



Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pesquisa
Divisão de Medicina Experimental

Expressão da proteína Wnt4 e seu possível papel como um antígeno associado ao câncer de próstata

Lívia Carneiro Matos

Orientação: Etel Rodrigues Pereira Gimba

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pesquisa
Divisão de Medicina Experimental

Expressão da proteína Wnt4 e seu possível papel como um antígeno associado ao câncer de próstata

Lívia Carneiro Matos

Orientação: Etel Rodrigues Pereira Gimba

Dissertação apresentada ao Instituto
Nacional de Câncer visando à obtenção
do título de mestre em Oncologia

Rio de Janeiro
2008

B324p

Matos, Livia Carneiro.

Expressão da proteína Wnt4 e seu possível papel como um antígeno associado ao câncer de próstata. / Livia Carneiro Matos – Rio de Janeiro: INCA, 2008. 108p.: il. color.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia – Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2008.

Orientador(a): Etel Rodrigues Pereira Gimba.

1. Neoplasias da Próstata. 2. Proteínas Wnt4. 3. Anticorpos. 4. Antígenos. I. Gimba, Etel Rodrigues. II. Instituto Nacional de Câncer. III. Título.

CDD 616.99463

“Para ser grande, sê inteiro:

Nada teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa.

Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda brilha,

Porque alta vive.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a oportunidade de aprendizado e evolução.

Ao meu pai e à minha mãe, pela confiança, pela dedicação e pelo amor. Obrigada por sempre apoiarem e incentivarem a carreira que escolhi. Sem vocês, eu não estaria onde estou. Sem a educação e o cuidado de vocês, eu não seria quem eu sou. Amo muito vocês!

Ao meu irmão Felipe e à minha irmã Lara, agradeço pelas boas conversas e pelas opiniões que me guiaram. Mesmo longe, sei que estamos muito próximos e isso me conforta e me deixa muito feliz. Amo vocês também!

À Etel, minha orientadora e que muitas vezes foi minha “mãe”, agradeço de coração o carinho e o empenho dedicado a mim e ao projeto durante todo este tempo. Agradeço pela confiança em mim, pela paciência nos momentos difíceis e agradeço também pelos ensinamentos, muitos dos quais levarei para a vida toda...

Ao pessoal do grupo, pela ajuda nos experimentos, pelas discussões construtivas e pela conversa cotidiana, coisas que me davam a força que eu precisava para continuar seguindo.

Às minhas grandes amigas Virgínia, Ana Emília, Nathalia e Elaine, pela presença, pela amizade, pelo apoio e pelos momentos maravilhosos que me proporcionam!

Às pessoas da Divisão de Medicina Experimental que também colaboraram para a execução desse projeto.

À Sueli, Andréia e Dona Rosimar, agradeço pela ajuda que sempre foi de muita boa vontade. Aproveito para elogiar a eficiência e a competência dessas pessoas no serviço que executam. Agradeço também à Taís, Luís Carlos e a

todos os funcionários do laboratório e da CPQ por cuidarem da segurança, limpeza e organização do nosso local de trabalho.

Ao Dr. Fernando Soares, ao Dr. Francisco Fonseca e a todos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, em especial à Cláudia, agradeço pela imensa ajuda na realização e nas análises da imunohistoquímica. Agradeço pela ótima recepção e por tudo que me ensinaram.

Ao Dr. Eloísio Alexsandro Silva e seus alunos do Serviço de Urologia da UERJ, pela coleta das amostras de tecidos tumorais e de soro dos pacientes.

Ao Luiz Cláudio Thuler e à Isabele Small, pela grande ajuda nas análises estatísticas.

A todas as pessoas que participaram deste trabalho, direta ou indiretamente, meu carinho e meu reconhecimento.

Ao suporte financeiro da Fundação Swiss Bridge, FAF/ INCa - Ministério da Saúde, CAPES, CNPq e FAPERJ que tornaram possível a execução desse projeto.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Glândula prostática	1
1.2 Alterações do tecido prostático	2
1.2.1 Câncer de próstata	3
1.2.1.1 Progressão	3
1.2.1.2 Estadiamento do tumor	5
1.2.1.3 Diagnóstico	7
1.2.1.4 Tratamento	9
1.2.1.5 Genes diferencialmente expressos	11
1.2.1.6 Antígenos associados a tumor	13
1.3 Via de sinalização de Wnt	15
1.3.1 Wnts e câncer de próstata	20
1.3.1.1 Wnt4	23
2 OBJETIVOS GERAIS	25
PARTE I – Análise do perfil de expressão da proteína Wnt4 em câncer de próstata	26
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos específicos	27

3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Extração de proteínas totais de tumores e linhagens de CaP	28
3.2 Imunoblot	28
3.3 Construção do microarranjo de tecidos e imunohistoquímica	29
3.4 Avaliação da marcação imunohistoquímica e sua categorização	31
3.5 Análises estatísticas	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Expressão de Wnt4 em extratos protéicos de tumor de próstata	33
4.2 Características das amostras utilizadas no TMA	33
4.3 Perfil de expressão de Wnt4 em células de CaP e HPB	36
4.4 Expressão de Wnt4 em CaP e HPB	38
4.5 Expressão de E-caderina em tecidos prostáticos	44
4.6 Expressão de Topoisomerase II- α em tecidos prostáticos	49
4.7 Correlação entre a expressão das proteínas Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α	54
PARTE II – Avaliação da proteína Wnt4 como um possível antígeno associado ao tumor de próstata	57
2 OBJETIVOS	58
2.1 Objetivos específicos	58
3 MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 Obtenção do cDNA completo de WNT4	59
3.2 Clonagem de WNT4 e seleção das bactérias recombinantes	60
3.3 Verificação da orientação da clonagem	60
3.4 Transformação de bactérias e indução da expressão de proteínas ..	61
3.5 Purificação da proteína recombinante	62
3.6 Imunoblot	63
4 RESULTADOS	65
4.1 Expressão do cDNA completo de WNT4	65

4.2 Clonagem de WNT4 no vetor pET SUMO	66
4.3 Seleção das bactérias recombinantes	67
4.4 Expressão da proteína Wnt4 recombinante	70
4.5 Purificação da proteína recombinante	72
4.6 Ensaio imunológico com soros de pacientes com CaP	76
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÕES	87
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
8 ANEXO	109
8.1 Carta do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA	109

RESUMO

A ativação aberrante da via de sinalização de Wnt tem sido freqüentemente associada à tumorigênese do câncer de próstata (CaP). No entanto, pouco se sabe sobre o papel e perfil de expressão do membro Wnt4 no desenvolvimento deste tumor. Este trabalho apresenta dois principais objetivos: 1- Avaliar a expressão da proteína Wnt4 em amostras tumorais e não tumorais (hiperplasia prostática benigna - HPB) de próstata através de imunohistoquímica em microarranjos de tecido (TMA) e 2- Avaliar o potencial papel da proteína Wnt4 como antígeno associado ao CaP. A análise do perfil de expressão da proteína Wnt4 em amostras tumorais e de HPB apresentou marcação citoplasmática e de membrana, não havendo diferenças estatisticamente significativas no valor mediano da intensidade de marcação entre elas. Ressalta-se uma marcação mais intensa para Wnt4 na borda apical das células epiteliais voltadas para o lúmen do ácinos prostáticos. O perfil de expressão de Wnt4 não apresentou correlação com o Escore de Gleason, níveis de PSA, recidiva clínica e presença de um segundo tumor. No entanto, pacientes cujas amostras de tumor de próstata marcavam mais fortemente para a proteína Wnt4 apresentavam recorrência bioquímica da doença num tempo menor em relação a pacientes cujas amostras apresentavam marcação fraca ou ausente. A expressão das proteínas E-caderina e Topoisomerase II- α também foi analisada nas mesmas amostras do TMA e seus perfis de marcação também não apresentaram correlação com os parâmetros clínico-patológicos investigados. A expressão de Topoisomerase II- α foi maior em amostras de CaP quando comparadas com amostras de HPB. Neste estudo, mostramos haver correlação entre o perfil de marcação das proteínas Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α . Ensaio de imunoblot utilizando a proteína Wnt4 recombinante identificaram a presença de autoanticorpos contra esta proteína em uma mistura de soros de pacientes com CaP, mas não em amostras de soros de indivíduos controles sadios. Em conjunto nossos dados mostram que a proteína Wnt4 não é diferencialmente expressa entre tecidos de CaP e HPB e que quando superexpressa em amostras de tumores de CaP parece apresentar correlação com menor tempo de recorrência bioquímica. Este estudo também apresenta a primeira evidência de que a proteína Wnt4 é

capaz de induzir resposta imune humoral em pacientes com CaP, podendo constituir, portanto, um potencial antígeno associado ao CaP.

ABSTRACT

Aberrant Wnt signaling pathway activation has been associated with prostate cancer (PCa) tumorigenesis. However, the role and expression profiling of Wnt4 member in PCa tumorigenesis is poorly understood. This work presents two main objectives: 1- Evaluate the expression of Wnt4 in tumor and non tumor prostate samples (benign prostate hyperplasia - BPH) through immunohistochemistry in tissue microarrays (TMA) and 2- Evaluate the potential role of Wnt4 as a tumor associated antigen in PCa. Wnt4 expression profiling in PCa and BPH presented a cytoplasmatic and membrane staining pattern, with no significant statistical difference at the median intensity staining values between these two samples. It is noteworthy the stronger Wnt4 staining at the apical border of epithelial cells toward the prostatic acini lumen. Wnt4 expression pattern did not present any correlation to Gleason score, PSA levels, clinical relapse and presence of a second tumor. However, PCa patients whose tumor samples were strongly stained for Wnt4 presented biochemical recurrence earlier than those whose tissues presented weak or absent Wnt4 staining. The expression of E-cadherin and Topoisomerase II- α were also analyzed in these same samples on this TMA and their expression profiling did not present any correlation to the clinical-pathological parameters analyzed as well. The expression of Topoisomerase II- α was higher in PCa tumor samples as compared to BPH tissues. In this study, we showed a correlation between the expression profiling of Wnt4, E-cadherin and Topoisomerase II- α . Immunoblot assays using the Wnt4 recombinant protein identified autoantibodies against this protein in a pool of serum samples from PCa patients, but not in a pool sample from healthy donor individuals. As a whole, our data show that Wnt4 protein is not differentially expressed between PCa e BPH tissues and that there is correlation between highly Wnt4 protein expression in PCa tumor tissues and an earlier biochemical recurrence. This study also provides the first clues that Wnt4 could trigger humoral immune response in PCa patients and hence corresponding to a potential PCa tumor associated antigen.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
AIP	atrofia inflamatória proliferativa
AJCC	“American Joint Committee on Cancer”
AR	receptor de androgênio
BSA	albumina sérica bovina
Ca ⁺²	cálcio
CaP	câncer de próstata
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CPRH	câncer de próstata refratário a hormônio
DAB	diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfato
D.O.	densidade ótica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EG	Escore de Gleason
HPB	hiperplasia prostática benigna
IPTG	isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
Kb	kilobases
kDa	kiloDaltons
LB	meio de cultura Luria-Bertania
LSAB	biotina e estreptavidina marcado
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
NIP	neoplasia intraepitelial prostática
nm	nanômetros

pb	pares de base
PBS	salina tamponada com fosfato
PBS-T	salina tamponada com fosfato contendo Tween 20 a 0,05%
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PSA	antígeno específico da próstata
RNA	ácido ribonucléico
rpm	revoluções por minuto
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa
SDS	sulfato dodecil de sódio
TMA	microarranjo de tecidos
TNM	tumor, linfonodos e metástases
U	Unidade (s) de enzima
Wnt	“wingless type MMTV integration site family”

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de estadiamento TNM para o câncer de próstata.....	6
Tabela 2. Sistema de estadiamento AJCC para o câncer de próstata.....	6
Tabela 3. Genes hipoexpressos em câncer de próstata.....	11
Tabela 4. Genes superexpressos em câncer de próstata.....	12
Tabela 5. Genes ativados pela via de sinalização de Wnt.....	18
Tabela 6. Distribuição dos valores de intensidade de marcação para Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α , segundo a categorização em quartis.....	32
Tabela 7. Características clínico-patológicas dos pacientes com CaP utilizados no TMA.....	35
Tabela 8. Intensidades de expressão de Wnt4 em tecidos tumorais e não tumorais de próstata.....	40
Tabela 9. Mediana da intensidade de marcação para a proteína Wnt4 em amostras de pacientes com CaP classificados para ocorrência ou não de recorrência bioquímica, recidiva clínica da doença e presença de um segundo tumor primário.....	40
Tabela 10. Correlação da expressão de Wnt4 em CaP com o Escore de Gleason....	42
Tabela 11. Correlação da expressão de Wnt4 em CaP com os níveis de PSA pré-operatório.....	42
Tabela 12. Expressão de E-caderina em tecidos tumorais e não tumorais de próstata.....	46
Tabela 13. Mediana da intensidade de marcação para a proteína E-caderina em tumores de pacientes com CaP classificados para ocorrência ou não de recorrência bioquímica, recidiva clínica da doença e presença de um segundo tumor primário....	46

Tabela 14. Correlação da expressão de E-caderina com o Escore de Gleason em amostras teciduais de CaP.....	48
Tabela 15. Expressão de Topoisomerase II- α em tecidos tumorais e não tumorais de próstata.....	50
Tabela 16. Mediana da intensidade de marcação para a proteína Topoisomerase II- α em pacientes com CaP quando classificados para ocorrência ou não de recorrência bioquímica, recidiva clínica da doença e presença de um segundo tumor primário....	51
Tabela 17. Correlação da expressão de Topoisomerase II- α em CaP com o Escore de Gleason.....	53
Tabela 18. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para obtenção do cDNA completo de WNT4 por RT-PCR.....	59
Tabela 19. Características dos pacientes com CaP e dos indivíduos sadios, cujos soros foram utilizados nos ensaios imunológicos contra a proteína Wnt4.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A próstata e sua composição celular.....	1
Figura 2. Visão frontal e lateral da próstata, mostrando sua divisão em lobos.....	2
Figura 3. Estimativa da incidência de câncer na população brasileira para o ano de 2008.....	3
Figura 4. Modelo de progressão do câncer de próstata.....	5
Figura 5. Representação dos estádios I a IV do câncer de próstata, segundo o sistema AJCC.....	7
Figura 6. Representação histológica dos graus de diferenciação das células tumorais prostáticas (graus de Gleason).....	9
Figura 7. Indução de respostas de células T contra os tumores.....	14
Figura 8. Via de sinalização canônica de Wnt, também conhecida como via de β -catenina, na presença e ausência da molécula de Wnt.....	18
Figura 9. Via de sinalização não-canônica de Wnt.....	19
Figura 10. Detecção da proteína Wnt4 por ensaios de imunoblot utilizando extratos protéicos totais de tecido tumoral de quatro pacientes com CaP.....	33
Figura 11. Esquema ilustrando uma seção do microarranjo de tecidos utilizado neste estudo.....	34
Figura 12. Marcação de Wnt4 em células de hiperplasia prostática benigna, mostrando um perfil de marcação citoplasmático difuso e de membrana com predomínio na borda apical das células epiteliais.....	37
Figura 13. Células tumorais prostáticas marcadas com anticorpo anti-Wnt4 mostrando uma marcação citoplasmática com aspecto granular.....	37

Figura 14. Figuras representativas de tecidos tumorais de próstata marcados para Wnt4, revelando uma maior marcação na borda luminal das células epiteliais cancerosas.....	38
Figura 15. Amostras de ovário utilizadas como controle positivo de marcação para o anticorpo anti-Wnt4.....	39
Figura 16. Categorização da intensidade de marcação da proteína Wnt4 em CaP....	41
Figura 17. Curva de sobrevida livre de recorrência bioquímica para pacientes com CaP cujos tumores apresentam diferentes níveis de expressão de Wnt4.....	43
Figura 18. Probabilidade de ocorrer recorrência bioquímica em pacientes com CaP cujos tumores apresentam marcação negativa ou forte para a proteína Wnt4.....	44
Figura 19. Amostras de tecido de pele utilizadas como controle da marcação para o anticorpo anti-E-caderina.....	45
Figura 20. Categorização da intensidade de marcação para a proteína E-caderina em tecidos tumorais de próstata.....	47
Figura 21. Curva de sobrevida livre de recorrência bioquímica para pacientes com CaP cujos tumores apresentam diferentes níveis de marcação de E-caderina.....	48
Figura 22. Seções de imunohistoquímica utilizando tecidos de amígdala como controle da marcação de Topoisomerase II- α	49
Figura 23. Grau de marcação de Topoisomerase II- α em amostras de CaP.....	52
Figura 24. Sobrevida livre de recorrência bioquímica para pacientes com CaP cujos tumores apresentam diferentes níveis de marcação para Topoisomerase II- α	54
Figura 25. Associação entre os níveis médios de intensidade de expressão de Wnt4 com E-caderina em tumores de pacientes com CaP.....	55

Figura 26. Associação entre os níveis médios de intensidade de expressão de Wnt4 com Topoisomerase II- α em tumores de pacientes com CaP.....	55
Figura 27. Associação entre os níveis médios de intensidade de expressão de Topoisomerase II- α com E-caderina em tumores de pacientes com CaP.....	56
Figura 28. Amplificação do cDNA completo do gene WNT4 (1056 pb) mostrada em gel de agarose.....	65
Figura 29. Esquema representativo do cDNA completo de WNT4.....	66
Figura 30. Mapa do vetor de expressão pET SUMO.....	66
Figura 31. Seleção das colônias recombinantes através da análise do DNA plasmidial em gel de agarose.....	67
Figura 32. Seleção das colônias recombinantes através da análise da migração do DNA plasmidial em gel de agarose.....	67
Figura 33. Esquema da digestão do plasmídeo pET SUMO + WNT4 com as enzimas de restrição EcoRI e PstI.....	68
Figura 34. Gel de agarose 1,5% mostrando o perfil de migração eletroforética do DNA plasmidial de colônias transformantes após a digestão com enzimas de restrição.....	69
Figura 35. PCR realizado para verificar a orientação de clonagem do cDNA de WNT4.....	70
Figura 36. Experimento piloto de expressão da proteína recombinante Wnt4 a partir dos clones 6 e 7 (que possuem Wnt4 clonado na orientação correta), CAT (controle positivo de expressão) e clone 4 (que não possui Wnt4 clonado).....	72
Figura 37. Purificação da proteína recombinante Wnt4 sob condições nativas.....	73

Figura 38. Purificação da proteína recombinante Wnt4 sob condições desnaturantes..... 74

Figura 39. Imunoblot com anticorpo anti-histidinas mostrando algumas etapas da purificação da proteína recombinante Wnt4 sob condições desnaturantes, realizada a partir dos clones 12, 6 e 7..... 75

Figura 40. Imunoblot realizado para algumas etapas da purificação da proteína Wnt4 sob condições desnaturantes utilizando anticorpo contra Wnt4..... 75

Figura 41. Imunoblot mostrando a reatividade da proteína Wnt4 purificada de dois clones independentes (6 e 12) contra o anticorpo anti-histidinas e contra uma mistura do soro de pacientes com CaP e uma mistura do soro de doadores normais..... 76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glândula prostática

A próstata é uma glândula exócrina do sistema reprodutor masculino, localizada anteriormente ao reto e inferiormente à bexiga, circundando parte da uretra (Figura 1A). Ela produz e secreta o líquido prostático, um líquido de pH alcalino que facilita a locomoção dos espermatozoides e que, ao se juntar com a secreção das vesículas seminais e com os espermatozoides na uretra, forma o sêmen.

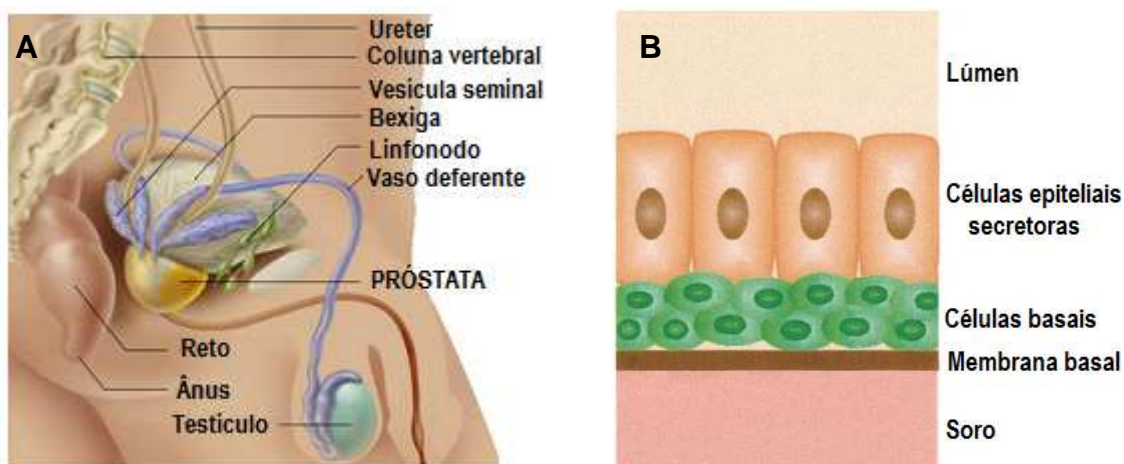


Figura 1. A próstata e sua composição celular. **(A)** Localização anatômica da próstata na pelve. **(B)** Representação esquemática das camadas celulares que compõem o epitélio prostático normal (modificado de Balk SP *et. al.*, 2003).

A glândula prostática nos humanos consiste de ácinos e ductos compostos por uma única camada de células epiteliais secretoras cercada por uma camada contínua de células basais e uma membrana basal (Figura 1B). Ao redor da glândula há um estroma formado por fibroblastos, músculo liso, nervos e vasos linfáticos. O estroma produz fatores de crescimento importantes para o desenvolvimento da próstata normal como também do câncer de próstata (Chung LW, 1995; Ware JL, 1993).

Anatomicamente, a próstata pode ser dividida em lobos, sendo dois lobos laterais (direito e esquerdo), um lobo anterior, um posterior e um lobo médio (Figura 2). Os lobos laterais formam a massa principal da glândula, são contínuos posteriormente, mas separados anatomicamente pela uretra

prostática. O lobo anterior não possui tecido glandular e é constituído apenas por tecido fibromuscular. O lobo posterior é o lobo que é palpado durante a realização do exame retal digital e o lobo médio é a porção da glândula situada entre os ductos ejaculatórios e a uretra. A próstata é envolvida por uma cápsula fibromuscular, que é considerada um limite anatômico para o estadiamento e prognóstico do câncer de próstata.

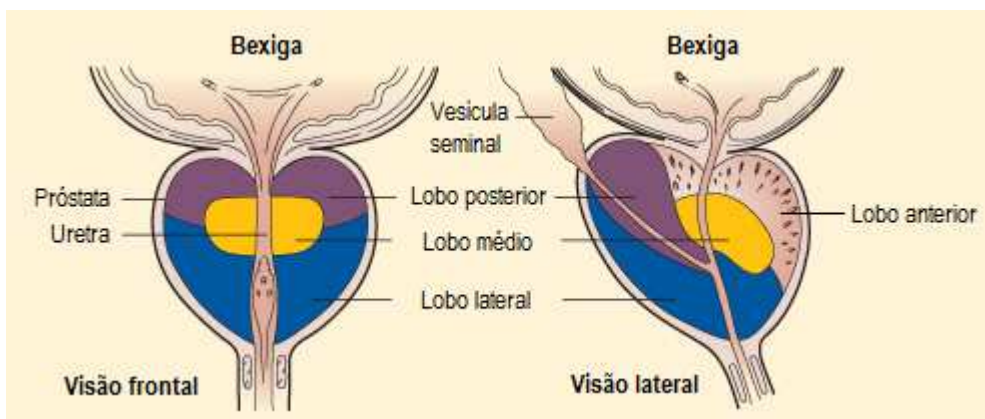


Figura 2. Visão frontal e lateral da próstata, mostrando sua divisão em lobos.

1.2 Alterações do tecido prostático

Algumas alterações da próstata podem acometer indivíduos adultos, gerando doenças clinicamente importantes como a prostatite, a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP). A prostatite é a inflamação da glândula causada por agentes infecciosos, geralmente bactérias. Essa condição é frequentemente acompanhada de desconforto, dor ao urinar e, às vezes, febre. A HPB corresponde ao aumento do volume da próstata, causando transtornos urinários aos pacientes. Apesar de possuir uma elevada taxa de incidência em homens com mais de 50 anos e ser uma das principais patologias urológicas, a HPB não é considerada uma lesão pré-maligna. O CaP, por sua vez, surge de alterações malignas nas células prostáticas e sua evolução pode levar à morte, mas a doença pode ser curável se for detectada precocemente.

1.2.1 Câncer de próstata

Assim como outros tumores, a patogênese do CaP reflete tanto componentes hereditários quanto componentes ambientais. Alguns dos fatores que estão associados a um maior risco de desenvolvimento do CaP são a idade avançada, histórico da doença na família, fatores ambientais, raça e dieta alimentar (Deutsch E *et. al.*, 2004).

O CaP é a segunda causa de morte por neoplasias entre os homens e o câncer não-cutâneo mais freqüente entre os brasileiros. Dados da estimativa do Instituto Nacional de Câncer prevêm quase 50.000 casos novos de CaP para o ano de 2008 (Figura 3) (Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA 2007).

