stroma is a main inducer of pro-tumorigenic features on LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Letters*, v. 321, n. 1, p. 55-64, 2012.

Panetti, T.S.; Chen, H.; Misenheimer, T.M. e cols. Endothelial cell mitogenesis induced by LPA: inhibition by thrombospondin-1 and thrombospondin-2. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 129, n. 2, p. 208-16, 1997.

Parikh, K.; Peppelenbosch, M.P. Kinome profiling of clinical cancer specimens. *Cancer Research*, v. 70, n. 7, p. 2575-8, 2010.

Perner, S.; Demichelis, F.; Beroukhim, R. e cols. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Research*, v. 66, n. 17, p. 8337–8341, 2006.

Powell, I.J. Epidemiology and pathophysiology of prostate cancer in African-American men. *Journal of Urology*, v. 177, n. 2, p. 444-9, 2007.

Putzi, M.J.; De Marzo, A.M. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*, v. 56, p. 828–832, 2000.

Qian, J.Q.; Wollan, P.; Bostwick, D.G. The extent and multicentricity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in clinically localized prostatic adenocarcinoma. *Human Pathology*, v. 28, p. 143–148, 1997.

Radmayr, C.; Lunacek, A.; Schwentner, C. e cols. 5-alpha-reductase and the development of the human prostate. *Indian Journal of Urology*, v. 24, p. 309–12, 2008.

Ridnour, L.A.; Isenberg, J.S.; Espey, M.G. e cols. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 37, p. 13147-52, 2005.

Ries, L.A.G.; Eisner, M.P.; Kosary, C.L. e cols. SEER cancer statistics review, 1973-1999. http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999/ Bethesda: National Cancer Institute, 2002.

Rigau, M.; Ortega, I.; Mir, M.C. e cols. A three-gene panel on urine increases PSA specificity in the detection of prostate cancer. *Prostate*, v. 71, n. 16, p. 1736-45, 2011.

Roberts, W.; Magwenzi, S.; Aburima, A. e cols. Thrombospondin-1 induces platelet activation through CD36-dependent inhibition of the cAMP/protein kinase A signaling cascade. *Blood*, v. 116, n. 20, p. 4297-306, 2010.

Roehrborn, C.G. Current medical therapies for men with lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia: achievements and limitations. *Reviews in urology*, v. 10, n. 1, p. 14-25, 2008.

Roudier, M.P.; True, L.D.; Higano, C.S. e cols. Phenotypic heterogeneity of end-stage prostate carcinoma metastatic to bone. *Human Pathology*, v. 34, p. 646-653, 2003.

Santin, A.D.; Zhan, F.; Bellone, S. e cols. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Cancer*, v. 112, n. 1, p. 14-25, 2004.

Saraon, P.; Jarvi, K.; Diamandis, E.P. Molecular Alterations during Progression of Prostate Cancer to Androgen Independence. *Clinical Chemistry*, v. 57, n. 10, p. 1366–1375, 2011.

Schroen, B.; Heymans, S.; Sharma, U. e cols. Trombospondin-2 is essential for myocardial matrix integrity: increased expression identifies failure-prone cardiac hypertrophy. *Circulation Research*, v. 95, n. 5, p. 515-22, 2004.

Sen, A.; O'Malley, K.; Wang, Z. e cols. Paxillin regulates androgen- and epidermal growth factor-induced MAPK signaling and cell proliferation in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 537, p. 28787-95, 2010.

Sevli, S.; Uzumcu, A.; Solak, M. e cols. The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, v. 13, p. 208–17, 2010.

Shen, W.H.; Balajee, A.S.; Wang, J. e cols. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell*, v. 128, n. 1, p. 157-70, 2007.

Shigematsu, Y.; Hanagiri, T.; Kuroda, K. e cols. Malignant mesothelioma-associated antigens recognized by tumor-infiltrating B cells and the clinical significance of the antibody titers. *Cancer Science*, v. 100, n. 7, p. 1326-34, 2009.

Short, S.M.; Derrien, A.; Narsimhan, R.P. e cols. Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *Journal of Cell Biology*, v. 168, n. 4, p. 643-53, 2005.