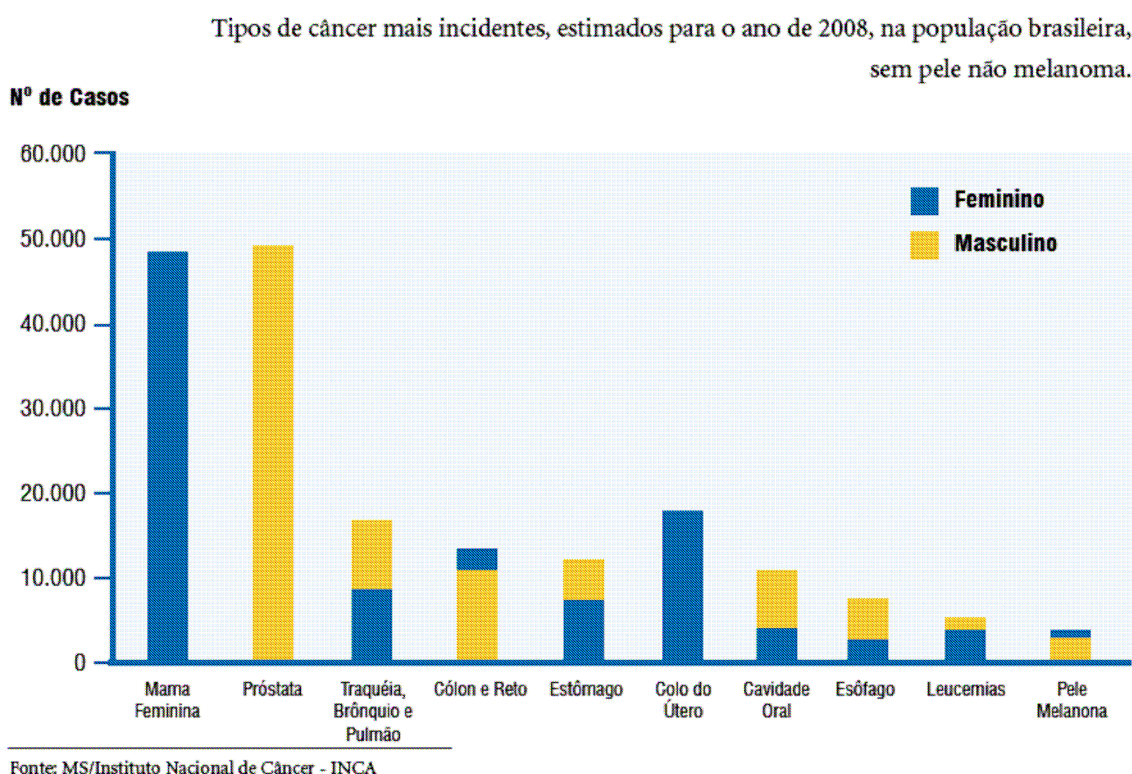


Figura 3. Estimativa da incidência de câncer na população brasileira para o ano de 2008.

1.2.1.1 Progressão

Os eventos associados ao início do CaP não são completamente compreendidos, porém algumas evidências sugerem que, além de alterações

genéticas, o CaP se desenvolve a partir de um microambiente inflamatório (De Marzo AM *et. al.*, 2007; Wagenlehner FME *et. al.*, 2007). Assim, tem sido sugerido que o CaP se desenvolve a partir de uma atrofia inflamatória proliferativa (AIP), que é caracterizada pelo aumento da proliferação das células epiteliais com a presença de grandes infiltrados inflamatórios (Figura 4). Como dito anteriormente, na glândula prostática normal o epitélio é composto pela camada luminal de células secretoras colunares e pela camada basal de células cuboidais revestidas pela membrana basal. As células epiteliais altamente proliferativas da AIP começam a perder a estrutura colunar e passam a exibir células em formato cuboidal. Além disso, os ácinos começam a perder as suas invaginações características. Diversas evidências sugerem que lesões da AIP podem ser precursoras da neoplasia intraepitelial da próstata (NIP) (Nelson WG *et. al.*, 2004). A NIP é caracterizada por ter células de formas variadas e aumento no tamanho do núcleo das células dos ductos e ácinos. A progressão da NIP dá origem então ao CaP localizado, caracterizado principalmente pela perda da camada de células basais e da arquitetura normal da glândula. O CaP avança para a doença metastática, caracterizada por ausência de membrana basal, grande invasão do estroma e formação glandular inexistente. Todas essas alterações histopatológicas são acompanhadas por mudanças na expressão de muitos genes e também de perdas genéticas, que contribuem para a progressão do tumor de próstata (De Marzo AM *et. al.*, 2007; De Marzo AM *et. al.*, 2004; Gonzalo ML & Isaacs WB, 2003).

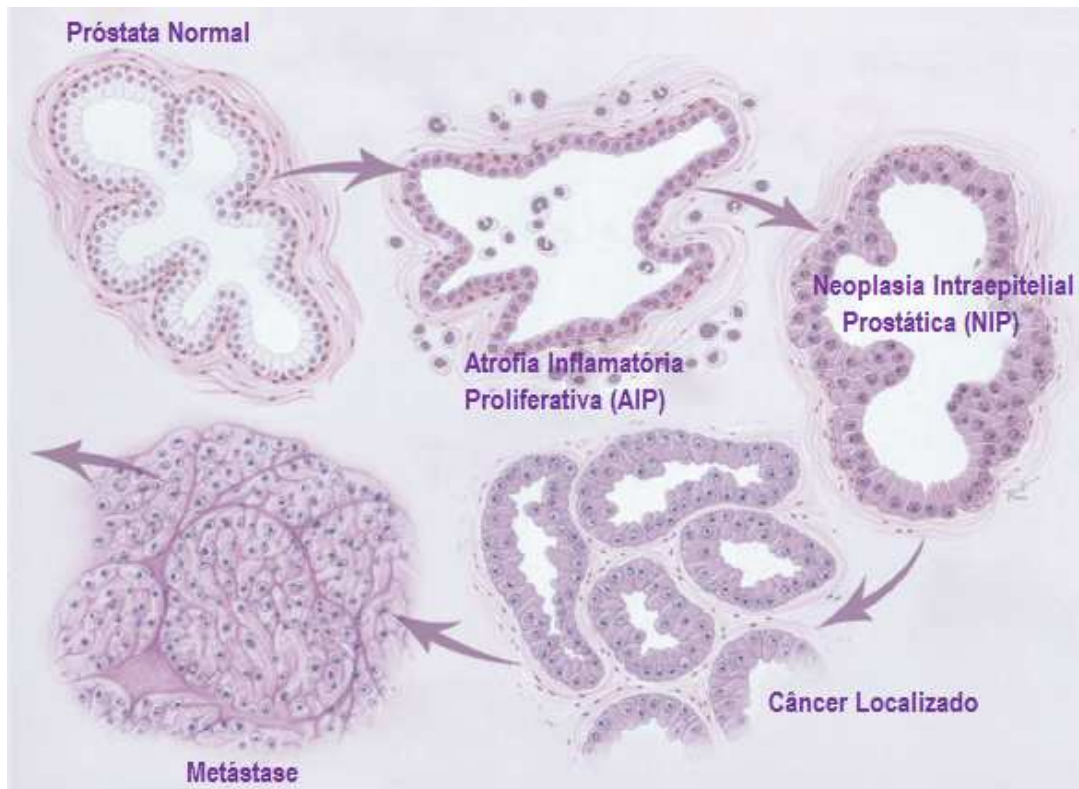


Figura 4. Modelo de progressão do câncer de próstata (Gonzalo ML & Isaacs WB, 2003).

1.2.1.2 Estadiamento do tumor

A evolução dos pacientes com câncer está intimamente relacionada com a extensão da neoplasia e, por isso, foram introduzidos na clínica sistemas de estadiamento do tumor com a finalidade de caracterizar sua extensão e padronizar a classificação dos pacientes com a doença, permitindo estudos comparativos mais precisos.

Dois sistemas são comumente utilizados para classificar o estadiamento do CaP, sendo eles o sistema TNM e o sistema AJCC. Em 1993, o “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) e o “International Union Against Cancer” modificaram um sistema de estadiamento existente desde os anos 50 (Sistema Whitmore-Jewett), adotando um método que estratifica mais precisamente os pacientes. Esse sistema foi chamado de TNM, pois ele adota a classificação do tumor, o status do linfonodo e se há ou não metástases (Tabela 1). Em 2002, o AJCC revisou mais uma vez a classificação do sistema TNM adicionado a ele o grau de diferenciação da neoplasia (grau de Gleason), formando o sistema de

estadiamento AJCC, que agrupa o CaP em estádios I a IV. (Tabela 2 e Figura 5).

Tabela 1. Sistema de estadiamento TNM para o câncer de próstata.

Sistema TNM – Classificação Clínica

T – Tumor primário	
TX	Tumor não avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável ou visível por exame de imagem
T1a	Achado incidental ocupando ≤ 5 % do tecido ressecado
T1b	Achado incidental ocupando > 5 % do tecido ressecado
T1c	Achado por biópsia realizada devido à elevação no PSA
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Ocupa a metade ou menos de um dos lobos
T2b	Ocupa mais da metade de um dos lobos
T2c	Comprometimento de ambos os lobos
T3	Tumor que se estende através da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (uni ou bilateral)
T3b	Invasão da vesícula seminal
T4	Tumor fixo ou invadindo estruturas pélvicas (colo vesical, esfíncter externo, reto, parede pélvica, ou músculos elevadores do ânus)
N – Linfonodos regionais	
NX	Linfonodos regionais não avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Presença de metástase em linfonodos regionais
M – Metástase à distância	
MX	Metástase à distância não avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância
M1a	Em linfonodo(s) não regional(ais)
M1b	Osso(s)
M1c	Outras localizações

Obs.: A classificação patológica (pTNM) corresponde à classificação clínica, porém não existe a categoria pT1.

Tabela 2. Sistema de estadiamento AJCC para o câncer de próstata.

Sistema AJCC (American Joint Committee on Cancer)

AJCC				
Estádio I	T1a	N0	M0	Baixo Gleason (2-4)
Estádio II	T1a	N0	M0	Intermediário ou alto Gleason (5-10)
	T1b, T1c	N0	M0	Qualquer Gleason (2-10)
	T1, T2	N0	M0	Qualquer Gleason (2-10)
Estádio III	T3	N0	M0	Qualquer Gleason (2-10)
Estádio IV	T4	N0	M0	Qualquer Gleason (2-10)
	Qualquer T	N1	M0	Qualquer Gleason (2-10)
	Qualquer T	Qualquer N	M1	Qualquer Gleason (2-10)

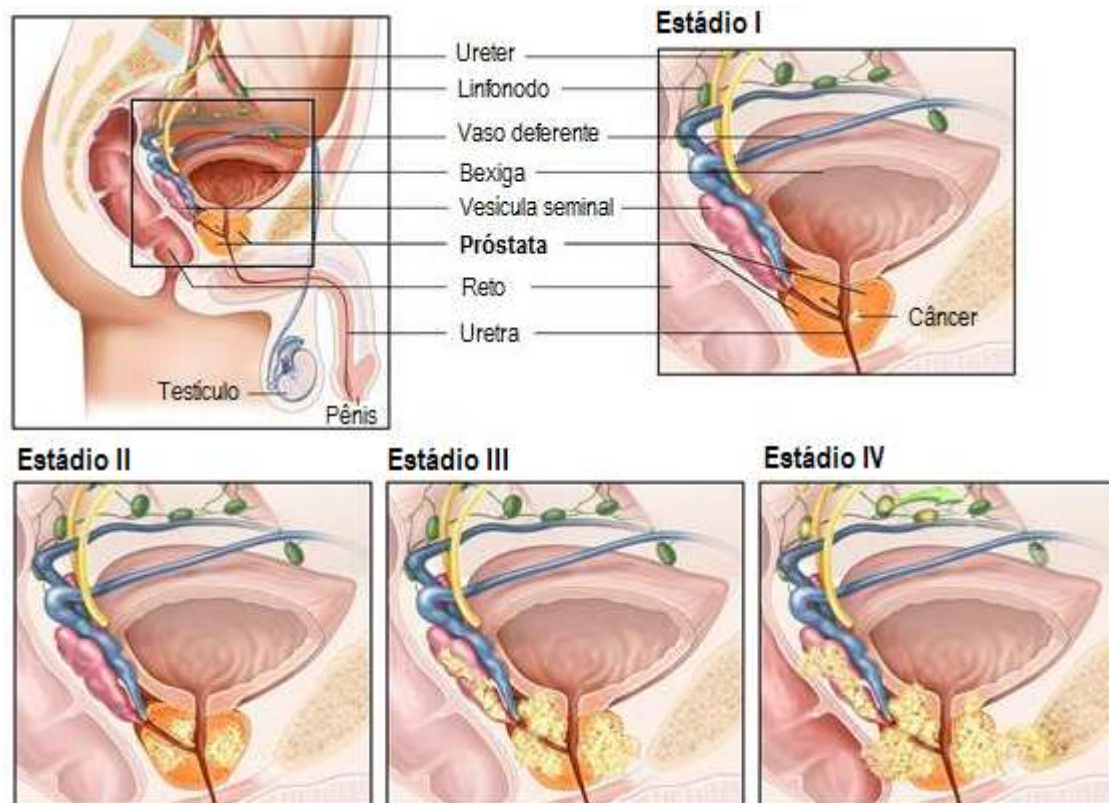


Figura 5. Representação dos estádios I a IV do câncer de próstata, segundo o sistema AJCC (retirado de <http://www.cancer.gov>).

1.2.1.3 Diagnóstico

Atualmente, os métodos mais utilizados para o diagnóstico do CaP são: o exame do toque retal, a dosagem sérica do antígeno específico da próstata (PSA), a ultra-sonografia transretal e a biópsia da próstata.

O exame digital retal é o método de detecção mais utilizado para o CaP, mas embora ele constitua uma importante ferramenta de diagnóstico, ele pode falhar em identificar tumores que estão confinados ao órgão ainda em um estágio curável (Yamamoto T *et. al.*, 2001). Isso porque durante o exame, somente as porções posterior e lateral da próstata conseguem ser palpadas, deixando cerca de 40% dos tumores fora de seu alcance.

Por ser um método não invasivo, a detecção sérica do PSA surgiu como teste promissor e até hoje é amplamente utilizado para diagnóstico e monitoramento de pacientes com CaP (Mikolajczyk SD *et. al.*, 2004). O PSA é uma glicoproteína de 34 KDa pertencente à família das calicreínas. Ele é secretado no fluido prostático (Coffeey DS, 1993), onde sua função é degradar

proteínas de alto peso molecular, que são sintetizadas na vesícula seminal, a fim de inibir a coagulação do sêmen. Seus níveis séricos estão aumentados na tumorigênese da próstata, uma vez que com a perda normal da arquitetura da glândula, o PSA passa a ter acesso à circulação periférica. No entanto, esse marcador possui baixo valor preditivo, uma vez que a elevação de seus níveis séricos não ocorre somente em CaP. Outras alterações e manipulações da próstata como a HPB, prostatites e a ejaculação também provocam um aumento do PSA (Riffenburgh R *et. al.*, 2003; Catalona WJ & Smith DS, 1998; Dillioglulil O *et. al.*, 1997). Devido à baixa especificidade, seu uso isoladamente torna-se pouco relevante para o diagnóstico precoce do CaP. No entanto, o PSA tem alto valor prognóstico (Oesterling JE *et. al.*, 1988; Stamey TA & Kabalim JN, 1989), visto que seus níveis estão diretamente relacionados à progressão ou regressão do tumor. Assim, pode-se avaliar a eficiência do tratamento pela diminuição das concentrações séricas do PSA.

A fim de aumentar a sensibilidade e especificidade do PSA como marcador diagnóstico, novas abordagens têm sido empregadas, como o uso da densidade e velocidade de aumento do PSA, referência de variações idade-específica e o uso da relação PSA livre/ PSA total (Loeb S & Catalona WJ, 2007; D'Amico AV *et. al.*, 2004; Catalona WJ *et. al.*, 2003).

Além do PSA e do exame físico da próstata, o rastreamento das anomalias prostáticas também é feito pela ultra-sonografia transretal e biópsia, as quais são indicadas sempre que houver dúvidas ou anormalidades no toque retal ou no PSA.

O diagnóstico definitivo de CaP é dado pelo estudo histopatológico do tecido obtido pela biópsia. Este estudo leva em consideração o padrão glandular e a relação entre as glândulas e o estroma prostático, determinando o grau de diferenciação das células tumorais. Os tumores são classificados em 5 graus (denominados graus de Gleason), sendo que as lesões de grau 1 representam lesões mais diferenciadas e as de grau 5 as menos diferenciadas (Figura 6). Como o padrão histológico do CaP é bem heterogêneo, o diagnóstico final é dado pelo Escore de Gleason (EG), que é a soma dos graus das duas subpopulações predominantes de células no tecido. O EG está relacionado com o prognóstico, sendo que quanto menor o EG melhor o prognóstico do paciente (Lapointe J *et. al.*, 2004). É importante lembrar que

muitas vezes o EG das biópsias difere do EG obtido posteriormente com a peça cirúrgica (Steinberg DM *et. al.*, 1997), principalmente devido à quantidade de tecido disponível para exame na biópsia, que é muito menor em relação à quantidade disponível nas peças.

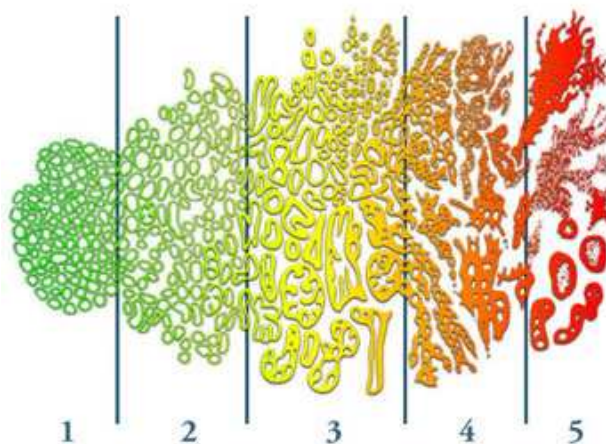


Figura 6. Representação histológica dos graus de diferenciação das células tumorais prostáticas (graus de Gleason) (retirado de <http://www.stjohn.org>).

Mesmo utilizando parâmetros clínicos como o EG, níveis séricos de PSA e estadiamento do tumor, ainda permanece difícil de prever o prognóstico dos pacientes (Singh D *et. al.*, 2002). Atualmente, estudos moleculares em CaP representam uma nova possibilidade de auxílio a esses parâmetros, a fim de se ter maior segurança para detectar o CaP, classificá-lo e também no que se refere ao controle da doença após o tratamento e acompanhamento clínico dos pacientes (Laitinen S *et. al.*, 2008; Cooper CS *et. al.*, 2007; Datta MW *et. al.*, 2007; Ornstein DK *et. al.*, 2004; Rogers CG *et. al.*, 2004).

1.2.1.4 Tratamento

O tratamento para o CaP aumenta a sobrevivência de muitos pacientes com doença localizada, mas é raramente curativo para tumores extensivos.

Dentre as opções para o tratamento da doença localizada incluem-se a prostatectomia radical, a radioterapia e a observação vigilante, que é uma opção empregada apenas em pacientes com tumores de baixo grau histológico e com expectativa de vida limitada. A prostatectomia radical é o procedimento mais utilizado e consiste na remoção cirúrgica de toda a glândula prostática e

de alguns linfonodos proximais. A radioterapia pode ser externa ou intersticial (braquiterapia): a externa é indicada para pacientes com contra-indicação à cirurgia e a intersticial é realizada através da implantação de sementes radioativas e indicada para pacientes com bom prognóstico.

Mesmo após a terapia para tumores clinicamente localizados, alguns pacientes ainda desenvolvem tumores disseminados. O tratamento da doença metastática existe, mas a cura é improvável. Este tratamento está baseado na supressão androgênica, que pode ser feita pela orquitectomia bilateral, utilização de análogos do hormônio liberador do hormônio luteinizante, utilização de estrógenos e anti-andrógenos puros ou mistos. No entanto, após um ou dois anos, a maioria dos tumores não respondem mais à terapia anti-hormonal e começam a crescer novamente – são chamados de câncer de próstata refratário a hormônio (CPRH).

Diversos estudos têm sido realizados para oferecer novas opções terapêuticas para o CPRH. Dentre elas estão o tratamento com agentes anti-angiogênicos, inibidores de pequenas moléculas que são capazes de bloquear vias de sinalização celular envolvidas em crescimento e apoptose, agentes citotóxicos como drogas a base de platina (carboplatina e satraplatina), análogos de vitamina D como o calcitriol e terapia baseada em oligonucleotídeos antisense (Hadaschik BA *et. al.*, 2007). Dentre os inibidores de pequenas moléculas transdutoras de sinal está o antagonista do receptor de endotelina-A (Atrasentam), que é o agente mais desenvolvido clinicamente dentro dessa classe de compostos para uso no tratamento do CPRH (Vogelzang NJ *et. al.*, 2005), e o imatinib (Gleevec) que inibe a atividade tirosina cinase do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R) (Kim SJ *et. al.*, 2006; Mathew P *et. al.*, 2004). Já os oligonucleotídeos antisense oferecem uma estratégia para regular genes envolvidos na progressão do câncer que não são suscetíveis à inibição por pequenas moléculas ou anticorpos. Alguns oligonucleotídeos antisense em desenvolvimento clínico contra o CPRH são contra clusterina (Trougakos IP *et. al.*, 2004; Zellweger T *et. al.*, 2002; Miyake H *et. al.*, 2000), subunidade R2 da ribonucleotídeo redutase (Desai AA *et. al.*, 2005) e proteína de choque térmico 27 (HSP27) (Miyake H *et. al.*, 2006).

1.2.1.5 Genes diferencialmente expressos

Como dito anteriormente, pouco ainda se sabe a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão do CaP. Em geral, o desenvolvimento de tumores está associado a produtos gênicos alterados ou desregulados que afetam funções críticas como divisão e diferenciação celulares, assim como aspectos relacionados com a angiogênese, morte e adesão celular. Um melhor entendimento dessas mudanças moleculares e a identificação de vias bioquímicas importantes podem fornecer uma base para o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e prognóstico assim como fornecer novos alvos para a terapia.

No caso do CaP, uma série de genes com expressão diferencial têm sido identificados e caracterizados com a ajuda de técnicas como microarranjos de DNA e tecido, “differential display” e ferramentas de bioinformática, sendo alguns deles apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Genes hipoeexpressos em câncer de próstata.

Função	Nome	Referência
Hipoexpressos		
Gene supressor de tumor	p27	Nikoleishvili D <i>et. al.</i> , 2007
Transdução de sinal	PTEN LMO-4 RASSF1A	Dhanasekaran SM <i>et. al.</i> , 2001 Mousses S <i>et. al.</i> , 2002 Liu L <i>et. al.</i> , 2002
Sinalização por cálcio	E-caderina	Dhanasekaran SM <i>et. al.</i> , 2001
Matriz extracelular	Hevina	Nelson PS <i>et. al.</i> , 1998
Detoxificação	GSTP1 CYP3A7	Bostwick DG <i>et. al.</i> , 2007 Stamey TA <i>et. al.</i> , 2001
Ciclo celular	Cdc6	Robles LD <i>et. al.</i> , 2002
Inibidor de protease	Maspina	Stamey TA <i>et. al.</i> , 2001
Proteína ligadora de hormônio tireoideano	CRYM	Mousses S <i>et. al.</i> , 2002
Transição epitelial	TERE1	McGarvey TW <i>et. al.</i> , 2003

Tabela 4. Genes superexpressos em câncer de próstata.

Função	Nome	Referência
Superexpressos		
Transdução de sinal	ER- β	Fixemer T <i>et. al.</i> , 2003
	Smad3	Lu S <i>et. al.</i> , 2007
Anti-apoptose	Bax	Tolonen TT <i>et. al.</i> , 2007
	Bcl-2	Tolonen TT <i>et. al.</i> , 2007
	Clusterina	Miyake H <i>et.al.</i> , 2000
	Bcl-xL	Castilla C <i>et. al.</i> , 2006
Organização do citoesqueleto	Vimentina	Singh S <i>et. al.</i> , 2003
Sinalização por cálcio	S100P	Mousses S <i>et. al.</i> , 2002
Proteases	Hepsina	Dhanasekaran SM <i>et. al.</i> , 2001
		Stamey TA <i>et. al.</i> , 2001
		Welsh JB <i>et. al.</i> , 2001
	PIM-1 PSMA	Dhanasekaran SM <i>et. al.</i> , 2001 Stamey TA <i>et. al.</i> , 2001
Regulação transcricional	EZH2	Varambally S <i>et. al.</i> , 2002
	E2F3	Foster CS <i>et. al.</i> , 2004
	MYC	Dhanasekaran SM <i>et. al.</i> , 2001
Divisão celular	PTOV-1	Welsh JB <i>et. al.</i> , 2001
		Santamaría A <i>et. al.</i> , 2003
		Benedit P <i>et. al.</i> , 2001
RNA não codificante	DD3	Bussemakers MJG <i>et. al.</i> , 1999
Citocina secretada	MIC-1	Welsh JB <i>et. al.</i> , 2001
Via de ácidos graxos/ metabolismo lipídico	FAS	Welsh JB <i>et. al.</i> , 2001
	AMACR	Dhanasekaran SM <i>et. al.</i> , 2001
		Rubin MA <i>et. al.</i> , 2002
	Apolipoproteína E	Welsh JB <i>et. al.</i> , 2001 Dhanasekaran SM <i>et. al.</i> , 2001 Venanzoni MC <i>et. al.</i> , 2003

Uma vantagem importante da descoberta e da definição do papel funcional dos genes que são diferencialmente expressos no CaP seria a utilização destes genes e das proteínas codificadas por eles como novos potenciais marcadores para diagnóstico, prognóstico e estadiamento, bem como potenciais alvos de terapia do CaP.

1.2.1.6 Antígenos associados a tumor

Além da caracterização de marcadores teciduais para o CaP, baseando-se no perfil diferencial de expressão gênica ou protéica, muitos marcadores sorológicos têm sido descritos como uma alternativa mais viável para a detecção e acompanhamento da doença. Marcadores detectados através da corrente sanguínea estão entre os mais desejados, visto que representam métodos de fácil realização e menos invasivos para os pacientes.

Neste contexto, já foram caracterizados diversos antígenos associados a tumor (TAAs) para muitos tipos de câncer, inclusive para CaP. Antígenos tumorais são moléculas expressas em células cancerosas, geralmente proteínas envolvidas em funções celulares fundamentais como replicação e transcrição. Uma das principais características dos antígenos tumorais é a habilidade de gerar resposta imune nos pacientes com câncer (Yang F & Yang XF, 2005; Dunn GP *et. al.*, 2004; Adam JK *et. al.*, 2003). Por serem provenientes de células do próprio organismo, essas moléculas são consideradas próprias. Essas proteínas próprias possuem determinadas características que fazem com que elas sejam reconhecidas pelo sistema imune. Esse reconhecimento ainda não é completamente entendido, mas existem algumas hipóteses para tentar explicá-lo. Uma dessas hipóteses é a superexpressão gênica, que levaria ao acúmulo de determinada proteína e isso poderia induzir a perda de tolerância imunológica a ela. Outras hipóteses são a mudança estrutural sofrida pela proteína em função de mutações, fenômeno este que geraria epítomos conformacionais diferentes das proteínas selvagens; a formação de isoformas variantes e a expressão diferencial de algumas proteínas, como por exemplo, proteínas que somente são expressas em certas fases do desenvolvimento (Daniels T *et. al.*, 2005; Pendergraft WF *et. al.*, 2005; Line A *et. al.*, 2002).

A resposta imune tumoral ocorre através das células dendríticas, que são células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais. As células dendríticas são capazes de capturar as células tumorais ou seus antígenos, processá-los e apresentar os peptídeos derivados desses antígenos através de moléculas MHC de classe I ou II, ativando células T CD8⁺ ou CD4⁺, respectivamente. Devido aos estímulos fornecidos pelas APCs, as células T

CD8⁺ diferenciam-se em linfócitos T citotóxicos (CTLs) capazes de destruir as células tumorais. As células T CD4⁺ ativadas podem aumentar a resposta imune tumoral, através da secreção de citocinas importantes como, por exemplo, o IFN- γ . Essas citocinas estimulam tanto a resposta de células T citotóxicas, aumentando a produção de células T CD8⁺, quanto a resposta de células B, iniciando a produção de anticorpos (Figura 7) (Abbas AK & Lichtman AH, 5th edition). Como esses anticorpos são gerados contra proteínas consideradas próprias, eles são denominados de autoanticorpos. Acredita-se que os autoanticorpos funcionem como repórteres imunológicos da tumorigênese, uma vez que a resposta imune a tumores é um evento que acontece precocemente durante o desenvolvimento do tumor. Assim, os autoanticorpos estão sendo intensamente explorados como ferramenta para o diagnóstico e prognóstico do câncer (Mintz PJ *et. al.*, 2003). Diversos trabalhos já caracterizaram TAAs e suas respostas de autoanticorpos como sendo potenciais marcadores de diagnóstico e prognóstico do CaP, como o PSA (McNeel DG *et. al.*, 2000), PARIS-1 (Zhou Y *et. al.*, 2002), AMACR (Sreekumar A *et. al.*, 2004), GRP78 (Mintz PJ *et. al.*, 2003), FLJ23438 e VAMP3 (Pontes ER *et. al.*, 2006), p90 e p62 (Shi FD *et. al.*, 2005), LEDGF/p75 (Daniels T *et. al.*, 2005), NY-ESO-1 (Fossa A *et. al.*, 2004), CTSP-1 (Parmigiani RB *et. al.*, 2008), prostassomas (Larsson A *et. al.*, 2006), XAGE-1 (Koizumi F *et. al.*, 2005), HIP1 (Bradley SV *et. al.*, 2005) entre outros.

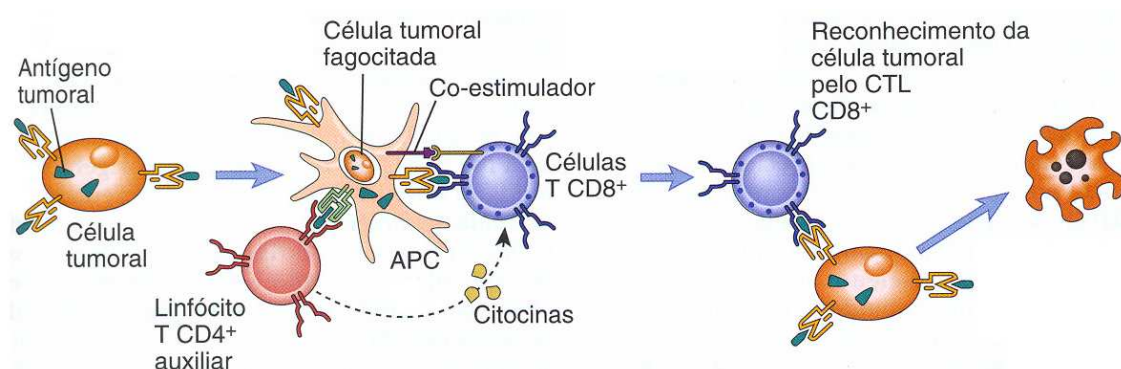


Figura 7. Indução de respostas de células T contra os tumores. As células tumorais ou os antígenos tumorais são capturados, processados e apresentados para as células T pelas células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs). As APCs fornecem os sinais necessários para a diferenciação das células T CD8⁺ e podem estimular as células T CD4⁺, as quais fornecem sinais secundários para o desenvolvimento dos linfócitos T citolíticos (CTLs). Uma vez diferenciados, os CTLs destroem as células tumorais (Abbas AK & Lichtman AH, 5th edition).

A grande importância da caracterização de novos TAAs refere-se à necessidade de construção de arranjos contendo diversos antígenos (painel de antígenos), onde a combinação ideal destes antígenos levaria a melhores resultados para a detecção do câncer (Koziol JA *et. al.*, 2003; Zhang JY *et. al.*, 2003). Wang *et. al.* (2005) demonstrou que, ao utilizar um painel contendo 22 peptídeos derivados de tecido prostático tumoral, aumentava-se os níveis de sensibilidade e especificidade em discriminar entre grupos de pacientes com CaP e pessoas saudáveis.

Nos últimos anos, o repertório sorológico de autoanticorpos de pacientes com câncer tem sido ativamente explorado para a identificação de novos TAAs e para a construção de painéis de antígenos ou microarranjos.

1.3 Via de sinalização de Wnt

Wnts são glicoproteínas secretadas que agem como mediadores locais de sinalização, controlando muitos aspectos do desenvolvimento de animais vertebrados e invertebrados e eventos tumorigênicos em mamíferos.

Essas moléculas foram descobertas independentemente em moscas e em camundongos há cerca de 25 anos atrás. Em 1982, estudos do grupo de Nusse & Varmus identificaram em camundongos o gene *Int-1*, que era ativado em resposta à inserção pró-viral do vírus de tumor mamário de camundongos (MMTV - do inglês *mouse mammary tumor virus*) (Nusse R & Varmus HE, 1982). Estudos subsequentes identificaram *Int-1* como um proto-oncogene envolvido na carcinogênese mamária (Ooyen AV & Nusse R, 1984). Pouco tempo depois, três grupos identificaram o gene de polaridade de segmentos da *Drosophila*, o gene *wingless (Wg)*. Este gene foi descoberto devido ao seu papel no desenvolvimento das asas da *Drosophila* e foi visto que ele era ortólogo ao gene *Int1* (Baker NE, 1987; Cabrera CV *et. al.*, 1987; Rijsewijk F *et. al.*, 1987). Desde então, muitos genes nesta família foram identificados e os pesquisadores propuseram que *Int-1* e seus genes relacionados deveriam pertencer à família Wnt, daí o termo Wnt (do inglês *wingless type MMTV integration site family*) ser originado da fusão dos genes *Wg* e *Int-1* (Clevers H, 2006; Tian Q *et. al.*, 2005).

Muitos genes da família Wnt já foram identificados em várias espécies, incluindo *Xenopus*, *zebrafish*, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, camundongos e humanos (Miller JR, 2001). Atualmente, em humanos, existem 19 membros descritos (<http://www.stanford.edu/~nusse/wntwindow.html>). As proteínas da família Wnt são caracterizadas por conterem um elevado número de resíduos de cisteína altamente conservados entre os diferentes membros e todos eles possuem um ou mais sítios para N-glicosilação (Bradley RS & Brown MC, 1990; Papkoff J & Schryver B, 1990). Possuem também um peptídeo sinal N-terminal que destina essas proteínas à secreção. No entanto, elas são notoriamente insolúveis e essa insolubilidade tem sido atribuída a modificações sofridas por essas proteínas, entre elas a palmitolação dos resíduos de cisteína, evento que foi descoberto ser essencial para a função das proteínas (Willert K *et. al.*, 2003).

As proteínas Wnt exercem papéis importantes na regulação de processos básicos de desenvolvimento, como a segmentação em *Drosophila* (Sanson B, 2001; Rijsewijk F *et. al.*, 1987), desenvolvimento neural em camundongos (Ligon KL *et. al.*, 2003; McMahon AP, 1992) e formação do eixo e miogênese em *Xenopus* (Tian Q *et. al.*, 1999; Christian JL *et. al.*, 1991; Sokol S, 1991). Por controlar processos como a especificação do destino celular, proliferação, polaridade e migração das células, a desregulação da sinalização de Wnt durante o desenvolvimento embrionário causa muitos defeitos de desenvolvimento, enquanto que uma ativação aberrante dessa via em tecidos adultos já foi mostrada estar envolvida na tumorigênese (Clevers H, 2006; Pongracz JE & Stockley RA, 2006; Moon RT *et. al.*, 2004; Giles RH *et. al.*, 2003). Mudanças na sinalização de Wnt e aberrações genéticas que afetam a via de Wnt têm sido associadas com um grande número de malignidades, incluindo câncer de mama em humanos e camundongos (Brown AM, 2001; Michaelson JS & Leder P, 2001; Alexander CM *et. al.*, 2000; Li Y *et. al.*, 2000), câncer de ovário em humanos (Wright K *et. al.*, 1999), câncer de pulmão (Pongracz JE & Stockley RA, 2006), câncer de cólon (Clevers H, 2006), câncer de próstata (Polakis P, 2007; Verras M & Sun Z 2006), entre outros.

A sinalização das proteínas Wnts é um pouco complexa. Os membros dessa família se ligam a receptores de superfície celular chamados Frizzled e ativam cascatas de sinalização celular. Os receptores Frizzled são proteínas de

7 passagens pela membrana e há 10 genes Frizzled humanos descritos, mas apenas uma parte é ativa na transmissão da sinalização canônica de Wnt (Huang HC *et. al.*, 2004). Para que o receptor ative a cascata de sinalização é necessária a presença de um co-receptor, denominado de proteína relacionada a lipoproteína de baixa densidade membro 5 ou 6 (LRP5 ou LRP6). Através desse complexo ativo de receptor, os ligantes Wnt são capazes de ativar 3 vias de sinalização conhecidas, sendo uma via canônica e duas vias não-canônicas (Moon RT *et. al.*, 2004; Miller JR, 2001).

A via canônica é a mais conhecida e envolve a ativação de β -catenina (Figura 8). Na ausência do ligante Wnt, a glicogênio sintase cinase (GSK-3) está ativa na célula e fosforila β -catenina, juntamente com o complexo da proteína APC e Axina. A β -catenina fosforilada é então alvo de ubiquitinação e degradação mediada por proteassoma. Isso faz com que os níveis de β -catenina citosólicos sejam baixos, impedindo sua translocação para o núcleo. Em condições não estimuladas por Wnt, os fatores de transcrição da família TCF estão geralmente no núcleo ligados a seus elementos de reconhecimento de DNA, porém estão transcricionalmente inativos devido a sua associação com uma proteína chamada Groucho. Esta proteína bloqueia a habilidade de capturar outras proteínas modificadoras de cromatina necessárias para a formação de um complexo transcricional ativo (Terry S *et. al.*, 2006). Já na presença da proteína Wnt, ela se liga ao receptor Frizzled e o co-receptor LRP5/6 e leva à ativação da fosfoproteína Dishevelled (Dsh). A ativação e recrutamento de Dsh provavelmente recruta Axina e o complexo de destruição para a membrana plasmática, onde a Axina é degradada. A ativação de Dsh também leva à inibição de GSK-3, que, conseqüentemente, torna-se incapaz de fosforilar e degradar β -catenina. Assim, β -catenina se acumula no citoplasma e transloca para o núcleo, onde interage com a porção N-terminal dos fatores de transcrição TCF/LEF, provocando uma mudança conformacional no complexo e liberando a proteína repressora Groucho. Essa liberação facilita o recrutamento de outras proteínas necessárias para a formação de um complexo transcricional ativo e então esse complexo é capaz de ativar a transcrição de genes alvos (Terry S *et. al.*, 2006).

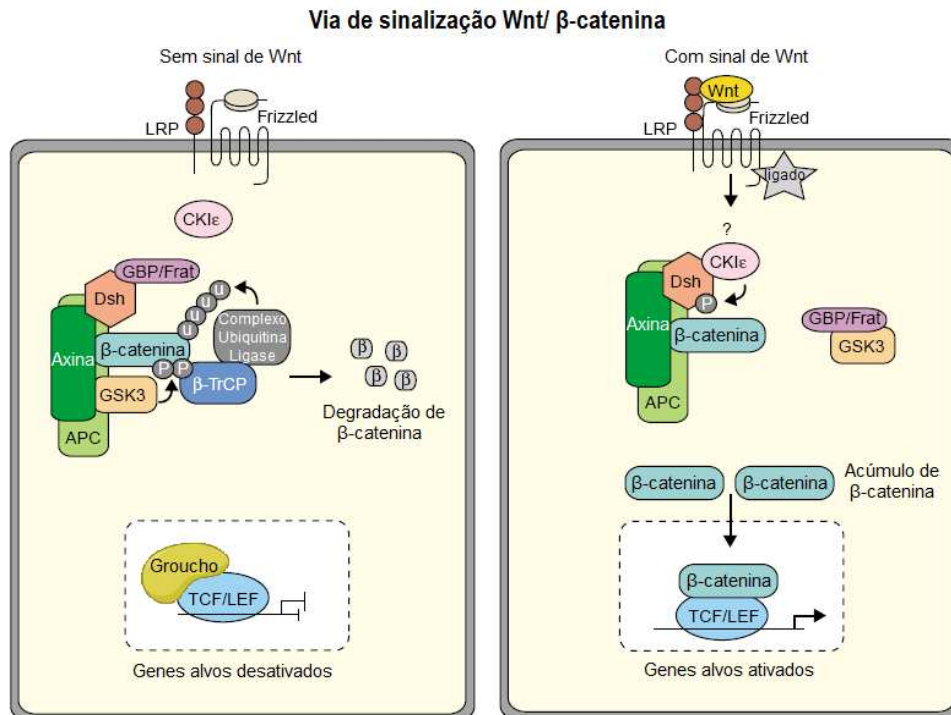


Figura 8. Via de sinalização canônica de Wnt, também conhecida como via de β -catenina, na presença e ausência da molécula de Wnt (Miller JR, 2001).

Dentre os genes alvos desta via, estão c-myc, ciclina D1, MMP-7 e CD44 e outros genes cujos papéis em eventos tais como a proliferação celular, ciclo celular, angiogênese e adesão celular já foram elucidados (Tabela 5) (Desai B *et. al.*, 2007; Hatsell S *et. al.*, 2003; Zhang T *et. al.*, 2001; Brabletz T *et. al.*, 1999; Mann B *et. al.*, 1999; Tetsu O *et. al.*, 1999; Wielenga VJ *et. al.*, 1999; He TC *et. al.*, 1998).

Tabela 5. Genes ativados pela via de sinalização de Wnt.

Função	Nome
Regulam a proliferação celular	c-myc jun ciclina D1
Regulador de apoptose	Survivina
Influenciam a migração celular	uPA MMP-7 CD44
Exercem papel na diferenciação	FGF-2 PPAR- δ BMP-4 c-Ret
Potencial para influenciar a carcinogênese	Endotelina-1 COX-2

As duas vias não-canônicas (via de sinalização por Cálcio e a via de polaridade planar) são ativadas independentemente de β -catenina e levam a mudanças no movimento celular e polaridade (Figura 9) (Veeman MT *et. al.*, 2003).

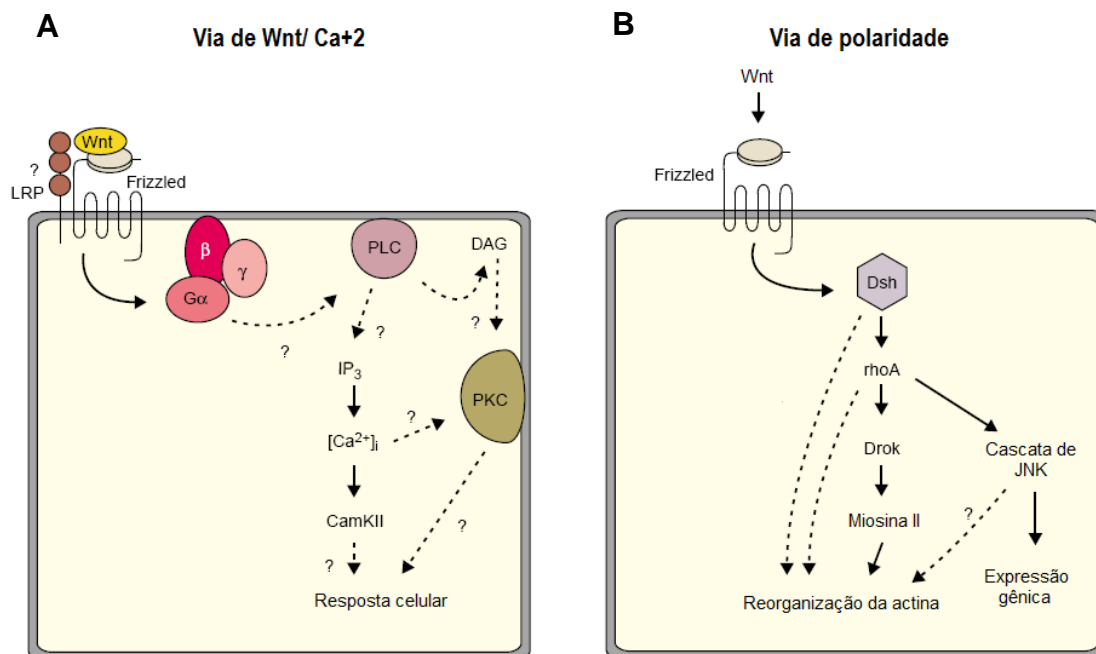


Figura 9. Via de sinalização não-canônica de Wnt (Miller JR, 2001). **(A)** Via de sinalização pelo aumento da liberação de Ca^{+2} intracelular, provocando a ativação de proteínas dependentes de Ca^{+2} . **(B)** Via não-canônica de polaridade, envolvendo a ativação de JNK.

A via de sinalização Wnt/ Ca^{+2} é pouco conhecida, mas sabe-se que envolve a ativação de uma proteína G trimérica. Essa ativação provoca um aumento da liberação de Ca^{+2} intracelular, ativando proteínas alvo como proteína cinase C (PKC), Ca^{+2} -calmodulina cinase II (CaMKII) e a fosfatase sensível a Ca^{+2} , calcineurina (Figura 9A) (Kühl M *et. al.*, 2000; Miller JR *et. al.*, 1999; Rao A *et. al.*, 1997). Um conhecido alvo dessa via é a fator de transcrição NFAT (Saneyoshi T *et. al.*, 2002). Em 2002, essa via foi associada com a invasão celular em melanoma (Weeraratna AT *et. al.*, 2002).

A via de polaridade, também conhecida como via de ativação de JNK, também é pouco conhecida. Essa via regula a polaridade das células através da regulação da organização do seu citoesqueleto. A via de ativação de JNK envolve a proteína DSH, rhoA GTPase e a proteína cinase JNK (Figura 9B). A proteína rhoA está envolvida na reorganização da actina promovendo mobilidade celular, podendo regular a invasividade de uma célula tumoral.

RhoA também é capaz de ativar a proteína JNK, que por sua vez também é capaz de promover a reorganização do citoesqueleto e ainda regular a expressão gênica (Fukuda T *et. al.*, 2005; Lim L *et. al.*, 1996; Minden A *et. al.*, 1994). A maioria das publicações sobre a via da JNK demonstra o seu envolvimento na embriogênese em *Xenopus* (Liao G *et. al.*, 2006; Bagowski CP *et. al.*, 2001). Em 2007, Teh *et. al.* (2007) demonstraram a primeira evidência de que a via de JNK ativada pela sinalização de Wnt16B era capaz de promover a hiperproliferação de queratinócitos humanos.

1.3.1 Wnts e câncer de próstata

A ativação aberrante da via de Wnt é freqüentemente associada com o desenvolvimento, progressão tumoral e capacidade metastática de vários tipos de câncer, inclusive do CaP.

Já foi demonstrado que há uma superexpressão de WNT-1 e β -catenina em linhagens celulares tumorais prostáticas e também em amostras teciduais de CaP em relação a tecidos e células epiteliais prostáticas normais. A partir deste perfil, observou-se que a expressão foi maior em tumores de alto grau de Gleason quando comparada com os de baixo grau de Gleason. Além disso, houve também um elevado nível de expressão em metástases ósseas e em linfonodos (Chen G *et. al.*, 2004). O conjunto desses dados dá suporte ao papel da via de Wnt na progressão do tumor de próstata.

Através de análises por RT-PCR, pesquisadores identificaram que a expressão de WNT5a e WNT6 estavam aumentados em CaP em relação ao tecido normal. Além disso, a expressão de DKK1, que é um antagonista da via de Wnt, foi diminuída em CaP em relação ao tecido prostático normal. Dados complementares desse estudo sugeriram que a ativação da via de Wnt através da diminuição de DKK1 contribui para o mecanismo de atividade osteoblástica em células de CaP (Hall CL *et. al.*, 2005).

Já foram feitas também análises por RT-PCR semi-quantitativo da expressão de todos os membros da família Wnt em linhagens celulares e células prostáticas cultivadas. Vários genes WNTs estavam expressos tanto nas células prostáticas normais quanto nas linhagens celulares de CaP. Esses dados foram corroborados por outros estudos que mostram que, para a maioria

dos membros da família Wnt, também não houve diferença de expressão de mRNA entre tumor e próstata normal ou entre metástase e tumor primário (Hall CL *et. al.*, 2005).

WNT11 tem pouca ou ausência de expressão nas linhagens celulares tumorais prostáticas dependentes de hormônio, estabelecendo uma correlação entre a expressão de WNT11 e CaP independente de hormônio, onde a expressão de Wnt11 é elevada em tumores de próstata mais agressivos. Além disso, foi visto que a expressão de WNT11 também era elevada não só em linhagens de CaP independentes de hormônio, mas também em tumores prostáticos de alto grau e enxertos independentes de hormônio. Análises adicionais revelaram que a expressão de WNT11 inibe a atividade transcricional de AR e o crescimento celular nas células dependentes de androgênio, mas não nas células independentes do hormônio (Zhu H *et. al.*, 2004).

Estudos de análise de expressão gênica para WNT2 mostram que seu perfil de expressão é bastante controverso. Dados obtidos através de análises por RT-PCR mostraram que a expressão de WNT2 estava aumentada em CaP metastático em relação a lesões primárias (Hall CL *et. al.*, 2005). Já num outro estudo utilizando RT-PCR semi-quantitativo, mostrou-se que WNT2 estava expresso especificamente nas células estromais e não em células tumorais (Zhu H *et. al.*, 2004). Análises de microarranjos de DNA demonstraram que WNT2 é hipoexpresso em amostras microdissecadas de CaP em relação a amostras de tecido prostático benigno adjacente (Wissmann C *et. al.*, 2003).

Dados controversos também existem quanto ao perfil de expressão de WNT4. Dados na literatura de análise de expressão gênica utilizando microarranjos de cDNA mostraram que WNT4 é superexpresso em amostras de alto grau de Gleason quando comparadas com amostras de baixo grau de Gleason (Reis EM *et. al.*, 2004). Já análises por RT-PCR demonstraram que a expressão de mRNA de WNT4 não apresentava diferença entre amostras tumorais e amostras normais de próstata, ou ainda entre amostras metastáticas e tumores primários (Hall CL *et. al.*, 2005). Um trabalho realizado para investigar a expressão de diversos membros da família Wnt através de RT-PCR semi-quantitativo revelou que não havia diferença de expressão de WNT4 nas amostras analisadas, sendo que o transcrito de WNT4 estava presente em

todas as linhagens celulares e células em cultura primária avaliadas (entre elas células prostáticas normais, fibroblastos, células de músculo liso e células tumorais de alto e baixo grau) (Zhu H *et. al.*, 2004).