Simantov, R.; Febbraio, M.; Silverstein, R.L. The antiangiogenic effect of thrombospondin-2 is mediated by CD36 and modulated by histidine-rich glycoprotein. *Matrix Biology*, v. 24, p. 27–34, 2005.

Simard, J.; Dumont, M.; Labuda, D. e cols. Prostate cancer susceptibility genes: Lessons learned and challenges posed. *Endocrine-Related Cancer*, v. 10, p.225–59, 2003.

Sokoloff, M.H.; Chung, L.W. Targeting angiogenic pathways involving tumor-stromal interaction to treat advanced human prostate cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, v. 17, n. 4, p. 307-15, 1998-1999.

Stenczer, B.; Molvarec, A.; Veresh, Z. e cols. Circulating levels of the anti-angiogenic thrombospondin 2 are elevated in pre-eclampsia. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, v. 90, n. 11, p. 1291-5, 2011.

Sternberg, C.N. Systemic chemotherapy and new experimental approaches in the treatment of metastatic prostate cancer. *Annals of Oncology*, v. 19, p. vii91–vii95, 2008.

Stone, N.N.; DeAntoni, E.P.; Crawford, E.D. Screening for prostate cancer by digital rectal examination and prostate-specific antigen: results of prostate cancer awareness week, 1989–1992. *Urology*, v. 44, p. 18–25, 1994.

Streit, M.; Riccardi, L.; Velasco, P. e cols. Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 26, p. 14888-93, 1999.

Streit, M.; Stephen, A.E.; Hawighorst, T. e cols. Systemic inhibition of tumor growth and angiogenesis by thrombospondin-2 using cell based antiangiogenic gene therapy. *Cancer Research*, v. 62, p. 2004–2012, 2002.

Tang, Y.; Scheef, E.A.; Gurel, Z. e cols. CYP1B1 and endothelial nitric oxide synthase combine to sustain proangiogenic functions of endothelial cells under hyperoxic stress. *Cell Physiology: American Journal of Physiology*, v. 298, n. 3, p.665-78, 2010.

Taplin, M-E.; Balk, S.P. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 91, p. 483–90, 2004;

Taylor, B.S.; Schultz, N.; Hieronymus, H. e cols. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*, v. 18, n. 1, p. 11-22, 2010.

Tilli, T.M.; Thuler, L.C.; Matos, A.R. e cols. Expression analysis of osteopontin mRNA splice variants in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 92, n. 1, p. 13-9, 2012.

Timms, B.G.; Hofkamp, L.E. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*, v. 82, n. 4-5, p. 173-183, 2011.

TNM Classification of Malignant Tumours, 6a edição. New York: Wiley-Liss; 2002. TNM Classification of Malignant Tumours, 6a edição. New York: Wiley-Liss;

Tokunaga, T.; Nakamura, M.; Oshika, Y. e cols. Thrombospondin 2 expression is correlated with inhibition of angiogenesis and metastasis of colon cancer. *British Journal of Cancer*, v. 79, n. 2, p. 354-9, 1999.

Tomas, D.; Kruslin, B.; Rogatsch, H. e cols. Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma. *European Urology*, v. 51, p. 98–104, 2007.

Tomas, D.; Spajić, B.; Milosević, M. e cols. Intensity of stromal changes predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, v. 44, n. 5, p. 284-90, 2010.

Tomlins, S.A.; Mehra, R.; Rhodes, D.R. *e cols.* Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nature Genetics*, v. 39, p. 41–51, 2007.

Tomlins, S.A.; Rhodes, D.R.; Perner, S. *e cols.* Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, v. 310, p. 644–48, 2005.

Troyer, D.A.; Mubiru, J.; Leach, R.J. *e cols.* Promise and challenge: Markers of prostate cancer detection, diagnosis and prognosis. *Disease Markers*, v. 20, n. 2, p. 117-28, 2004.

Tucker, R.P. The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, n. 6, p. 969-74, 2004.

Tuxhorn, J.A.; Ayala, G.E.; Smith, M.J. *e cols.* Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clinical Cancer Research*, v. 8, n. 9, p. 2912-23, 2002.