Outros estudos não foram capazes de detectar a expressão dos membros WNT7a, WNT8b e WNT14 em amostras de CaP (Wissmann C *et. al.*, 2003).

Todos esses trabalhos mostram o envolvimento de diversos membros da família Wnt na tumorigênese da próstata. Esse comportamento dá suporte às funções oncogênicas da via de sinalização de Wnt.

Além desses dados de análises de expressão, uma outra característica muito importante mostra a relação de Wnts com o CaP: o intercruzamento das vias de Wnt com a via de AR. A via de AR é essencial para o desenvolvimento e progressão do CaP e já foi visto que o AR humano é um alvo direto da ativação transcricional de TCF/LEF (Yang X *et. al.*, 2006). Além disso, já foi demonstrado também, através de ensaios de duplo-híbrido e co-imunoprecipitação, que a β -catenina é capaz de se ligar à proteína AR e que essa ligação promove uma maior habilidade de AR induzir a transcrição dos genes alvos, sensíveis a androgênio (Masiello D *et. al.*, 2004; Song LN *et. al.*, 2003; Pawlowski JE *et. al.*, 2002; Yang F *et. al.*, 2002; Truica CI *et. al.*, 2000). Assim, a β -catenina é considerada um co-ativador da transcrição de AR. Além dessa interação, outros pontos do intercruzamento da via de Wnt com a via de AR merecem destaque, como a proteína GSK-3 β , que pode suprimir a atividade transcricional de AR, aparentemente através de um processo que necessita a fosforilação de AR. Há um aumento da transcrição do gene AR humano pelos fatores de transcrição da família TCF, os quais são ativados pela via de sinalização de Wnt (Terry S *et. al.*, 2006). Esses dados sugerem que a interação da via de AR com a via de Wnt é importante para o desenvolvimento e progressão do CaP, reforçando a relação entre os Wnts e o tumor de próstata.

1.3.1.1 Wnt4

O gene WNT4 está localizado no cromossomo 1p35 e codifica uma proteína de aproximadamente 39 kDa. A maioria dos dados disponíveis na

literatura sobre Wnt4 refere-se ao papel desta proteína na formação de órgãos e tecidos. Já foi demonstrado que Wnt4 é importante para o desenvolvimento de ovários e glândulas mamárias em camundongos, assim como o desenvolvimento dos rins, uma vez que Wnt4 é necessário para iniciar a diferenciação do mesênquima metanérico (Stark K *et. al.*, 1994).

Além disso, Wnt4 tem papel fundamental na diferenciação sexual feminina. Ele reprime a biossíntese de androgênio nas fêmeas, uma vez que foi visto que camundongos fêmeas *knock out* para WNT4 eram masculinizadas, como demonstrado pela ausência de ductos Mullerianos (do trato reprodutivo feminino) e presença de ductos Wolffianos (do trato reprodutivo masculino). Além disso, as fêmeas mutantes WNT4^{-/-} expressavam enzimas esteroidogênicas necessárias para a produção de testosterona, que são normalmente reprimidas nos ovários (Vainio S *et. al.*, 1999). Outro estudo com camundongos machos transgênicos que superexpressavam WNT4 mostrou que esses animais tinham uma diminuição dramática na expressão da proteína regulatória esteroidogênica, além de uma diminuição nos níveis de androgênio sérico e testicular (Jordan BK *et. al.*, 2003). Estudos de casos clínicos em humanos também já foram realizados demonstrando que WNT4 age como um repressor da diferenciação masculina (Biason-Lauber A *et. al.*, 2007; Biason-Lauber A *et. al.*, 2004), sendo, portanto, importante no desenvolvimento e manutenção do fenótipo feminino.

No baço, a sinalização por Wnt1 e Wnt4 regula a diferenciação dos tímócitos, cujos números diminuem nos mutantes (Mulroy T *et. al.*, 2002). WNT4 também regula o “branching” epitelial dependente de progesterona na glândula mamária (Brisken C *et. al.*, 2000), ou seja, ele regula o desenvolvimento da glândula mamária em resposta a mudanças hormonais que acontecem durante a gravidez e podem também ter papel na tumorigênese mamária (Smalley MJ & Dale TC, 2001).

Wnt4 parece poder ativar as duas vias de sinalização, tanto a canônica quanto a não-canônica. A produção de bastonetes na retina em desenvolvimento é promovida pela sinalização canônica Wnt4/ Frizzled4/ LRP6 (Hunter DD *et. al.*, 2004). A sinalização canônica de Wnt4 também dirige o desenvolvimento da articulação sinovial (Guo X *et. al.*, 2004) e medeia os efeitos do estrogênio no crescimento uterino (Hou X *et. al.*, 2004). Wnt4 é

capaz de regular genes alvos responsivos a β -catenina como ciclina D1 em ratos (Terada Y *et. al.*, 2003) e c-myc, o qual está envolvido no crescimento celular.

Há evidências também do envolvimento de Wnt4 na via de sinalização não-canônica. Em *Drosophila*, DWnt4 regula a cinase de adesão focal através da via da proteína cinase C (Cohen ED *et. al.*, 2002).

Como dito anteriormente, os dados de expressão de WNT4 em CaP são um pouco controversos na literatura, com estudos mostrando que sua expressão está aumentada em CaP mais agressivo e estudos mostrando que não há diferença de expressão de WNT4 em CaP e entre próstata normal. Além disso, nenhum trabalho caracterizou a expressão da proteína Wnt4 em tumores de próstata. Então, entender o perfil de expressão da proteína Wnt4 e caracterizar seu papel na tumorigênese da próstata pode contribuir para descrever uma importante via no desenvolvimento desse tumor, podendo, eventualmente, constituir uma via alternativa de alvos terapêuticos para o tratamento da doença. Além disso, a análise do perfil de expressão de determinada proteína tumoral constitui uma etapa importante para a identificação e caracterização de um potencial TAA. Para isso, é necessário avaliar a expressão da proteína no tecido tumoral e no tecido normal correspondente e analisar se diferenças existentes entre esses perfis da proteína permitem caracterizá-la como um possível TAA.

2 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivos:

1. Caracterizar o perfil de expressão da proteína Wnt4 em amostras teciduais de CaP e de hiperplasia prostática benigna.
2. Avaliar se a proteína Wnt4 é capaz de induzir a resposta de autoanticorpos em pacientes com CaP e se, portanto, constituiria um potencial antígeno associado ao tumor de próstata.

PARTE I

Análise do perfil de expressão da proteína Wnt4 em câncer de próstata

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos específicos

- Analisar, por imunoblot, a expressão de Wnt4 em extratos protéicos totais de amostras tumorais de pacientes com CaP.
- Através de imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-Wnt4, descrever a localização celular desta proteína nas células prostáticas tumorais e não-tumorais.
- Analisar o padrão de marcação e o nível de expressão de Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α nas amostras teciduais de CaP e HPB incluídas em um microarranjo de tecidos (TMA).
- Avaliar potenciais associações entre a expressão de Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α e dados clínico-patológicos de pacientes com CaP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração de proteínas totais de tumores e linhagens de CaP

As amostras teciduais para extração de proteínas totais de CaP foram obtidas através de colaboração com o grupo do Dr. Alexsandro Silva do Serviço de Urologia do Hospital Pedro Ernesto - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e coletadas em tubos contendo RNALater™ (Ambion). Os pacientes incluídos neste estudo foram candidatos a prostatectomia radical e não foram submetidos a qualquer tipo de tratamento prévio à cirurgia. Consentimentos livres e esclarecidos foram obtidos de todos os indivíduos incluídos neste estudo, tendo sido o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCa e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), segundo protocolo número 2701.

Amostras de tecidos de tumor prostático foram homogeneizadas em tampão de lise celular para extração de proteínas totais, segundo protocolo descrito por Tsutsumi (Tsutsumi H *et al.*, 2003). O tampão de lise contém 20 mM de Tris-HCl (pH 7.8), 300 mM de NaCl, 1% de NP-40 e 1 mM de PMSF. Foi adicionado 1 mL desse tampão em cada amostra de tecido tumoral e em cada precipitado de células. O tecido foi triturado com um homogenizador e as células foram ressuspensas por pipetagens repetidas. O homogenato foi centrifugado a 10,000 x g por 30 minutos a 4°C para obtenção das proteínas no sobrenadante.

3.2 Imunoblot

Ensaios de imunoblot foram realizados para detectar a proteína Wnt4 em amostras teciduais de CaP. Estes ensaios foram realizados segundo o manual *Molecular Cloning – A Laboratory Manual* e o sistema utilizado foi o *mini-PROTEAN 3* (Bio-Rad). As amostras de extrato total de proteínas foram fervidas a 100°C por 5 minutos e resolvidas em gel de poliacrilamida SDS/PAGE 12% por aproximadamente 1 hora a 140 Volts. Em seguida, foi feita a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose por 1 hora a 100 Volts, em tampão de transferência (0,3% de Tris-HCl, 1,4% de

glicina e 20% de metanol). Após a transferência das proteínas, as membranas eram coradas com uma solução de Vermelho de Ponceau (0,2% de vermelho de Ponceau e 3% de ácido tricloroacético), para visualização da eficiência de transferência do extrato de proteínas. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em solução 5% de leite desnatado em tampão PBS-T (0,05% de Tween 20 em PBS 1X). Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário policlonal anti-Wnt4 (Abcam) diluído 1: 10.000 em solução de bloqueio por uma hora à temperatura ambiente. Após 3 lavagens por 5 minutos com PBS-T sob agitação, as membranas eram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-cabra conjugado à peroxidase (Sigma), diluído 1: 5000. Após novas lavagens com PBS-T, a interação antígeno-anticorpo foi visualizada através da revelação das reações com o kit *ECL Western Blotting Detection Reagents* (Amershan Biosciences) seguido de exposição da membrana a filmes sensíveis à quimioluminescência (*KODAK BioMax Light Film* – Sigma Aldrich).

O tamanho previsto para a proteína Wnt4 (número de acesso no NCBI [BAC23080.1](#)) é de 39 kDa.

3.3 Construção do microarranjo de tecidos e imunohistoquímica

Os ensaios de imunohistoquímica foram realizados em colaboração com o grupo do Dr. Fernando Soares - Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo, 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 do mesmo.

Tecidos armazenados embebidos em parafina e fixados em formaldeído foram obtidos de 270 pacientes que sofreram prostatectomia retropúbica radical no período entre 1992 e 2002. As amostras tumorais foram histologicamente graduadas utilizando o Escore de Gleason e estadiadas de acordo com o Sistema de Estadiamento AJCC (Sistema TNM), sendo estes parâmetros obtidos de relatórios patológicos médicos e cirúrgicos. Todas as amostras foram revistas por um patologista especializado em análise de tecido

prostático para confirmar os dados e selecionar as regiões representativas do tumor, de onde seriam retiradas pequenas áreas para a construção do TMA.

O TMA utilizado neste estudo é constituído de 270 amostras teciduais de 1 mm retiradas de regiões morfológicamente representativas do tumor de 204 pacientes com CaP e de regiões não-tumorais provenientes de 66 pacientes com HPB. O número de casos analisados para a marcação com cada anticorpo foi variável, devido à falta de tumor em determinadas amostras, tecido danificado ou “spots” que se descolaram durante o processamento das lâminas.

Para a realização da imunohistoquímica, foram utilizadas duas lâminas do TMA para cada anticorpo, sendo que essas lâminas eram provenientes de cortes em níveis diferentes do tecido, onde um corte estava a 40 seções mais profundas que o outro, garantindo diferentes amostras representativas para cada tumor. As seções foram desparafinizadas em xilol e desidratadas em álcool. A recuperação antigênica foi realizada em sistema de alta pressão em solução de citrato de sódio 10 mM pH 6.0 ou Tris-EDTA pH 9.0. A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio 3% por 3 vezes durante 5 minutos. Sítios de ligação inespecíficos para o anticorpo foram bloqueados com a solução de bloqueio *Protein Block Serum-Free Ready-to-use* (Dako) por 20 minutos. As lâminas de TMA foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpos específicos contra Wnt4 (anticorpo policlonal ab15699 – Abcam), E-caderina (BD Biosciences) e Topoisomerase II- α (Clone Ki-S1 – Dako). Os anticorpos foram diluídos no diluente *Antibody Diluent with Background Reducing Components* (Dako) na proporção 1:300 para Wnt4, 1:200 para PSA, 1:400 para E-caderina e 1:800 para Topoisomerase II α . Após a incubação com os anticorpos, as lâminas foram lavadas com PBS 1X por 3 vezes durante 5 minutos. Após a lavagem, no caso do anticorpo anti-Wnt4, as seções foram incubadas por 20 minutos com cada reagente do Kit LSAB (*Biotinylated Link Universal* e *Streptavidin-HRP* – Dako). Para os anticorpos contra E-caderina e Topoisomerase II α , as lâminas foram incubadas com o Kit Polímero (*NovoLink Max Polymer* – Novocastra) por 30 minutos com cada reagente. Ambos os kits foram utilizados para aumentar a detecção da reação do anticorpo e entre um reagente e outro, as lâminas foram lavadas com PBS 1X (por 3 vezes durante 5 minutos). Todas as lâminas foram

lavadas em PBS novamente antes da revelação dos sítios imunoreativos com DAB (Dako) por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos e a contra-coloração foi feita com incubação em hematoxilina de Harris por 2 minutos. Após lavagem em água corrente, as lâminas foram re-hidratadas com álcool, passadas em xilol e montadas automaticamente no aparelho *Tissue-Tek Prisma* (Sakura Seiki Co., Ltda). Como controles positivos e negativos para a imunohistoquímica, foram utilizadas amostras teciduais de ovário para Wnt4, pele para E-caderina e amígdala para Topoisomerase II- α . Os controles negativos foram realizados na ausência dos anticorpos primários.

3.4 Avaliação da marcação imunohistoquímica e sua categorização

As lâminas coradas foram examinadas por um *software* de detecção de coloração, denominado de ACIS III “Software”, no aparelho ACIS III (*Automated Cellular Imaging System* – Dako). Com a ajuda destes recursos, as células marcadas foram detectadas e a intensidade de marcação foi quantificada baseada em informações pré-determinadas do local de expressão das proteínas, podendo ser citoplasmático, nuclear ou na membrana. Os resultados foram obtidos calculando-se a média da intensidade de marcação do anticorpo ou a média da porcentagem de núcleos marcados nas células de, pelo menos, três áreas selecionadas para cada amostra. Para as quantificações de Wnt4 e E-caderina considerou-se a média de intensidade de marcação no citoplasma e na membrana celular, respectivamente. No caso de Topoisomerase II- α , foi utilizada a média da porcentagem de núcleos marcados. Os valores de intensidade de marcação para os anticorpos contra Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α foram categorizados utilizando a distribuição por quartis. A categorização para os três marcadores é mostrada na Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição dos valores de intensidade de marcação para Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α , segundo a categorização em quartis.

Quartis	Categorias	Intensidade dos marcadores *		
		Wnt4	E-caderina	Topoisomerase II- α
< percentil 25	1	< 80	< 110	< 13
\geq percentil 25 e < percentil 50	2	80 – 86,9	110 – 115,9	13 – 21,9
\geq percentil 50 e < percentil 75	3	87 – 95,9	116 – 125,9	22 – 34,9
\geq percentil 75	4	\geq 96	\geq 126	\geq 35

* Valores de intensidade dos marcadores dados em unidades arbitrárias.

3.5 Análises estatísticas

O teste da mediana (não-paramétrico) foi utilizado para comparar as intensidades medianas de marcação do anticorpo entre amostras de CaP e HPB, entre pacientes que apresentaram ou não recorrência bioquímica, recidiva clínica e segundo tumor primário. Diferenças entre a categorização das intensidades de marcação e o Escore de Gleason ou níveis de PSA pré-operatório foram analisadas pelo teste Qui-quadrado. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para calcular o tempo de sobrevida livre de recorrência bioquímica e as diferenças foram analisadas pelo teste de Log rank. As associações entre as marcações de Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α foram analisadas pelo teste de correlação Kendall's tau b. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão de Wnt4 em extratos protéicos de tumor de próstata

Com a finalidade de verificar se a proteína Wnt4 seria expressa em amostras teciduais de tumor de próstata, utilizou-se extratos protéicos totais de tecidos tumorais de quatro pacientes diferentes com CaP (201, 202, 204 e 205). Esses extratos, ao serem incubados com o anticorpo policlonal anti-Wnt4 através de ensaios de imunoblot, revelaram reatividade de uma proteína de tamanho de aproximadamente 50 kDa (Figura 10). Desta forma, esses dados demonstram a presença de uma proteína reconhecida pelo anticorpo anti-Wnt4 em amostras de CaP, sugerindo que Wnt4 é expressa nestes tecidos tumorais.

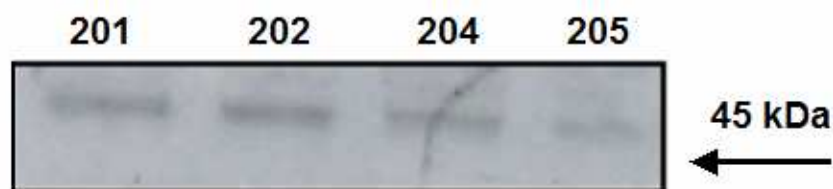


Figura 10. Detecção da proteína Wnt4 por ensaios de imunoblot utilizando extratos protéicos totais de tecido tumoral de quatro pacientes com CaP.

4.2 Características das amostras utilizadas no TMA

Uma vez que a proteína Wnt4 foi detectada em amostras teciduais de tumor de próstata, ensaios de imunohistoquímica foram realizados para analisar o perfil espacial de expressão desta proteína. Além de Wnt4, os ensaios também foram realizados para duas outras proteínas: a E-caderina e a Topoisomerase II- α . Ambas foram avaliadas por serem proteínas importantes na caracterização do CaP, uma vez que seus perfis de expressão estão associados à agressividade do tumor prostático. O objetivo dessa avaliação foi correlacionar os dados de expressão de Wnt4 com os perfis de expressão de E-caderina e Topoisomerase II- α , para avaliar se a proteína Wnt4 poderia estar exercendo um papel semelhante em termos de progressão do CaP.

A marcação para Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α foi feita em um microarranjo de tecidos contendo 270 amostras, sendo que 204 foram provenientes de CaP e 66 de tecidos de HPB (Figura 11).

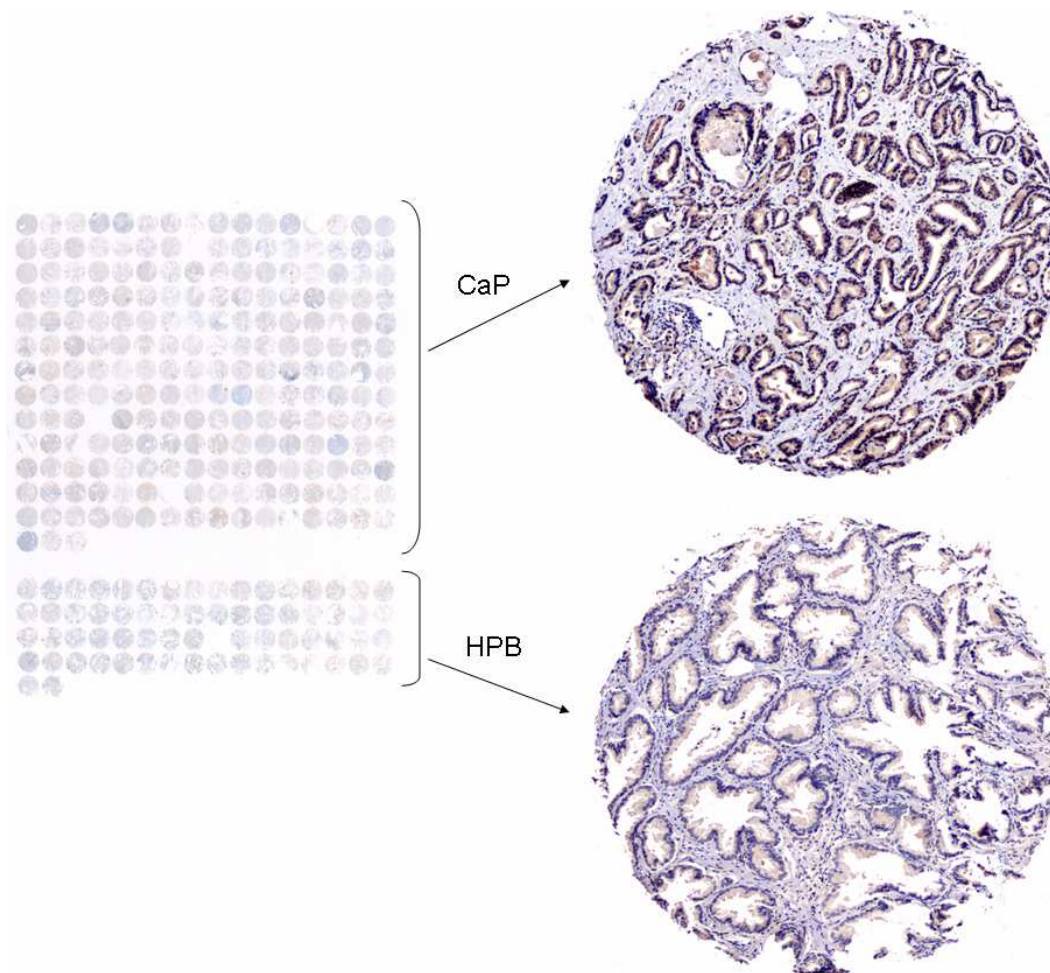


Figura 11. Esquema ilustrando uma seção do microarranjo de tecidos utilizado neste estudo. O TMA é constituído de 204 amostras de CaP e 66 amostras de HPB. Neste exemplo, a marcação do TMA foi proveniente de imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-Wnt4. Magnificação original 4X.

As características clínico-patológicas dos 204 pacientes com CaP e seus respectivos tumores são mostradas na Tabela 7. A idade mediana dos pacientes foi de 64 anos (41 a 83 anos) e o estudo apresentou média de seguimento dos pacientes de aproximadamente 90 meses. Um volume tumoral acima de 20% da próstata normal estava presente em 38,3% dos pacientes; 64,2% tiveram Escore de Gleason de 2 a 6 e 35,3% tiveram Escore de 7 a 10. Enquanto 55,4% dos pacientes apresentaram recorrência bioquímica, apenas 8,8% apresentaram recidiva clínica da doença. Outros parâmetros

utilizados em diagnóstico e prognóstico do CaP também foram obtidos para esses pacientes (Tabela 7).

Tabela 7. Características clínico-patológicas dos pacientes com CaP utilizados no TMA.

Variáveis	Número de pacientes	%
Casos totais	204	100
Idade, anos		
Mediana (min – máx)	64 (41 – 83)	
Média (desvio)	63,02 (7,01)	
Tempo de seguimento, anos		
Mediana (min – máx)	7,4 (1,5 – 16,5)	
Média (desvio)	7,66 (2,77)	
Volume tumoral, % *		
Mediana (min – máx)	18 (2 – 100)	
Média (desvio)	25,01 (21,23)	
< 5.0	15	7,3
5.0 – 10.0	35	17,2
10.1 – 20.0	47	23
> 20.0	78	38,3
Antecedente familiar*		
Sem	119	58,3
Com	67	32,9
Escore de Gleason *		
2-6	131	64,2
7-10	72	35,3
PSA pré-operatório, ng/mL *		
< 4.0	17	8,4
4.0 – 10.0	98	48
10.1 – 20.0	57	28
> 20.0	29	14,2
Estadiamento pT patológico *		
pT2a	10	4,9
pT2b	84	41,2
pT3a	65	31,9
pT3b	28	13,7
pT4	12	5,9
“Status” do linfonodo *		
Negativo	183	89,7
Positivo	8	3,9
Invasão capsular *		
Negativo	90	44,1
Positivo e focal	93	45,6
Positivo e intensivo	20	9,8

Invasão angio-linfática *		
Negativo	154	75,5
Positivo	42	20,6
Margens *		
Negativa	145	71,1
Positiva	57	27,9
Recorrência bioquímica *		
Não	90	44,1
Sim	113	55,4
Recidiva clínica *		
Não	183	89,7
Sim	18	8,8
Segundo tumor *		
Não	171	83,8
Sim	23	11,3
Terapia neoadjuvante *		
Não	156	76,5
Sim	41	20,1

* Valores não disponíveis para todos os 204 casos.

4.3 Perfil de expressão de Wnt4 em células de CaP e HPB

Os ensaios de imunohistoquímica em TMA utilizando o anticorpo policlonal contra a proteína Wnt4 permitiram analisar e descrever a localização e o padrão de expressão de Wnt4 nas células prostáticas tumorais e não tumorais. Esses ensaios mostraram que havia marcação para a proteína Wnt4 em seções que representavam tanto tecidos malignos quanto tecidos hiperplásicos não-malignos.

Em glândulas não-malignas, representadas por HPB, a imunoreatividade para Wnt4 foi detectada no citoplasma de forma bem difusa e também na membrana, principalmente na borda das células epiteliais voltadas para o lúmen (Figura 12). Não foi possível observar se as células basais apresentavam marcação.

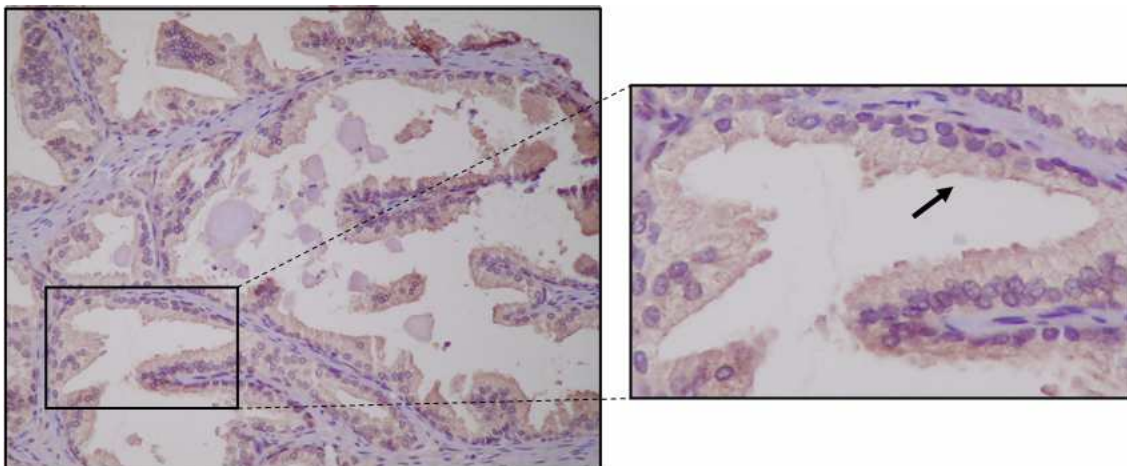


Figura 12. Marcação de Wnt4 em células de hiperplasia prostática benigna, mostrando um perfil de marcação citoplasmático difuso e de membrana com predomínio na borda apical das células epiteliais (seta). Magnificação original 20X.

Nas glândulas tumorais, a marcação para Wnt4 observada também foi predominantemente citoplasmática, tendo uma apresentação mais granular em comparação à HPB, como pode ser observado na Figura 13. Além disso, também se observou uma marcação mais forte na porção apical das células epiteliais (Figura 14, setas). Não foi observada marcação positiva para o anticorpo anti-Wnt4 no estroma que circunda tanto células malignas quanto células benignas.

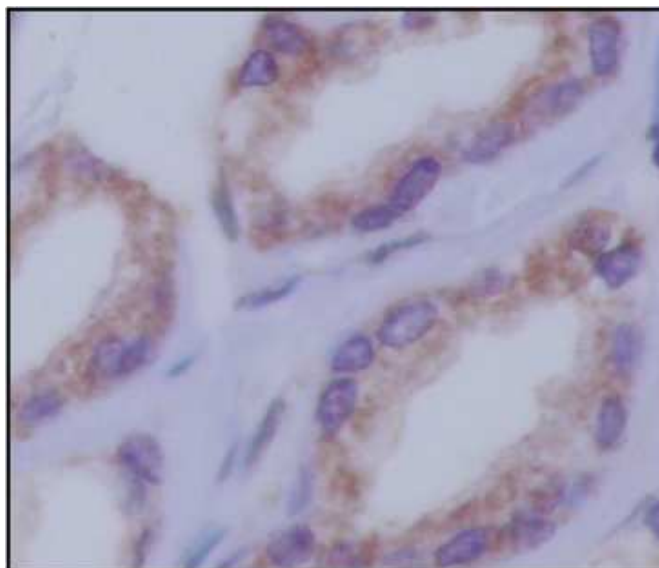


Figura 13. Células tumorais prostáticas marcadas com anticorpo anti-Wnt4 mostrando uma marcação citoplasmática com aspecto granular (magnificação original 40X).

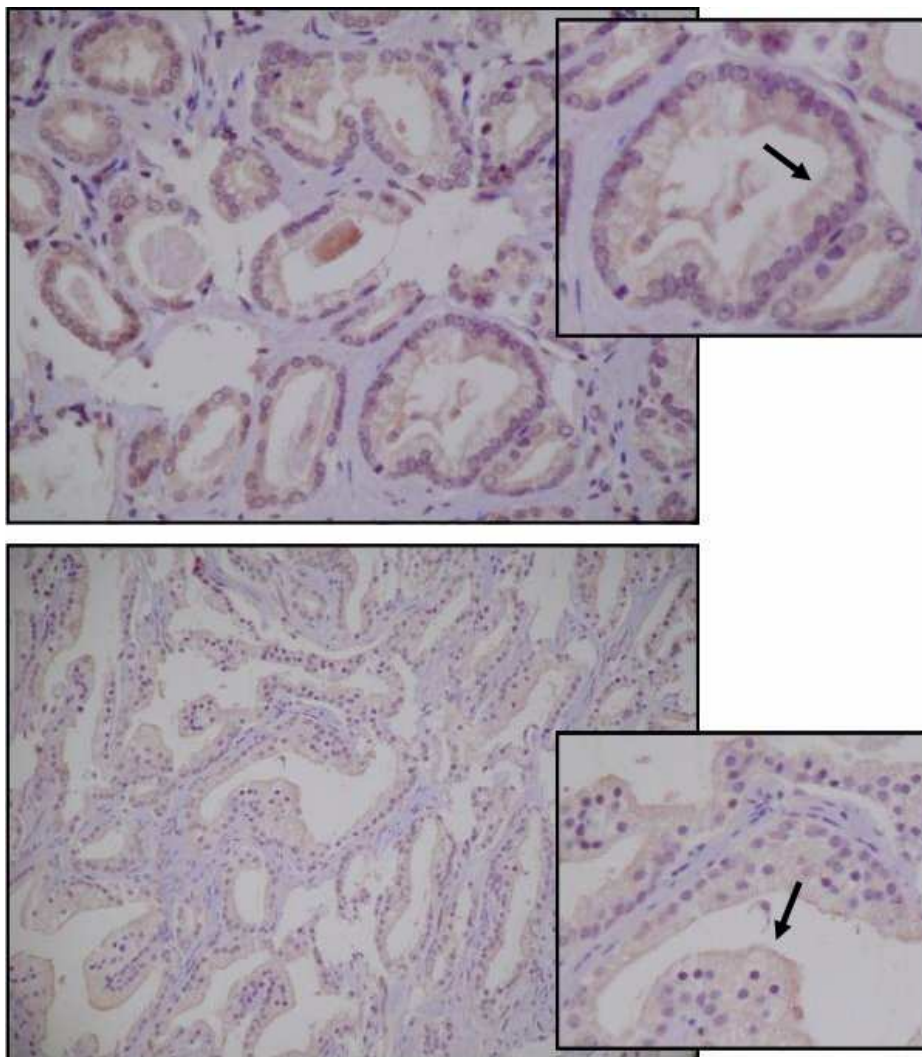


Figura 14. Figuras representativas de tecidos tumorais de próstata marcados para Wnt4, revelando uma maior marcação na borda luminal das células epiteliais cancerosas (setas). Magnificação original 40X e 20X.

4.4 Expressão de Wnt4 em CaP e HPB

De um modo geral, a marcação para o anticorpo anti-Wnt4 em amostras tumorais e não tumorais de próstata apresentou-se bastante heterogênea, na qual algumas amostras marcaram fortemente enquanto outras tiveram fraca marcação. Como controle positivo para a marcação do anticorpo anti-Wnt4, foram utilizadas seções contendo tecido de ovário, o qual sabidamente expressa esta proteína. Os tecidos foram incubados na presença ou ausência do anticorpo (Figura 15).

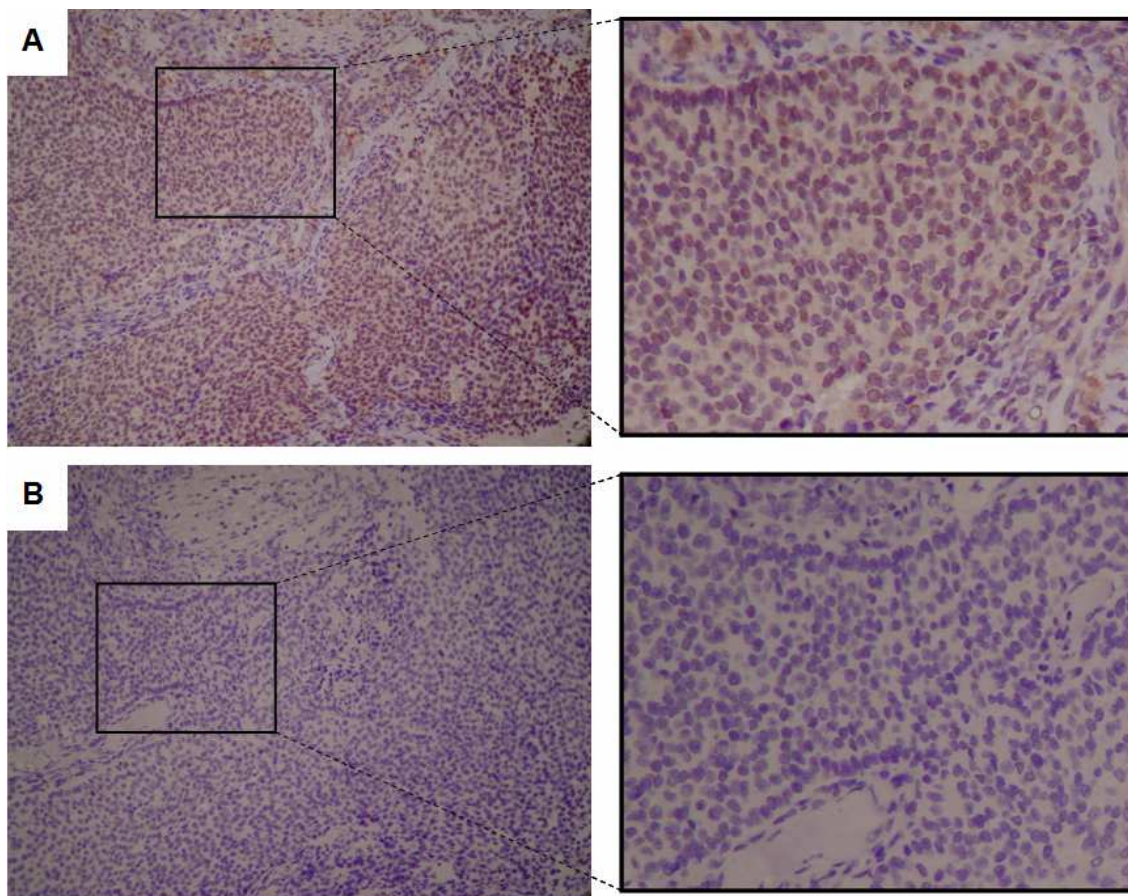


Figura 15. Amostras de ovário utilizadas como controle positivo de marcação para o anticorpo anti-Wnt4. **A.** Controle positivo, no qual o tecido foi incubado com o anticorpo, mostrando marcação no citoplasma das células. **B.** Seção tecidual não incubada com o anticorpo anti-Wnt4 (controle negativo da marcação). Magnificação original 20X.

Para analisar o perfil de expressão de Wnt4 nos tecidos incluídos no TMA utilizado neste estudo, a marcação foi quantificada por um *software* que atribui valores numéricos contínuos para a intensidade de coloração detectada no citoplasma das células.

Cento e oitenta e seis pacientes (152 pacientes com CaP e 34 pacientes com HPB) foram informativos para o perfil de expressão de Wnt4. Alguns resultados não foram incluídos no estudo devido à falta de tumor na amostra, tecido danificado ou ainda a falta do tecido em algumas posições do TMA (“spots” vazios).

O valor numérico de intensidade mediana de marcação para Wnt4 foi ligeiramente maior nas amostras de pacientes com CaP em relação às amostras de pacientes com HPB, embora a diferença não tenha sido significativa ($p= 0,756$ – Tabela 8).

Tabela 8. Intensidades de expressão de Wnt4 em tecidos tumorais e não tumorais de próstata.

<i>Marcador</i>	<i>Histologia</i>	<i>n</i>	<i>Mediana</i>	<i>Min.</i>	<i>Máx.</i>
Wnt4	CaP	152	87,1	62	124
	HPB	34	86,5	70	102

p= 0,756

A diferença para a mediana de marcação mostrou não ser significativa (p= 0,756).

A intensidade mediana de marcação para a proteína Wnt4 também pareceu ser um pouco maior nas amostras de pacientes que apresentaram recidiva clínica da doença em relação aos que não apresentaram, mas não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (p= 0,772 – Tabela 9). O mesmo aconteceu com pacientes que apresentaram ou não recorrência bioquímica e pacientes que tiveram ou não um segundo tumor primário. Nestes grupos, a intensidade de marcação foi maior nas amostras de pacientes que apresentaram eventos de recorrência da doença e presença de um segundo tumor, mas os resultados não atingiram significância estatística (p= 0,675 e p= 0,173 respectivamente – Tabela 9).

Tabela 9. Mediana da intensidade de marcação para a proteína Wnt4 em amostras de pacientes com CaP classificados para ocorrência ou não de recorrência bioquímica, recidiva clínica da doença e presença de um segundo tumor primário.

<i>Variável</i>	<i>Status</i>	<i>n</i>	<i>Mediana</i>
Recorrência bioquímica	Sim	84	87,45 (62 – 124)
	Não	67	87 (64 – 122) ^a
Recidiva clínica	Sim	13	90 (77 – 106)
	Não	137	87 (62 – 124) ^b
Segundo tumor	Sim	15	88,5 (81 – 115)
	Não	129	86,4 (62 – 122) ^c

^a p= 0,675; ^b p= 0,772; ^c p= 0,173

Para melhor descrever o perfil de marcação para Wnt4 nestas amostras incluídas no TMA, os valores de intensidade de marcação foram distribuídos em quatro categorias para a expressão de Wnt4, sendo 1- ausência de marcação ou marcação muito fraca, 2- marcação fraca, 3- marcação moderada e 4- marcação forte (Figura 16), segundo critérios descritos na metodologia.

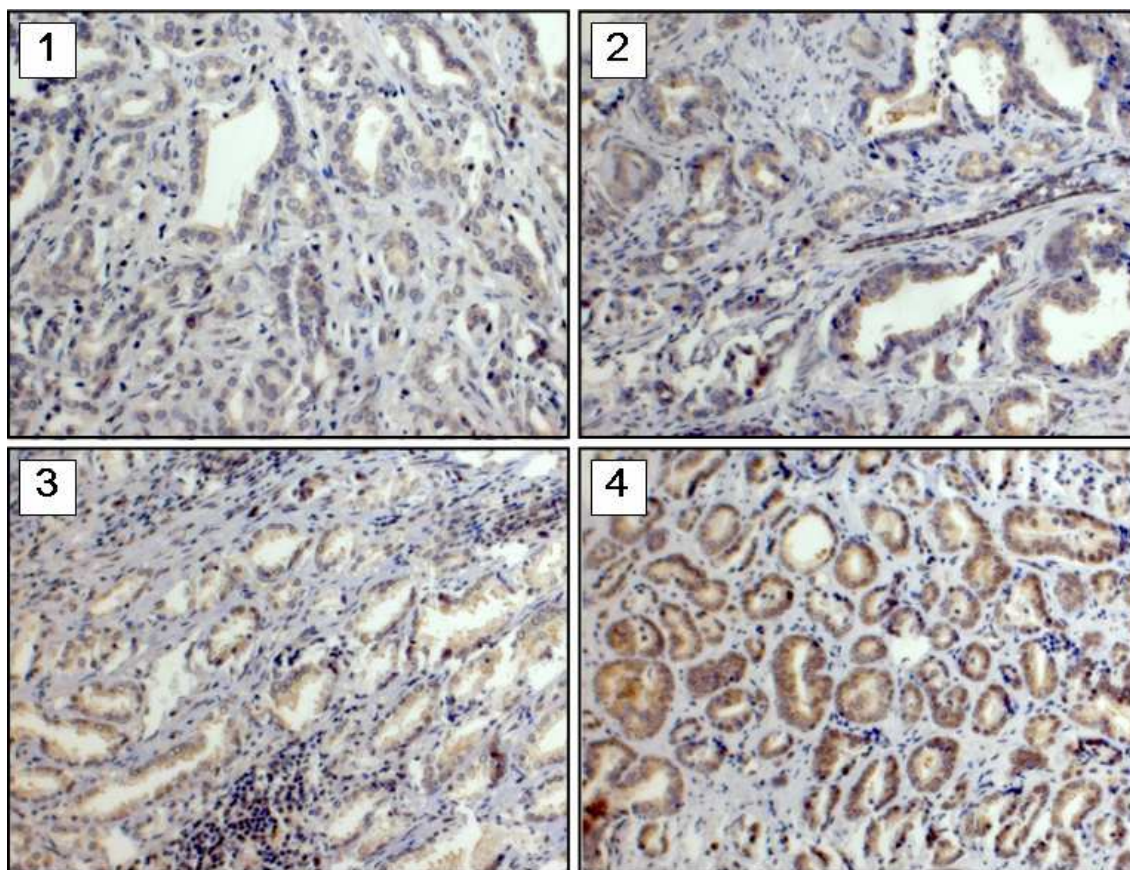


Figura 16. Categorização da intensidade de marcação da proteína Wnt4 em CaP. 1- Ausência de marcação ou marcação muito fraca; 2- Fraca marcação; 3- Média marcação; 4- Forte marcação. Magnificação original 40X.

Os valores de expressão de Wnt4 categorizados segundo a intensidade de marcação foram correlacionados com os níveis de PSA pré-operatório e o Escore de Gleason dos pacientes, uma vez que estes parâmetros são os mais utilizados na clínica atualmente para diagnóstico e prognóstico do tumor de próstata. Os resultados mostram que no grupo de pacientes com EG de 2 a 6 existe uma maior proporção de indivíduos com amostras que marcam com intensidade moderada a forte para Wnt4 e no grupo de EG de 7 a 10, a maior proporção dos pacientes apresenta tumores que marcam com intensidade fraca (Tabela 10). No entanto, testes estatísticos revelaram que essas diferenças não foram consideradas significativas ($p= 0,728$), ou seja, não há correlação entre a intensidade de marcação para Wnt4 e o grau de diferenciação das células tumorais determinado pelo EG.

Tabela 10. Correlação da expressão de Wnt4 em CaP com o Escore de Gleason.

Escore de Gleason	Nº de casos (%)	Escore de imunoreatividade de Wnt4 (%)			
		1	2	3	4
2 a 6	125 (85)	30/ 125 (24)	28/ 125 (22,4)	34/ 125 (27,2)	33/125 (26,4)
7 a 10	22 (15)	5/ 22 (22,7)	7/ 22 (31,8)	4/ 22 (18,2)	6/ 22 (27,3)
Total	147 (100)	35/ 147 (23,8)	35/ 147 (23,8)	38/ 147 (25,9)	39/ 147 (26,5)

Porcentagem de amostras marcadas de acordo com o escore de imunoreatividade de Wnt4: 1- marcação muito fraca ou ausente; 2- marcação de intensidade fraca; 3- marcação de intensidade média; 4- marcação de intensidade forte.

* Valor de $p=0,728$

Em relação ao nível de PSA pré operatório, o que se observa é que uma maior proporção dos pacientes (62,5%) que possuem PSA menor do que 4 ng/mL possuem amostras que apresentam marcação de intensidade moderada à forte para a proteína Wnt4 (Tabela 11). Já no grupo de pacientes com PSA acima de 20 ng/mL a maior proporção deles (60,9%) possui amostras que não marcam ou marcam fracamente para Wnt4. Apesar dos dados sugerirem uma tendência à diminuição da intensidade de marcação de Wnt4 de acordo com o aumento dos níveis de PSA pré-operatório, essa diferença não foi considerada significativa ($p=0,785$).

Tabela 11. Correlação da expressão de Wnt4 em CaP com os níveis de PSA pré-operatório.

PSA (ng/ mL)	Nº de casos (%)	Escore de imunoreatividade de Wnt4 (%)			
		1	2	3	4
< 4	8 (5,4)	1/ 8 (12,5)	2/ 8 (25)	2/ 8 (25)	3/ 8 (37,5)
4 – 10	68 (45,6)	16/ 68 (23,5)	19/ 68 (28)	16/ 68 (23,5)	17/ 68 (25)
10 – 20	50 (33,6)	10/ 50 (20)	9/ 50 (18)	16/ 50 (32)	15/ 50 (30)
> 20	23 (15,4)	8/ 23 (34,8)	6/ 23 (26,1)	5/ 23 (21,7)	4/ 23 (17,4)
Total	149 (100)	35/ 149 (23,5)	36/ 149 (24,1)	39/ 149 (26,2)	39/ 149 (26,2)

Porcentagem de amostras marcadas de acordo com o escore de imunoreatividade de Wnt4: 1- marcação muito fraca ou ausente; 2- marcação de intensidade fraca; 3- marcação de intensidade média; 4- marcação de intensidade forte.

* Valor de $p=0,785$

Um dos parâmetros mais importantes para o acompanhamento dos pacientes com CaP é o aumento dos níveis de PSA após a cirurgia, característica principal da recorrência bioquímica da doença. Como mostrado anteriormente, tumores de pacientes que apresentaram ou não recorrência bioquímica não tiveram diferença nos níveis medianos de intensidade de marcação para a proteína Wnt4. No entanto, ao analisar temporalmente os pacientes que apresentaram recorrência bioquímica em relação ao nível de intensidade de marcação para Wnt4, observou-se que pacientes que possuem tumores com forte marcação para esta proteína tinham recorrência bioquímica em menor tempo em relação aos outros (Log Rank, $p= 0,267$ – Figura 17). Comparando-se somente pacientes cujos tumores possuem marcação muito fraca ou ausente para Wnt4 e pacientes cujos tumores marcam fortemente para esta proteína observou-se que estes últimos apresentam um tempo de sobrevida livre de recorrência bioquímica do CaP menor (dois anos a menos) em relação aos pacientes que possuem amostras com marcação negativa ou muito fraca para Wnt4 ($p= 0,028$ – Figura 18).

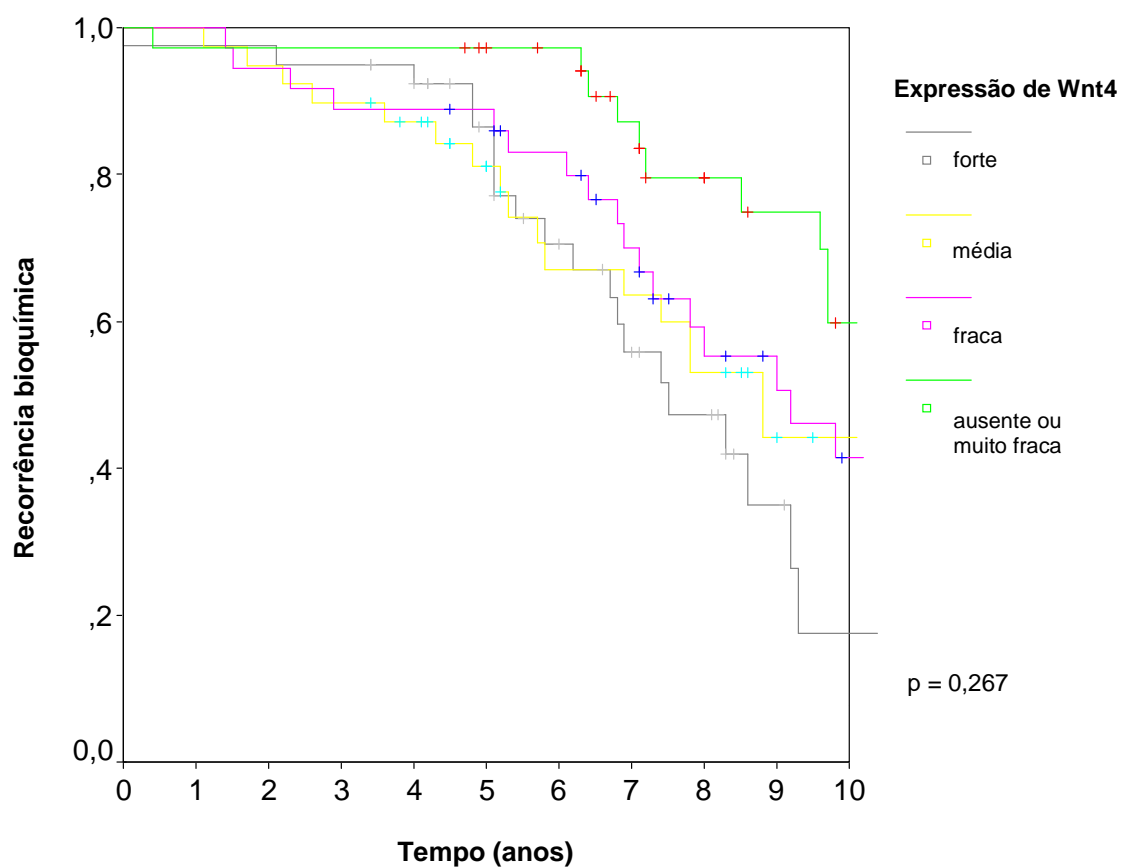


Figura 17. Curva de sobrevida livre de recorrência bioquímica para pacientes com CaP cujos tumores apresentam diferentes níveis de expressão de Wnt4.