Vallbo, C.; Damber, J.E. Thrombospondins, metallo proteases and thrombospondin receptors messenger RNA and protein expression in different tumour sublines of the Dunning prostate cancer model. *Acta Oncologica*, v. 44, n. 3, p. 293-8, 2005.

Vallbo, C.; Wang, W.; Damber, J.E. The expression of thrombospondin-1 in benign prostatic hyperplasia and prostatic intraepithelial neoplasia is decreased in prostate cancer. *BJU International*, v. 93, n. 9, p. 1339-43, 2004.

Volpert, O.V.; Tolsma, S.S.; Pellerin, S. *e cols.* Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 217, n. 1, p. 326-32, 1995.

Vong, S.; Kalluri, R. The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes Cancer*, v. 2, n. 12, p. 1139-45, 2011.

Wang, M.C.; Valenzuela, L.A.; Murphy, G.M. *e cols.* Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative Urology*, v. 17, p. 159–63, 1979.

Wani, J.; Carl, M.; Henger, A. *e cols.* Nitric oxide modulates expression of extracellular matrix genes linked to fibrosis in kidney mesangial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 388, n. 5, p. 497-506, 2007.

Weinberg, D.S.; Weidner, N. Concordance of DNA content between prostatic intraepithelial neoplasia and concomitant invasive carcinoma—Evidence that prostatic intraepithelial neoplasia is a precursor of invasive prostatic-carcinoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 117, p. 1132–1137, 1993.

Welch, D.R.; Rinker-Schaeffer, C.W. What defines a useful marker of metastasis in human cancer? *Journal of the National Cancer Institute*, v. 91, p. 1351–1353, 1999.

Weston, C.R.; Davis, R.J. The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Genetics and Development*, v. 12, p. 14–21, 2002.

Whitbread, A.K.; Veveris-Lowe, T.L.; Lawrence, M.G. *e cols.* The role of kallikrein-related peptidases in prostate cancer: potential involvement in an epithelial to mesenchymal transition. *Biological Chemistry*, v. 387, n. 6, p. 707-14, 2006.

Whitcomb, B.P.; Mutch, D.G.; Herzog, T.J. *e cols.* Frequent HOXA11 and THBS2 promoter methylation, and a methylator phenotype in endometrial adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, v. 9, n. 6, p. 2277-87, 2003.

Whittemore, A.S.; Wu, A.H.; Kolonel, L.N. *e cols.* Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *American Journal of Epidemiology*, v. 141, p. 732–40, 1995.

Widschwendter, M.; Berger, J.; Daxenbichler, G.; *e cols.* Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Research*, v. 57, n. 19, p. 4158-61, 1997.

Witkiewicz, A.K.; Whitaker-Menezes, D.; Dasgupta, A. e cols. Using the "reverse Warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle*, v. 11, n. 6, p. 1108-1117, 2012.

Yamashita, M.; Zhang, X.; Shiraishi, T. e cols. Determination of percent area density of epithelial and stromal components in development of prostatic hyperplasia in spontaneously hypertensive rats. *Urology*, v. 61, n. 2, p. 484-489, 2003.

Yang, Z.; Kyriakides, T.R.; Bornstein, P. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Molecular Biology of the Cell*, v. 11, p. 3353–3364, 2000.

Yang, Z.; Strickland, D.K.; Bornstein, P. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *Journal of Biological Chemistry*, 276, v. 11, p. 8403-8, 2001.

Yoshida, Y.; Oshika, Y.; Fukushima, Y. e cols. Expression of angiostatic factors in colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, v. 15, n. 6, p. 1221-5, 1999.

Young, G.D.; Murphy-Ullrich, J.E. The tryptophan-rich motifs of the thrombospondin type 1 repeats bind VLAL motifs in the latent transforming growth factor-b complex. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 47633–47642, 2004.

Yu, J.; deMuinck, E.D.; Zhuang, Z. e cols. Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 31, p. 10999-11004, 2005.

Zhao, F.J.; Han, B.M.; Yu, S.Q. e cols. Tumor formation of prostate cancer cells influenced by stromal cells from the transitional or peripheral zones of the normal prostate. *Asian Journal of Andrology*, v. 11, n. 2, p. 176-182, 2009.