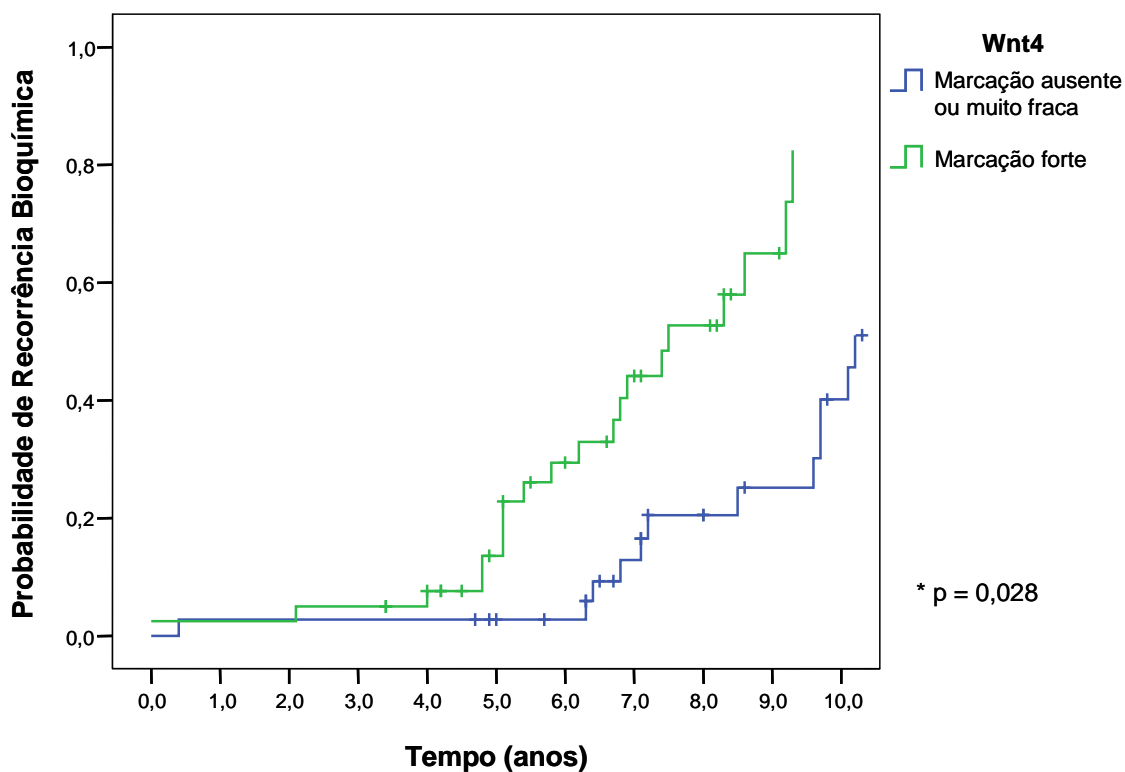


Figura 18. Probabilidade de ocorrer recorrência bioquímica em pacientes com CaP cujos tumores apresentam marcação negativa ou forte para a proteína Wnt4. O gráfico mostra que pacientes que possuem forte marcação para Wnt4 apresentam recorrência do CaP em menor tempo em relação aos pacientes que possuem marcação negativa ou muito fraca para a proteína ($p = 0,028$).

4.5 Expressão de E-caderina em tecidos prostáticos

E-caderina é uma proteína de membrana importante que participa do processo de junções entre as células. Como dito anteriormente, seu perfil de expressão tem sido associado com a progressão do tumor de próstata e seu potencial metastático. Com a finalidade de verificar se a expressão de Wnt4 estaria correlacionada com a expressão de E-caderina, seções de TMA foram incubadas com o anticorpo específico para esta proteína. Como controle da expressão de E-caderina nos ensaios de imunohistoquímica, foram utilizados tecidos de pele incubados na ausência e presença do anticorpo (Figura 19).

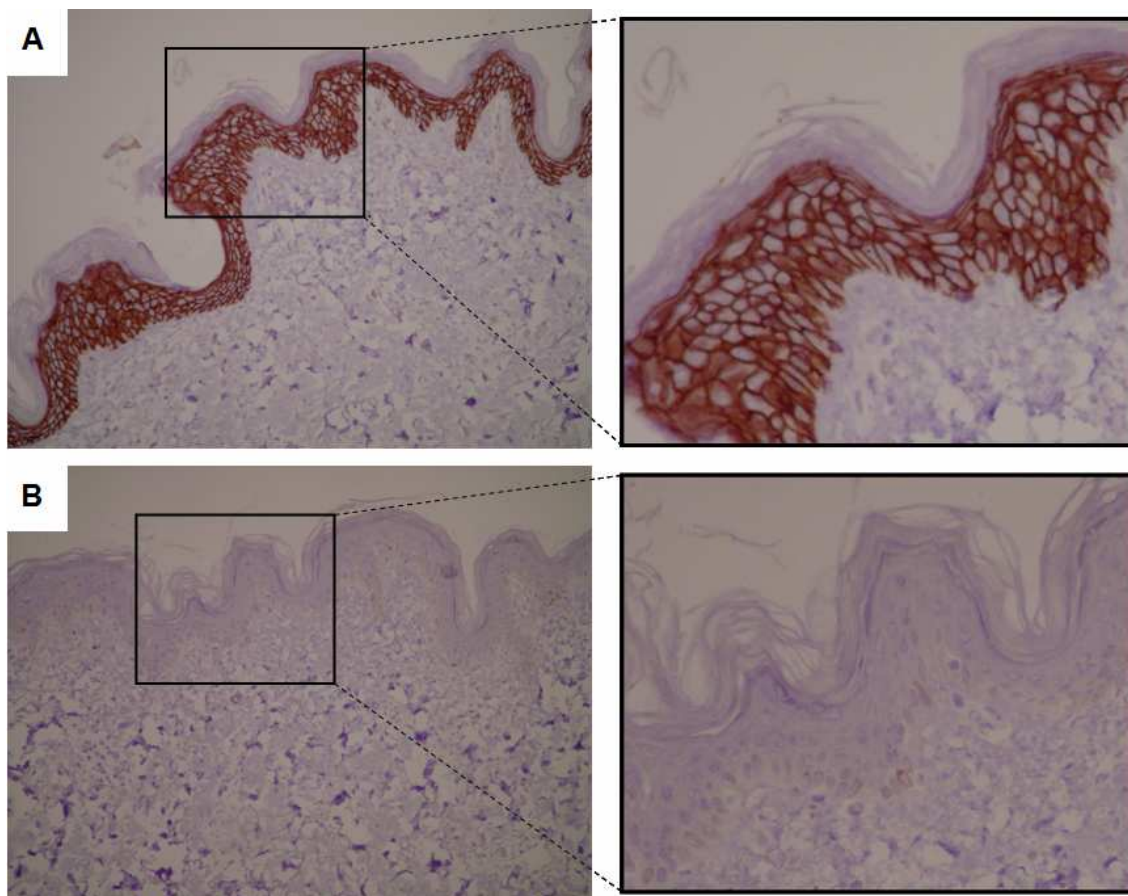


Figura 19. Amostras de tecido de pele utilizadas como controle da marcação para o anticorpo anti-E-caderina. **A.** Controle positivo, onde o tecido foi incubado com o anticorpo, mostrando marcação na membrana plasmática das células. **B.** Tecido que não foi incubado com o anticorpo contra E-caderina (controle negativo). Magnificação original 20X.

Aparentemente, todas as amostras analisadas no TMA, tanto de CaP quanto de HPB, marcam para E-caderina em maiores ou menores níveis, sendo que aproximadamente 75% das amostras marcam com intensidade moderada a forte. A quantificação para a marcação de E-caderina foi limitada às membranas plasmáticas das células e 180 pacientes (153 pacientes com CaP e 27 pacientes com HPB) foram informativos para o perfil de expressão da proteína.

A expressão de E-caderina não se mostrou associada com nenhum dos parâmetros clínico-patológicos analisados neste trabalho. Apesar do valor mediano de intensidade de expressão de E-caderina ter sido ligeiramente maior em amostras de câncer comparadas com amostras não neoplásicas, estas diferenças não são estatisticamente significativas entre estes dois grupos ($p= 0,754$ – Tabela 12).

Tabela 12. Expressão de E-caderina em tecidos tumorais e não tumorais de próstata.

<i>Marcador</i>	<i>Histologia</i>	<i>n</i>	<i>Mediana</i>	<i>Min.</i>	<i>Máx.</i>
E-caderina	CaP	153	116	77	153
	HPB	27	113	79	135

$p=0,754$

A diferença para a mediana de marcação mostrou não ser significativa ($p=0,754$).

A análise de pacientes que tiveram ou não recorrência bioquímica ou recidiva clínica do CaP revelou que as amostras dos indivíduos que apresentaram esses eventos possuíam um valor mediano de intensidade de marcação para E-caderina maior em relação às amostras dos pacientes que foram negativos para os eventos (Tabela 13). Apesar dessa tendência em discriminar esses grupos de pacientes, não houve diferença estatística na intensidade mediana de expressão de E-caderina entre eles ($p=0,931$ para recorrência bioquímica e $p=0,104$ para recidiva clínica). Além disso, as amostras de pacientes que possuem um segundo tumor primário têm menor expressão de E-caderina comparados com amostras de pacientes que não possuem esse tumor, mas a diferença de intensidade de marcação mediana também não foi estatisticamente significativa ($p=0,917$).

Tabela 13. Mediana da intensidade de marcação para a proteína E-caderina em tumores de pacientes com CaP classificados para ocorrência ou não de recorrência bioquímica, recidiva clínica da doença e presença de um segundo tumor primário.

<i>Variável</i>	<i>Status</i>	<i>n</i>	<i>Mediana</i>
Recorrência bioquímica	Sim	86	116 (77 – 153)
	Não	66	115,5 (94 – 142) ^a
Recidiva clínica	Sim	13	121,6 (110 – 138)
	Não	138	115,3 (77 – 153) ^b
Segundo tumor	Sim	15	114,5 (100 – 153)
	Não	131	116 (77 – 142) ^c

^a $p=0,931$; ^b $p=0,104$; ^c $p=0,917$

Os resultados numéricos de intensidade de marcação para E-caderina, obtidos pela análise do *software*, foram categorizados em 1- marcação fraca, 2-

marcação moderada, 3- marcação forte e 4- marcação muito forte. Algumas amostras representativas dessas categorias são mostradas na Figura 20.

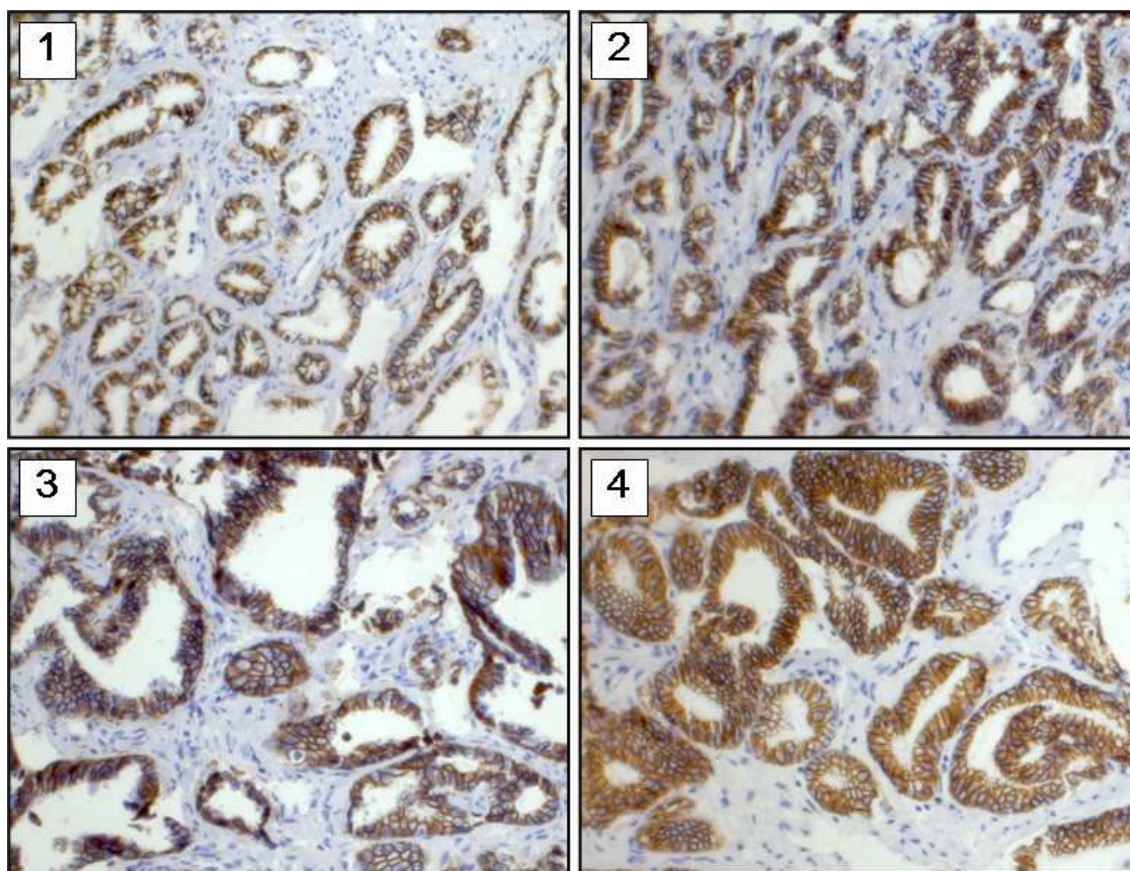


Figura 20. Categorização da intensidade de marcação para a proteína E-caderina em tecidos tumorais de próstata. 1- Marcação fraca; 2- Marcação moderada; 3- Marcação forte; 4- Marcação muito forte. Magnificação original 40X.

A expressão de E-caderina separada em grupos com intensidades de marcação diferentes também não apresentou correlação com o Escore de Gleason ($p= 0,718$ – Tabela 14), pois a maioria dos tumores possui marcação moderada a muito forte para a proteína, independente do Escore de Gleason que os pacientes apresentam. Também não foi possível observar diferenças neste estudo entre as intensidades de marcação para E-caderina em relação à sobrevida livre de recorrência bioquímica para o CaP ($p= 0,559$ – Figura 21).

Tabela 14. Correlação da expressão de E-caderina com o Escore de Gleason em amostras teciduais de CaP.

Escore de Gleason	N° de casos (%)	Escore de imunoreatividade de E-caderina (%)			
		1	2	3	4
2 a 6	128 (86,5)	29/ 128 (22,7)	35/ 128 (27,3)	32/ 128 (25)	32/ 128 (25)
7 a 10	20 (13,5)	3/ 20 (15)	6/ 20 (30)	4/ 20 (20)	7/ 20 (35)
Total	148 (100)	32/ 148 (21,6)	41/ 148 (27,7)	36/ 148 (24,3)	39/ 148 (26,4)

Porcentagem de amostras marcadas de acordo com o escore de imunoreatividade de E-caderina: 1- marcação de intensidade fraca; 2- marcação de intensidade média; 3- marcação de intensidade forte; 4- marcação de intensidade muito forte.

* Valor de $p=0,718$

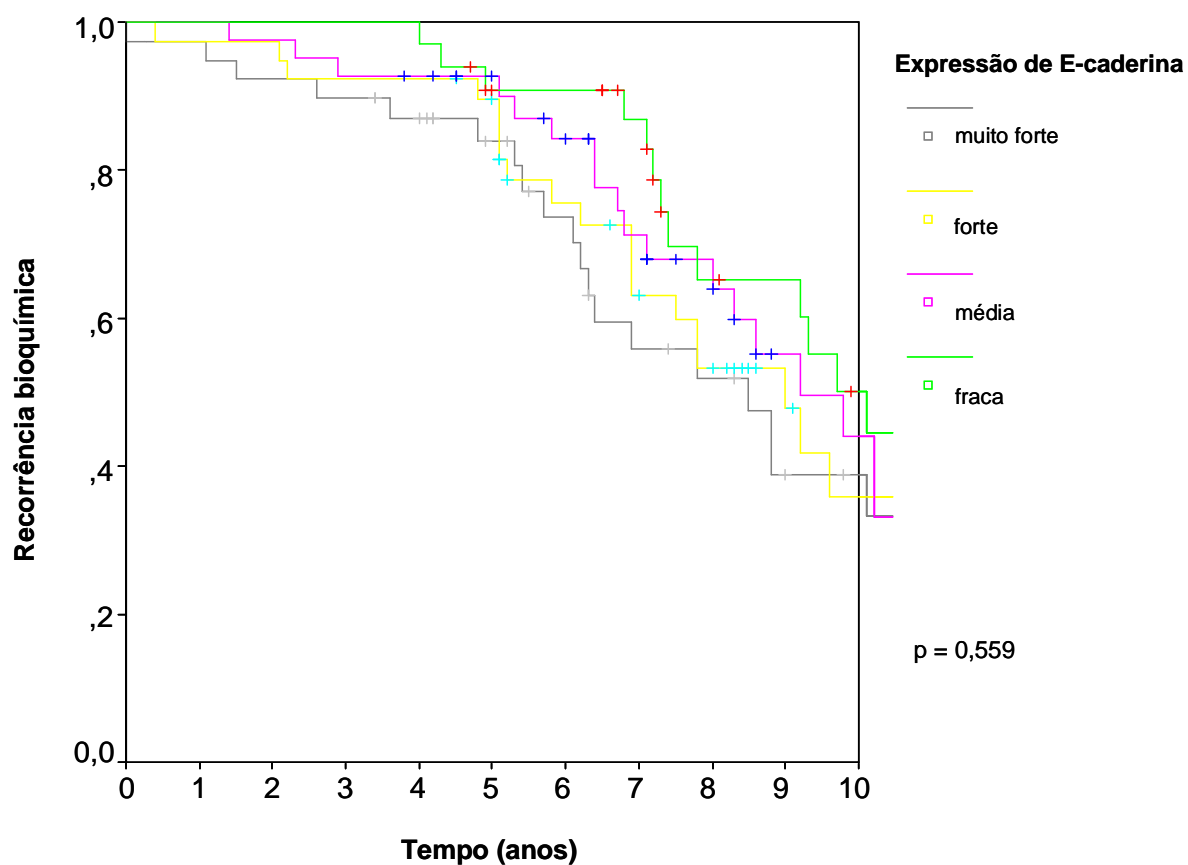


Figura 21. Curva de sobrevivência livre de recorrência bioquímica para pacientes com CaP cujos tumores apresentam diferentes níveis de marcação de E-caderina.

4.6 Expressão de Topoisomerase II- α em tecidos prostáticos

A Topoisomerase II- α é uma proteína considerada como um marcador de proliferação celular e sua expressão está associada com a agressividade do CaP. Assim, para saber se havia correlação entre a expressão de Topoisomerase II- α e a expressão de Wnt4, tecidos tumorais e não tumorais de próstata foram incubados com o anticorpo específico contra Topoisomerase II- α , cuja marcação detectada foi essencialmente nuclear. Amostras de amígdala foram utilizadas como controle da marcação de Topoisomerase II- α por serem tecidos que apresentam alta taxa de proliferação. Esses tecidos foram reagidos ou não com o anticorpo, como mostrado na Figura 22.

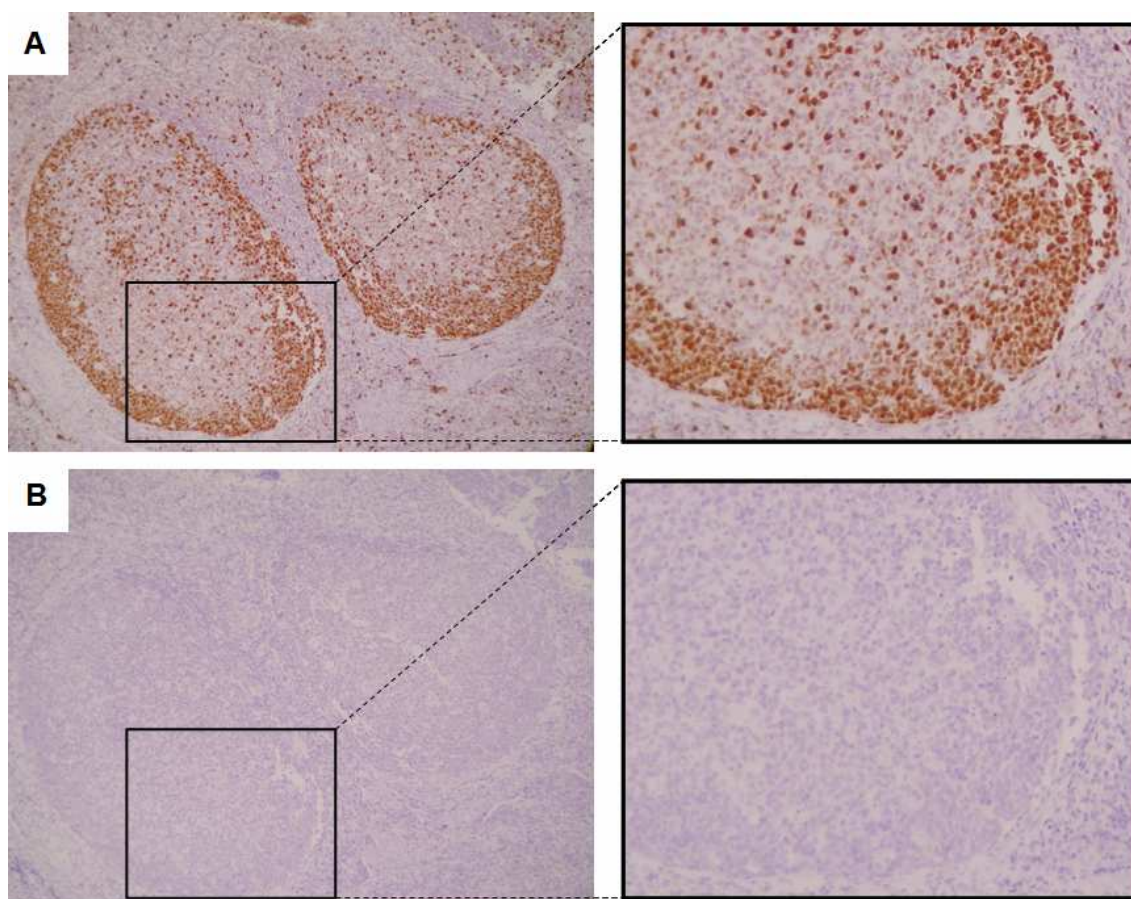


Figura 22. Seções de imunohistoquímica utilizando tecidos de amígdala como controle da marcação de Topoisomerase II- α . **A.** Tecido incubado com o anticorpo contra Topoisomerase II- α , mostrando marcação nuclear (Controle positivo) **B.** Tecido que não foi incubado com o anticorpo (Controle negativo). Magnificação original 10X.

A análise da expressão de Topoisomerase II- α revelou que 195 pacientes (165 pacientes com CaP e 30 pacientes com HPB) foram

informativos para o perfil de expressão desta proteína. De um modo geral, células prostáticas tumorais e não-tumorais analisadas nesse estudo apresentaram baixas taxas de proliferação, principalmente as células benignas, representadas pela HPB. Ao se comparar o valor mediano da intensidade de marcação entre CaP e HPB, mostrou-se que a expressão de Topoisomerase II- α foi maior em amostras neoplásicas quando comparadas com tecidos não neoplásicos. Testes estatísticos demonstraram que essa diferença foi significativa ($p < 0,001$ – Tabela 15).

Tabela 15. Expressão de Topoisomerase II- α em tecidos tumorais e não tumorais de próstata.

<i>Marcador</i>	<i>Histologia</i>	<i>n</i>	<i>Mediana</i>	<i>Min.</i>	<i>Máx.</i>
Topoisomerase	CaP	165	22,2	1,2	78
	HPB	30	3,5	0,6	20,1
$p < 0,001$					

A diferença para a mediana de marcação mostrou ser significativa ($p < 0,001$).

Ao analisar o perfil de marcação de Topoisomerase II- α entre pacientes de CaP que apresentaram ou não recidiva clínica e recorrência bioquímica, notou-se que o nível mediano de intensidade para esta proteína era maior em amostras de pacientes que apresentaram os eventos ($p= 0,168$ para recidiva clínica e $p= 0,151$ para recorrência bioquímica) (Tabela 16). Apesar dessa tendência de maior expressão de Topoisomerase II- α em tumores de pacientes que apresentaram recidiva da doença, seja ela clínica ou bioquímica, essa diferença não foi estatisticamente significativa. As medianas de intensidade de marcação também não foram significativas entre amostras de pacientes que apresentaram ou não um segundo tumor primário ($p= 0,840$ – Tabela 16).

Tabela 16. Mediana da intensidade de marcação para a proteína Topoisomerase II- α em pacientes com CaP quando classificados para ocorrência ou não de recorrência bioquímica, recidiva clínica da doença e presença de um segundo tumor primário.

Variável	Status	n	Mediana
Recorrência bioquímica	Sim	92	23,6 (2 – 78)
	Não	72	19,55 (1,2 – 65,3) ^a
Recidiva clínica	Sim	15	29,6 (16 – 78)
	Não	148	21,9 (1,2 – 74,2) ^b
Segundo tumor	Sim	17	20,5 (7 – 53,3)
	Não	141	22,2 (1,2 – 78) ^c

^a p= 0,151; ^b p= 0,168; ^c p= 0,840

Para uma melhor análise das intensidades de marcação, as amostras marcadas com Topoisomerase II- α foram divididas em categorias assim como para os outros marcadores, sendo 1- marcação ausente, 2- marcação fraca, 3- marcação de intensidade média e 4- forte marcação (Figura 23).

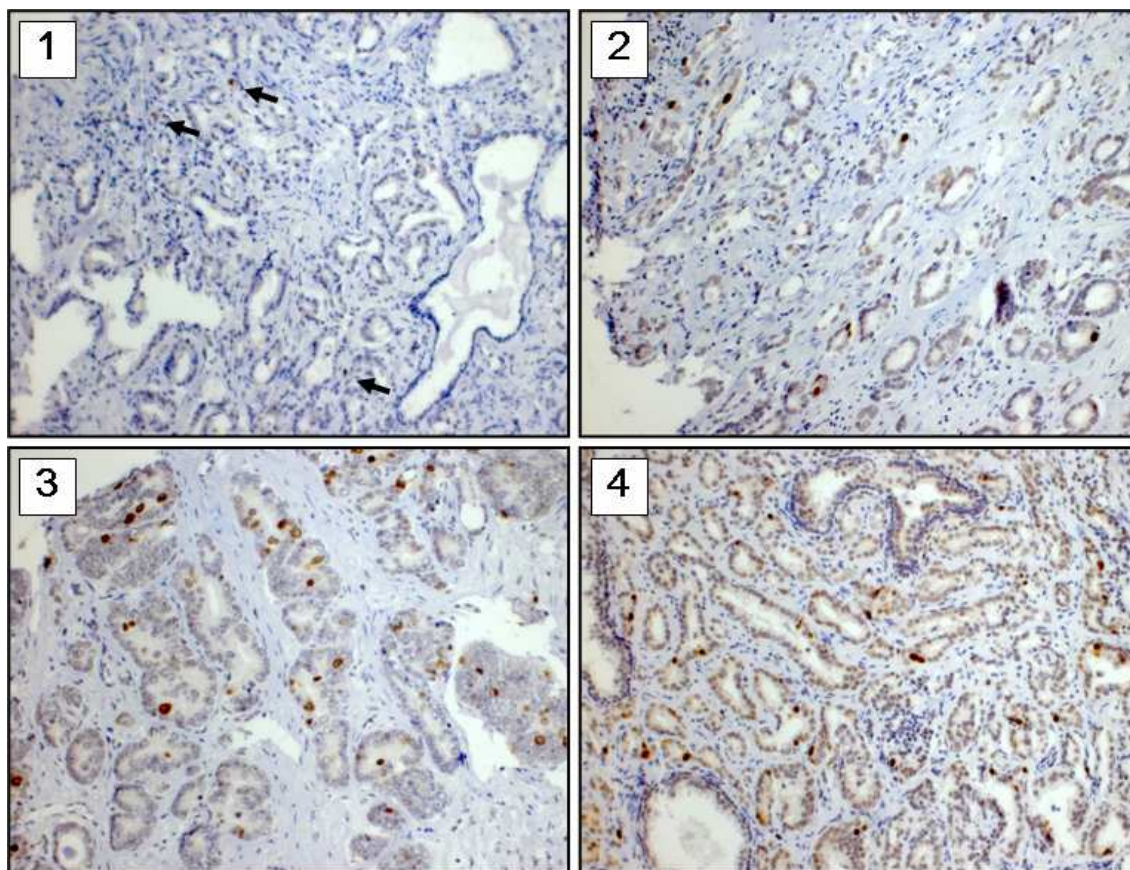


Figura 23. Grau de marcação de Topoisomerase II- α em amostras de CaP. 1- Ausência de marcação; 2- Marcação fraca; 3- Marcação moderada; 3- Marcação forte. Magnificação original 40X.

Ao analisar se os valores de intensidade de Topoisomerase II- α categorizados apresentavam correlação com o Escore de Gleason dos pacientes, observou-se freqüências semelhantes de pacientes cujas amostras expressam Topoisomerase II- α nas diferentes intensidades de marcação. Embora haja uma maior freqüência de casos com EG de 7 a 10 que apresentam marcação fraca (32%) em comparação às outras categorias de intensidade de marcação, não houve diferença estatisticamente significativa para este parâmetro analisado ($p= 0,435$ – Tabela 17).

Tabela 17. Correlação da expressão de Topoisomerase II- α em CaP com o Escore de Gleason.

Escore de Gleason	N° de casos (%)	Escore de imunoreatividade de Topoisomerase (%)			
		1	2	3	4
2 a 6	135 (84,4)	35/ 135 (25,9)	30/ 135 (22,2)	38/ 135 (28,2)	32/ 135 (23,7)
7 a 10	25 (15,6)	3/ 25 (12)	8/ 25 (32)	7/ 25 (28)	7/ 25 (28)
Total	160 (100)	38/ 160 (23,7)	38/ 160 (23,7)	45/ 160 (28,2)	39/ 160 (24,4)

Porcentagem de amostras marcadas de acordo com o escore de imunoreatividade de Topoisomerase II- α : 1- ausência de marcação; 2- marcação de intensidade fraca; 3- marcação de intensidade média; 4- marcação de intensidade forte.

* Valor de $p= 0,435$

A análise do tempo de recorrência bioquímica da doença para pacientes cujos tumores possuem níveis de intensidade de marcação diferentes para Topoisomerase II- α sugere que pacientes cujas amostras possuem marcação negativa para essa proteína possuem um tempo maior de sobrevida livre de recorrência bioquímica em comparação a pacientes cujas amostras marcam para Topoisomerase II- α , porém esses resultados não foram estatisticamente significativos ($p= 0,136$ – Figura 24).

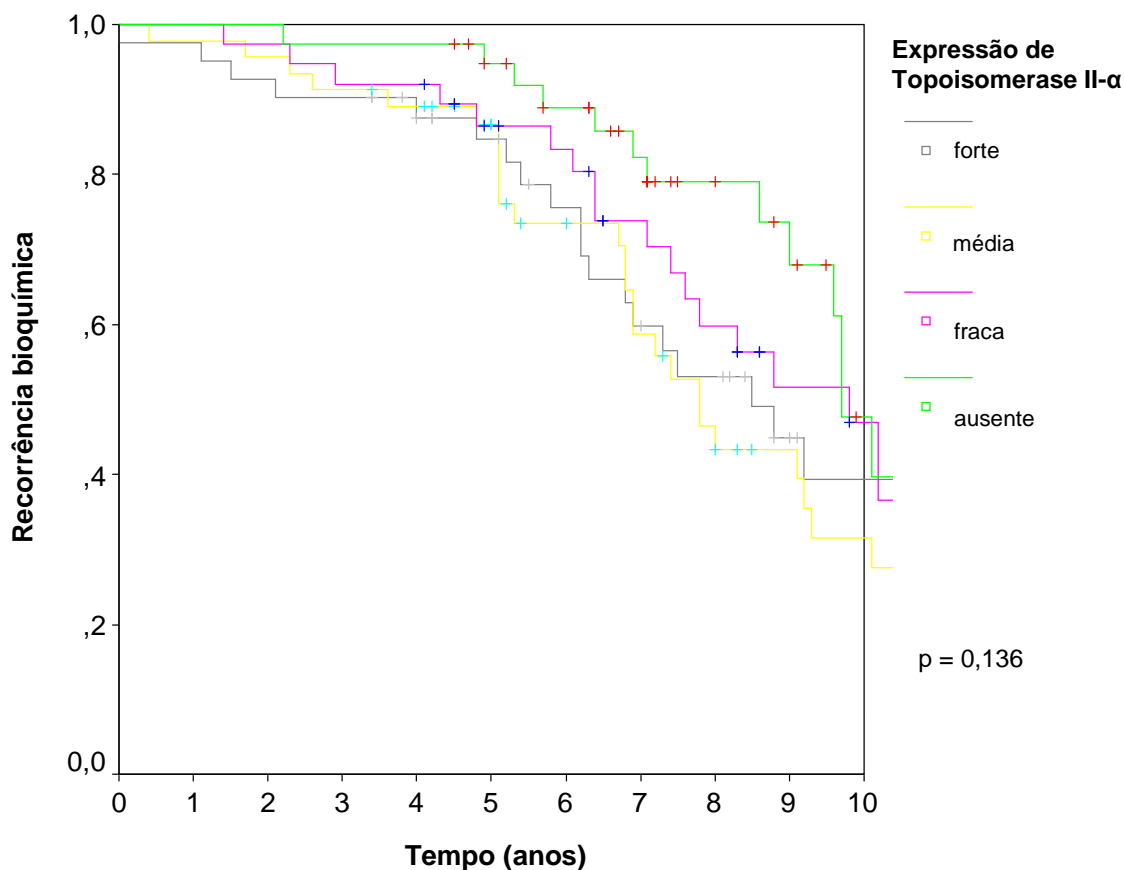


Figura 24. Sobrevida livre de recorrência bioquímica para pacientes com CaP cujos tumores apresentam diferentes níveis de marcação para Topoisomerase II- α .

4.7 Correlação entre a expressão das proteínas Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α

Visando avaliar se haveria correlação entre a expressão de Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α , foram realizados testes não-paramétricos de correlação entre os perfis de expressão destas três proteínas.

Observou-se que a correlação dos valores medianos de intensidade de Wnt4 com os valores medianos de intensidade de E-caderina para as amostras de pacientes com CaP incluídos no estudo foi considerada significativa (Kendall's tau b $p < 0,001$; $r = 0,243$), ou seja, pacientes cujos tumores possuem elevada expressão de Wnt4 também possuem elevada expressão de E-caderina (Figura 25).

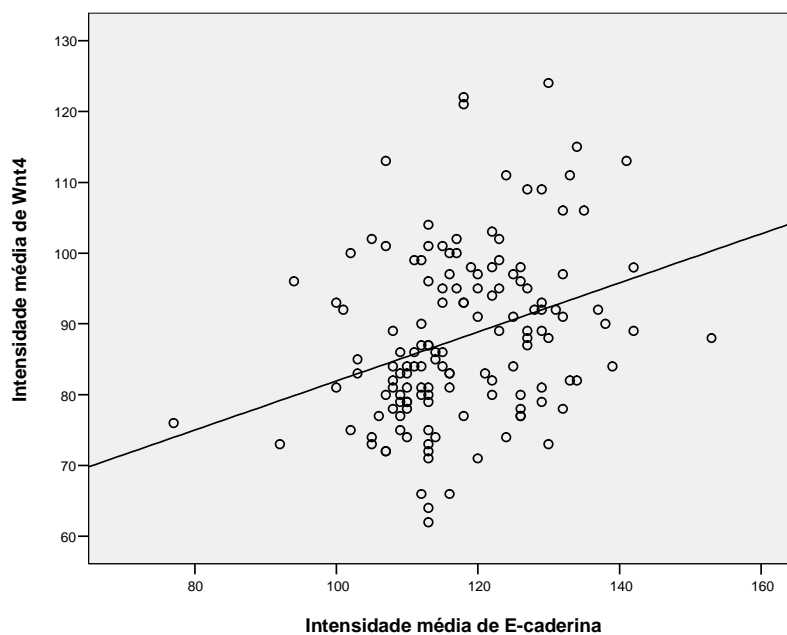


Figura 25. Associação entre os níveis médios de intensidade de expressão de Wnt4 com E-cadherina em tumores de pacientes com CaP.

O mesmo acontece para a análise de Wnt4 com Topoisomerase II- α (Kendall's tau b $p < 0,001$; $r = 0,372$ – Figura 26) e de Topoisomerase II- α com E-cadherina (Kendall's tau b $p < 0,001$; $r = 0,269$ – Figura 27). Assim, conclui-se que há correlação entre a intensidade mediana de expressão das três proteínas analisadas neste estudo.

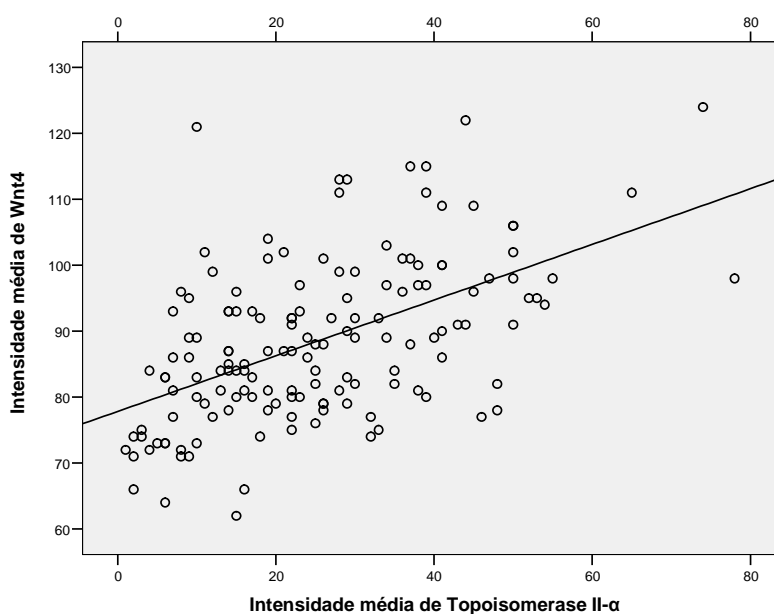


Figura 26. Associação entre os níveis médios de intensidade de expressão de Wnt4 com Topoisomerase II- α em tumores de pacientes com CaP.

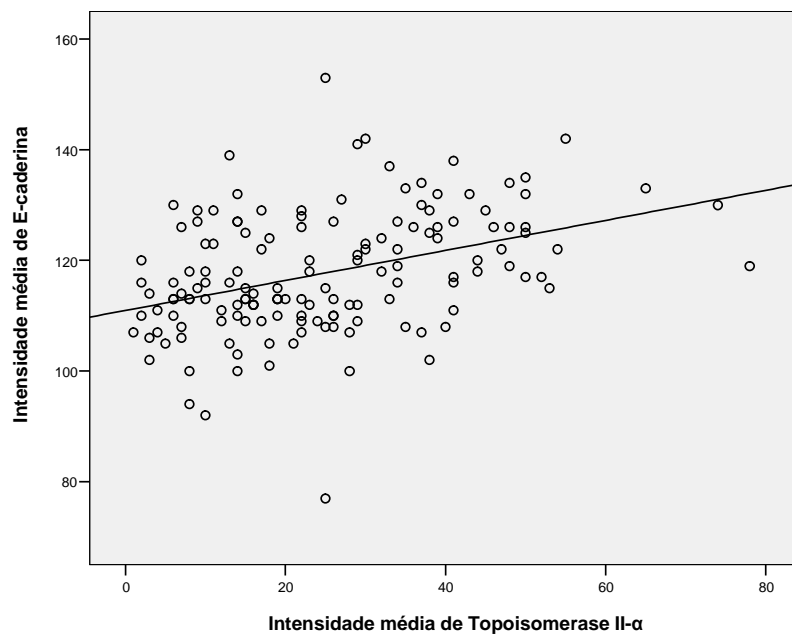


Figura 27. Associação entre os níveis médios de intensidade de expressão de Topoisomerase II- α com E-caderina em tumores de pacientes com CaP.

PARTE II

**Avaliação da proteína Wnt4 como um possível
antígeno associado ao tumor de próstata**

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos específicos

- Obter o cDNA completo de WNT4.
- Expressar e purificar a proteína recombinante Wnt4 em um sistema bacteriano de expressão
- Realizar ensaios imunológicos utilizando a proteína Wnt4 recombinante para avaliar a presença de anticorpos anti-Wnt4 no soro de pacientes com CaP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do cDNA completo de WNT4

Para obter o cDNA completo do gene WNT4, foram realizadas reações de RT-PCR utilizando-se a *Taq* DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen), 1 X do tampão de PCR, 200 μ M final de dNTPs, 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo, 1,5 μ M de $MgCl_2$ e 1 μ L de cDNA da linhagem de câncer de próstata DU145 (correspondente a 1-2 μ g de RNA total) para um volume final de 20 μ L. As reações de reamplificação foram feitas utilizando-se os mesmos reagentes nas mesmas concentrações, porém num volume final de 50 μ L com 3 μ L da reação molde diluída 1: 1000. Os oligonucleotídeos utilizados estão listados na tabela abaixo (Tabela 18).

Tabela 18. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para obtenção do cDNA completo de WNT4 por RT-PCR.

Gene	Oligonucleotídeos	Seqüência 5' – 3'
WNT4	WNT4 1FORW	ATG AGT CCC CGC TCG TGC CT
	WNT4 1REV	TCA TCG GCA CGT GTG CAA CT
	WNT4 1F BamHI	AAA AGG ATC CAT GAG TCC CCG CTC GTG CCT
	WNT4 1R Sall	AAA AGT CGA CTC ATC GGC ACG TGT GCA ACT
GAPDH	GAPDH 1F	TGA CCC CTT CAT TGA CCT CA
	GAPDH 1R	AGT CCT TCC ACG ATA CCA AA

A amplificação de WNT4 e GAPDH por RT-PCR foi obtida por um programa de ciclagem que se inicia com uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 1 minuto e 30 segundos (extensão) e finalmente uma extensão de 72°C por 10 minutos. O tamanho para o gene WNT4 completo é de 1056 pb e o produto de GAPDH tem 419 pb.

3.2 Clonagem de WNT4 e seleção das bactérias recombinantes

O cDNA completo de WNT4 foi clonado no vetor de expressão de bactérias pET SUMO (*Champion™ pET SUMO Protein Expression System* - Invitrogen) a partir de 1 µL da reação de PCR fresca contendo o produto WNT4. A reação de ligação de WNT4 com o vetor pET SUMO foi feita segundo o protocolo descrito no kit, utilizando T4 DNA Ligase, com incubação à temperatura ambiente por 30 minutos.

A transformação das bactérias competentes One Shot® Mach1™ –T1^R *E. coli* foi feita a partir de 2 µL da reação de ligação, segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 50 µg/ mL de kanamicina.

A partir das colônias crescidas nessas placas, algumas foram selecionadas para rastrear as bactérias recombinantes através da extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina. Os DNAs plasmidiais obtidos foram dosados no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop) e 2 µL desses plasmídeos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.3 Verificação da orientação da clonagem

Para verificar quais os plasmídeos que possuíam o cDNA de WNT4 clonado na orientação correta, foi realizada uma digestão com enzimas de restrição e PCR diferencial. Para a digestão com enzimas, utilizou-se 1 µL das enzimas EcoRI e PstI, 10 µL do plasmídeo, tampão de reação *NEBuffer 3* (New England BioLabs) na concentração 1X e BSA 1X, numa reação de volume final de 20 µL. As reações foram deixadas a 37°C por 18 horas e foram inativadas por 20 minutos a 80°C. Foi realizado também PCR diferencial utilizando 20 ng de cada plasmídeo, um oligonucleotídeo que anela na seqüência do plasmídeo (SUMO Forward Priming Site: AGA TTC TTG TAC GAC GGT ATT AG) e um oligonucleotídeo que anela na seqüência de WNT4 (WNT4 antisense: TCA GAG CAT CCT GAC CAC TG), numa reação de volume final de 20 µL. Para WNT4 clonado na seqüência correta, o tamanho do produto obtido na PCR é de aproximadamente 600 pb. Os resultados desses ensaios foram visualizados em gel de agarose 0,8% ou 1,5%.

3.4 Transformação de bactérias e indução da expressão de proteínas

Para a transformação das bactérias, misturou-se de 5 a 10 ng do plasmídeo contendo WNT4 ou do plasmídeo pET SUMO/CAT (controle positivo) com bactérias quimicamente competentes BL21 DE3. Esta mistura foi incubada a 4°C por 30 minutos, seguindo-se um choque térmico a 42°C por 30 segundos. Em seguida, as bactérias foram transferidas imediatamente para o gelo e rapidamente adicionou-se 250 µL de meio SOC. As células foram incubadas a 37°C sob agitação durante 1 hora. Após essa incubação, toda a reação de transformação foi colocada em 10 mL de LB contendo 50 µg/mL de kanamicina e a reação foi deixada a 37°C sob agitação por 18 a 22 horas.

Para a expressão das proteínas recombinantes, primeiramente foi realizado um experimento piloto, no qual 500 µL da cultura acima (pré-inóculo) foram inoculados em 10 mL de LB 50 µg/mL de kanamicina e 1% de glicose (opcional). Esse inóculo cresceu a 37°C sob agitação até atingir a densidade óptica (D.O.) a 600 nm de 0,4 a 0,6, verificada no espectrofotômetro GeneQuant *pro* (Amersham Biosciences). Em seguida, adicionava-se IPTG na concentração final de 1 mM para induzir a expressão de proteínas. Como controle negativo da expressão, foram utilizadas culturas sem a adição de IPTG. Todas as culturas foram induzidas por 6 horas a 37°C sob agitação e posteriormente centrifugadas à velocidade máxima para retirar o sobrenadante. As bactérias foram ressuspensas em tampão de lise (3 mM de KH_2PO_4 , 47 mM de K_2HPO_4 , 400 mM de NaCl, 100 mM de KCl, 10% de glicerol, 0,5% de Triton X-100 e 1 mM de imidazol) e sonicadas utilizando 3 ciclos de 30 segundos no gelo com intervalos de 1 minuto. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto na velocidade máxima a 4°C. O sobrenadante contém as proteínas solúveis, enquanto o precipitado contém as proteínas insolúveis.

Para a expressão da proteína WNT4 recombinante em larga escala, 500 µL do pré-inóculo foram adicionados a 25 mL de LB 50 µg/mL de kanamicina sem a adição de glicose. O protocolo foi seguido como descrito acima e a indução foi feita com a adição de IPTG a 1 mM por 4 horas e o precipitado de bactérias foi guardado a -80°C para posterior purificação da proteína recombinante.

3.5 Purificação da proteína recombinante

A purificação da proteína recombinante Wnt4 foi realizada utilizando colunas de afinidade por níquel, seguindo instruções do manual do kit *Ni-NTA Spin Handbook* (Qiagen). Nesta coluna, íons de níquel estão ligados a uma matriz de ácido nitrilotriacético (NTA), a qual ocupa quatro dos seis sítios de ligação da esfera de níquel, deixando livres dois sítios para a interação com a cauda de histidinas. Pelo fato dessa interação das histidinas com o níquel e sua matriz ser independente de conformação, a purificação da proteína pode ser realizada tanto sob condições nativas quanto sob condições desnaturantes. Assim, para a purificação de Wnt4 foram testados dois protocolos de purificação, sendo que um utiliza condições nativas e o outro condições desnaturantes da proteína.

Na purificação sob condições nativas, as bactérias foram lisadas em 1 mL de tampão de lise (50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, pH 8.0) e lisozima a 1 mg/ mL. Após incubação no gelo por 30 minutos, as células foram sonicadas no gelo 6 vezes de 10 segundos cada com 5 segundos de intervalo. Os lisados foram centrifugados a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi passado por 3 minutos a 2000 rpm e 4°C numa coluna Ni-NTA pré-equilibrada. Lavou-se duas vezes a coluna com tampão de lavagem (50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl, 20 mM de imidazol, pH 8.0). A proteína foi eluída em 100 μL de tampão de eluição (50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl, 300 mM de imidazol, pH 8.0) por 2 vezes e posteriormente em 100 mM de EDTA.

Na purificação da proteína sob condições desnaturantes, as bactérias foram lisadas em 1 mL de tampão B (8 M de uréia; 0,1 M de NaH_2PO_4 ; 0,01 M de Tris-Cl; pH 8.0) e incubadas sob agitação 1 hora à temperatura ambiente. O lisado foi centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi passado por 2 minutos a 2000 rpm numa coluna Ni-NTA previamente equilibrada. Lavou-se duas vezes a coluna com o tampão C (8 M de uréia; 0,1 M de NaH_2PO_4 ; 0,01 M de Tris-Cl; pH 6.3). A proteína foi eluída com 100 μL de tampão E (8 M de uréia; 0,1 M de NaH_2PO_4 ; 0,01 M de Tris-Cl; pH 4.0) por 2 vezes e em seguida com 100 mM de EDTA.

3.6 Imunoblot

Os ensaios de imunoblot foram realizados segundo o manual *Molecular Cloning – A Laboratory Manual* e o sistema utilizado foi o *mini-PROTEAN 3* (Bio-Rad). As amostras de proteínas foram fervidas a 100°C por 5 minutos e resolvidas em gel de poliacrilamida SDS/PAGE 12% por aproximadamente 1 hora a 140 Volts. Em seguida, foi feita a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose por 1 hora a 100 Volts, em tampão de transferência (0,3% de Tris-HCl, 1,4% de glicina e 20% de metanol). Após a transferência das proteínas, a membrana foi corada com uma solução de Vermelho de Ponceau (0,2% de Vermelho de Ponceau e 3% de ácido tricloroacético), para visualização da eficiência de transferência do extrato de proteínas. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em solução 5% de leite desnatado em tampão PBS-T (0,05% de Tween 20 em PBS 1X). Seguiu-se a incubação com os anticorpos primários anti-histidina (Amershan Biosciences) diluído 1: 5000 e policlonal anti-Wnt4 C-14 (Santa Cruz) diluído 1: 200 por uma ou duas horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 5 minutos com PBS-T sob agitação, a membrana foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente com os anticorpos secundários anti-camundongo (PIERCE) e anti-cabra (KPL), ambos conjugados à peroxidase e diluídos 1: 2500. Após novas lavagens com PBS-T, a interação antígeno-anticorpo foi visualizada através da revelação das reações com o kit *ECL Western Blotting Detection Reagents* (Amershan Biosciences) seguido de exposição da membrana a filmes sensíveis à quimioluminescência (*KODAK BioMax Light Film* – Sigma Aldrich).

Nas incubações feitas com os soros dos pacientes, foi utilizada uma mistura (*pool*) de três soros de pacientes com CaP e uma mistura de três soros de doadores sem a neoplasia (Tabela 19). O sangue de cada indivíduo foi coletado em tubo sem a presença de anti-coagulante e os soros foram estocados em glicerol na proporção 1:1 a -80°C. Os soros utilizados nos ensaios de imunoblot foram previamente adsorvidos para anticorpos anti-proteínas de *E. coli*, incubando-se em igual proporção os soros dos pacientes com extratos protéicos totais da bactéria *E. coli* por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação. Os soros foram diluídos 1: 200 e o anticorpo

secundário utilizado foi o anti-IgG humano (Amersham Biosciences) diluído 1:4000.

Tabela 19. Características dos pacientes com CaP e dos indivíduos sadios, cujos soros foram utilizados nos ensaios imunológicos contra a proteína Wnt4.

Soros utilizados	Média Idade (anos)	Escore de Gleason	PSA pré-operatório (ng/mL)
Pacientes com CaP	65,3	4 (2+2)	8,5
		5 (3+2)	7,1
		8 (3+5)	11,21
Doadores normais	24	----	----

4 RESULTADOS

4.1 Expressão do cDNA completo de WNT4

O cDNA completo de WNT4 foi obtido por RT-PCR através de reamplificação (Figura 28A). A reação de RT-PCR que serviu de molde é mostrada na Figura 28B. Os oligonucleotídeos utilizados nessa reação molde amplificam toda a região codificante de WNT4, sendo que nas extremidades do transcrito há seqüências adaptadoras para as enzimas de restrição BamHI e Sall. Durante a reamplificação, essas seqüências deixam de existir, visto que os oligonucleotídeos 1FORW e 1REV amplificam somente a região codificante do gene WNT4 (Figura 29).

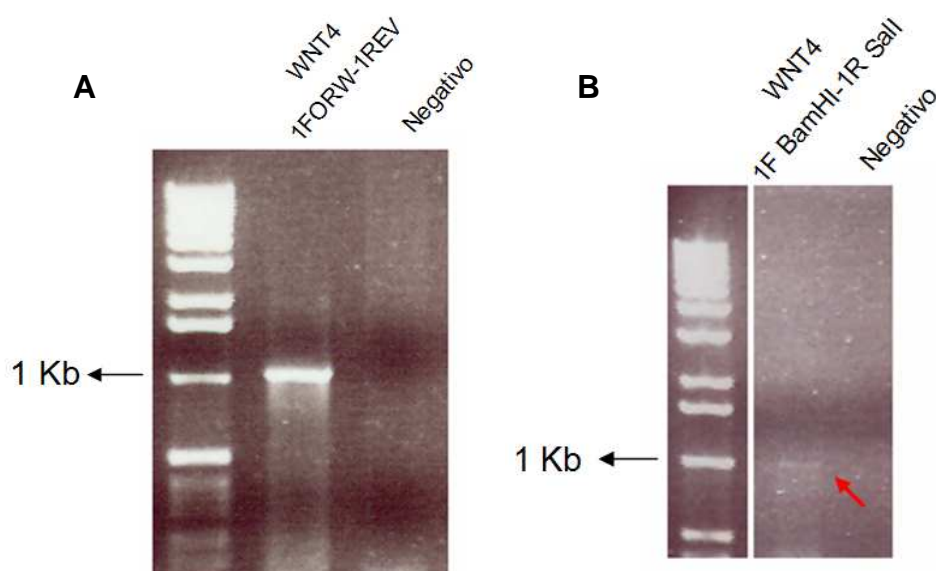


Figura 28. Amplificação do cDNA completo do gene WNT4 (1056 pb) mostrada em gel de agarose. **(A)** Reação de RT-PCR que serviu de molde para a obtenção do transcrito completo de WNT4. **(B)** Reamplificação de WNT4 utilizando 3 μ L da reação mostrada em A diluída 1:1000.

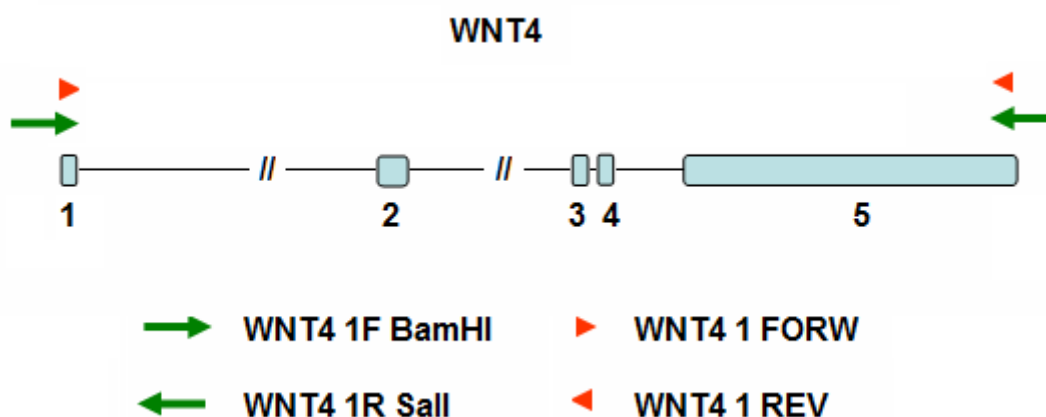


Figura 29. Esquema representativo do cDNA completo de WNT4. A região codificante do gene WNT4 é formada por cinco éxons e os oligonucleotídeos utilizados para amplificá-la são mostrados na figura como setas verdes e cabeças de setas vermelhas (oligonucleotídeos utilizados na reamplificação).

4.2 Clonagem de WNT4 no vetor pET SUMO

Após a amplificação do cDNA completo do gene WNT4, o mesmo foi clonado no vetor de expressão pET SUMO (Figura 30) com a finalidade de obter a proteína recombinante. A clonagem no vetor pET SUMO foi realizada utilizando-se diretamente a reação de RT-PCR contendo o produto de amplificação do gene WNT4.

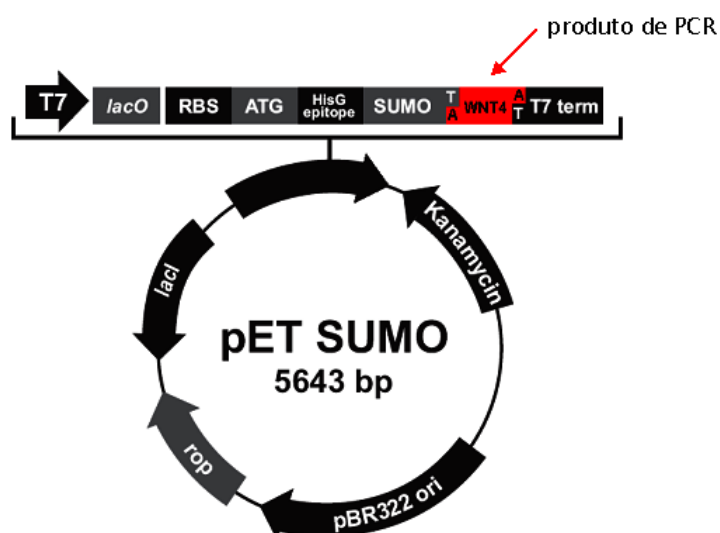


Figura 30. Mapa do vetor de expressão pET SUMO. A região em vermelho mostra o local onde o cDNA completo do gene WNT4 foi clonado. Uma característica desse vetor é que a proteína recombinante produzida é fusionada à proteína SUMO e também a uma cauda de histidinas.

4.3 Seleção das bactérias recombinantes

Das colônias transformantes com o plasmídeo contendo WNT4, dez foram selecionadas para análise do DNA plasmidial através de eletroforese em gel de agarose. Das dez colônias, três (colônias 5, 6 e 7) apresentaram uma migração atrasada no gel e foram utilizadas nas análises posteriores (Figura 31).

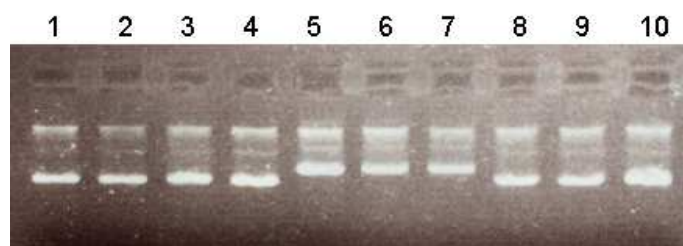


Figura 31. Seleção das colônias recombinantes através da análise do DNA plasmidial em gel de agarose. Dez colônias foram analisadas, verificando-se um tamanho maior para as colônias designadas pelos números 5, 6 e 7 (colônias possivelmente recombinantes).

Outro grupo de colônias foi rastreado e foram selecionadas cinco colônias para a análise dos plasmídeos recombinantes. Os DNAs bacterianos foram analisados em gel de agarose e verificou-se que a colônia designada pelo número 12 apresentava um tamanho maior em relação às outras quatro colônias (Figura 32).

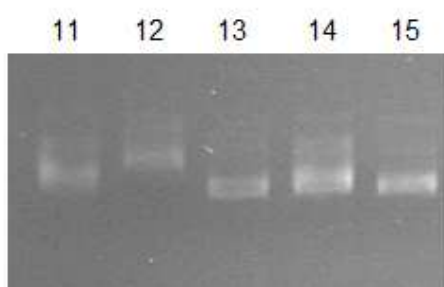


Figura 32. Seleção das colônias recombinantes através da análise da migração do DNA plasmidial em gel de agarose. Cinco colônias de uma nova transformação foram analisadas, verificando-se um tamanho maior para a colônia 12.

Além da seleção das bactérias possivelmente recombinantes, era necessário também verificar a orientação em que a seqüência WNT4 foi inserida no plasmídeo. Para isso, foram utilizados dois tipos de abordagem: a digestão diferencial com enzimas de restrição e PCR. A digestão dos

plasmídeos foi feita com as enzimas de restrição EcoRI e PstI. Se o cDNA de WNT4 estivesse clonado na orientação correta, haveria a liberação de um fragmento de 1.061 pb e um outro de 5.637 pb. Caso o fragmento tivesse sido clonado na orientação inversa, obteríamos fragmentos de tamanhos 157 pb e 6.541 pb (Figura 33).

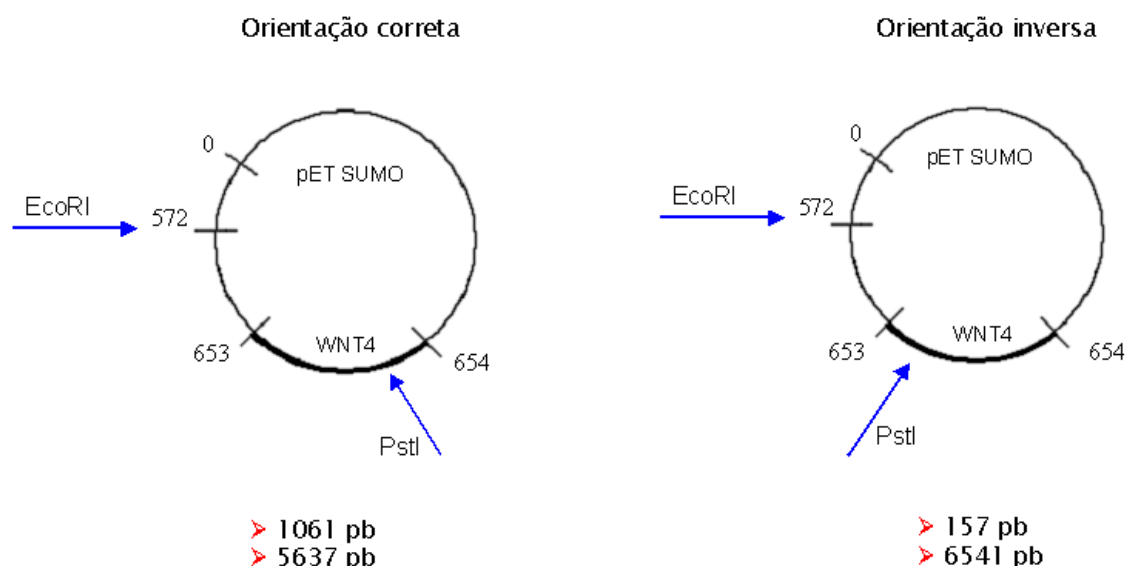


Figura 33. Esquema da digestão do plasmídeo pET SUMO + WNT4 com as enzimas de restrição EcoRI e PstI. Se WNT4 estivesse clonado na orientação correta, haveria liberação de fragmentos de 1061 e 5637 pb. Por outro lado, se este fragmento estivesse clonado na orientação inversa, haveria liberação de fragmentos de 157 e 6541 pb.

Assim, através da análise em gel de agarose do DNA plasmidial fragmentado com as enzimas de restrição citadas acima, verificou-se que a colônia 5 continha o inserto clonado na orientação inversa, enquanto as colônias 6 e 7 continham o fragmento de WNT4 clonado na orientação correta (Figura 34A). O mesmo aconteceu com a colônia 12, que possuía WNT4 clonado na orientação correta, devido à liberação de um fragmento de aproximadamente 5 kb (Figura 34B). C1, C2 e C3 na Figura 6A representam controles do funcionamento das enzimas EcoRI e PstI, onde um DNA humano foi digerido com EcoRI (C1), PstI (C2) e DNA sem digestão (C3).

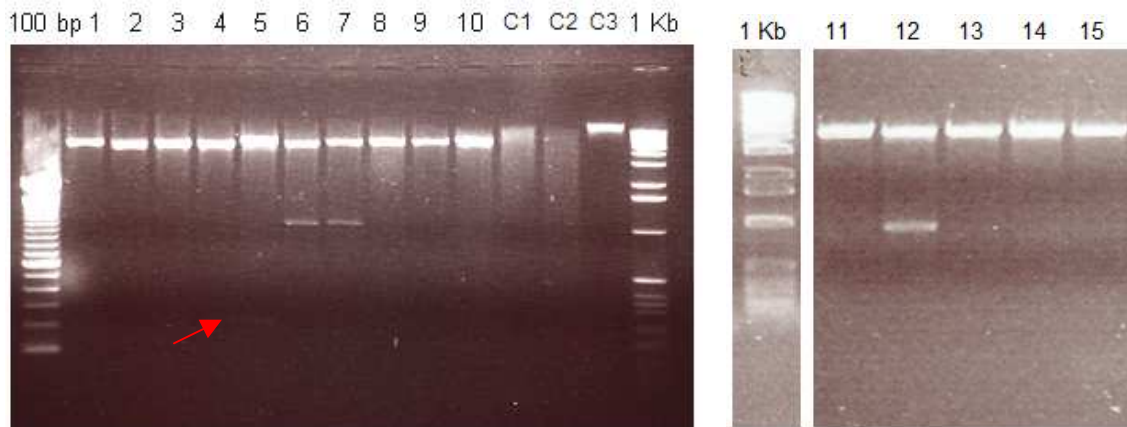


Figura 34. Gel de agarose 1,5% mostrando o perfil de migração eletroforética do DNA plasmidial de colônias transformantes após a digestão com enzimas de restrição. **(A)** A figura mostra a liberação de fragmentos de aproximadamente 1 Kb nas colônias 6 e 7, e um fragmento de 157 pb na colônia 5 (seta vermelha), indicando inserção do cDNA de WNT4 na orientação correta e inversa, respectivamente. Controles: C1 – DNA digerido com EcoRI; C2 – DNA digerido com PstI; C3 – DNA não digerido. **(B)** Liberação de um fragmento de 1 Kb na colônia 12, sugerindo que WNT4 estava clonado na orientação correta para este clone.

Outro experimento realizado para verificar a orientação do inserto clonado de WNT4 foi o ensaio de PCR, no qual foi utilizado um oligonucleotídeo que anela em uma seqüência específica do vetor (SUMO Forward Priming Site) e outro que anela em uma seqüência específica de WNT4 (WNT4 antisense) (Figura 35A). Assim, caso a orientação do inserto estivesse correta, o fragmento obtido seria de aproximadamente 600 pb, enquanto que o transcrito clonado na orientação contrária não geraria produto nenhum, visto que o oligonucleotídeo WNT4 antisense não se liga à seqüência inversa de WNT4. Para a análise por PCR, foram selecionadas as colônias 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13 e 14. Observou-se que os clones 6, 7 e 12 apresentaram uma banda de 600 pb, enquanto os clones 4, 5, 11, 13 e 14 não apresentaram amplificação de fragmento de PCR contendo este tamanho (Figura 35B).

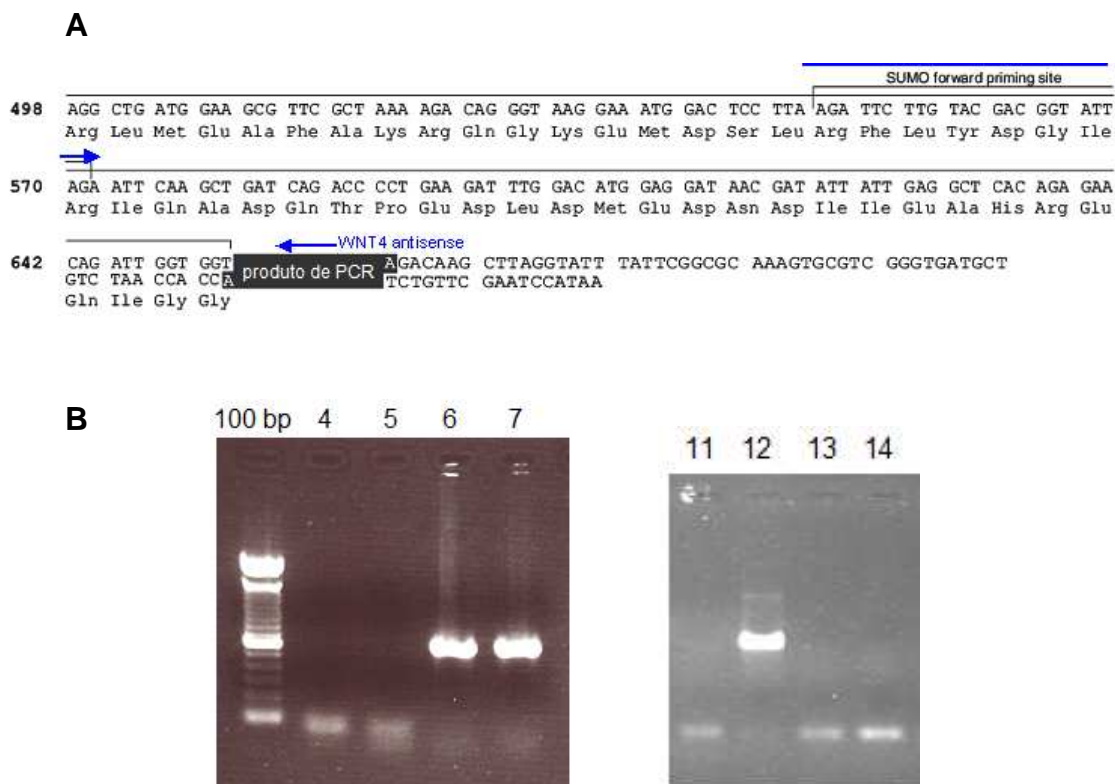


Figura 35. PCR realizado para verificar a orientação de clonagem do cDNA de WNT4. **(A)** Esquema mostrando parte do mapa do vetor pET SUMO e o local de anelamento dos oligonucleotídeos (em azul) utilizados na reação de PCR. **(B)** Gel de agarose 1,5% mostrando a amplificação de fragmentos de aproximadamente 600 pb nas colônias 6, 7 e 12, indicando que nesses clones transformantes o cDNA de WNT4 foi clonado na orientação correta.

Reunindo as informações dos três experimentos realizados (migração dos plasmídeos em gel de agarose, perfil diferencial de digestão com enzimas de restrição e PCR), conclui-se que os clones 5, 6, 7 e 12 correspondiam a clones recombinantes contendo o gene WNT4. No entanto, o clone 5 apresenta WNT4 na orientação inversa e, portanto, não geraria a proteína recombinante de interesse. Assim, para os ensaios de expressão de proteína foram selecionados apenas os clones 6, 7 e 12.

4.4 Expressão da proteína Wnt4 recombinante

De acordo com as características do vetor pET SUMO (Figura 30), a proteína recombinante obtida é fusionada a uma cauda de histidinas e também à proteína SUMO (*small ubiquitin-like modifier*), a qual apresenta peso

molecular de 11 KDa. Para expressar a proteína recombinante Wnt4, bactérias BL21 foram transformadas com o vetor pET SUMO contendo a seqüência de cDNA de WNT4 clonada na orientação correta (clones 6, 7 e 12).

Inicialmente, induzimos a expressão de proteínas dos clones 6, 7 e também do clone 4, que não possui WNT4 clonado. Como controle positivo da expressão de proteínas recombinantes nestas bactérias foi utilizado o plasmídeo pET SUMO/CAT, que expressa a proteína CAT, e como controle negativo da expressão, foram utilizadas culturas de bactérias cultivadas nas mesmas condições sem a adição de IPTG. Após a lise das bactérias e o processamento das amostras solúveis e insolúveis do lisado celular, ensaios de imunoblot foram realizados utilizando anticorpo específico contra a cauda de histidinas. Neste ensaio, foi possível detectar a presença da proteína recombinante Wnt4 nos clones 6 e 7, tanto na fração solúvel quanto na insolúvel. O tamanho esperado para a proteína recombinante é de aproximadamente 52 KDa, correspondente a 39 KDa da proteína Wnt4 propriamente dita e um acréscimo de 13 KDa correspondentes à proteína SUMO junto com a cauda de histidinas. Nas amostras induzidas com o vetor pET SUMO/CAT, foi encontrada uma proteína de 39 KDa correspondente à proteína recombinante CAT e nas amostras contendo o clone 4 identificou-se apenas uma banda em torno de 25 KDa, mas que não corresponde à proteína Wnt4 recombinante (Figura 36).

Com isso, demonstrou-se que a proteína recombinante Wnt4 estava presente tanto em frações solúveis quanto em frações insolúveis do extrato protéico total de bactérias.

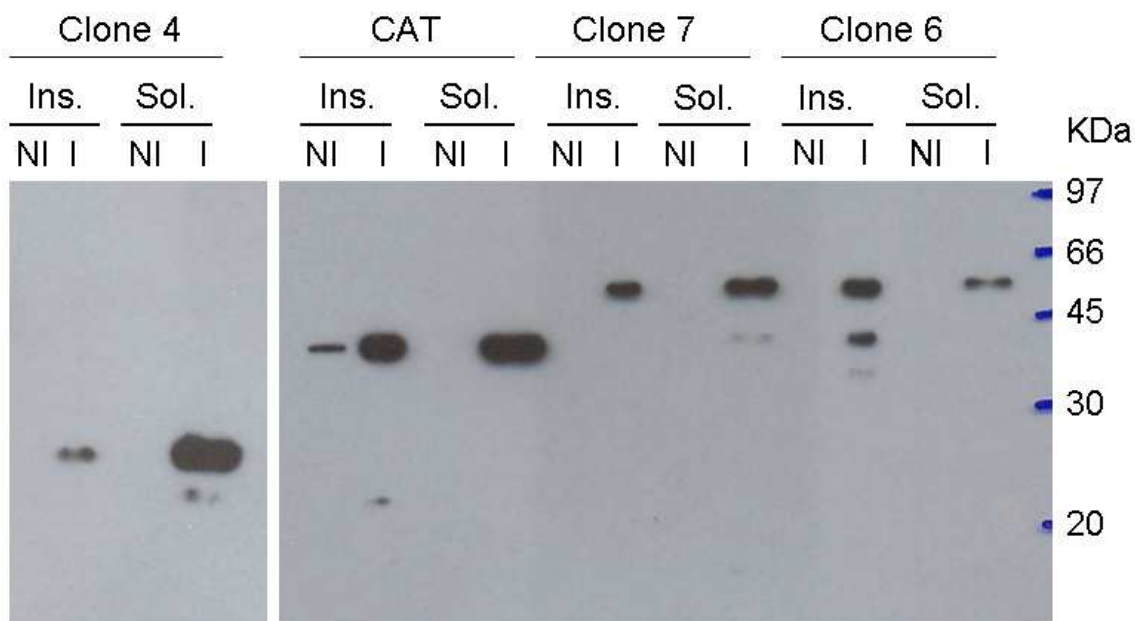


Figura 36. Experimento piloto de expressão da proteína recombinante Wnt4 a partir dos clones 6 e 7 (que possuem Wnt4 clonado na orientação correta), CAT (controle positivo de expressão) e clone 4 (que não possui Wnt4 clonado). Neste imunoblot utilizando anticorpo anti-histidinas, foi possível observar a presença de bandas correspondentes a Wnt4 recombinante (52 KDa) nas amostras induzidas dos clones 6 e 7, diferentemente do clone 4 que apresentou uma banda de aproximadamente 25 KDa. A proteína CAT recombinante possui 39 KDa.

4.5 Purificação da proteína recombinante

Uma vez estabelecida a indução da expressão da proteína recombinante Wnt4, tornava-se necessária a sua purificação para que a proteína pudesse ser utilizada nos ensaios para identificação dos anticorpos anti-Wnt4 no soro de pacientes com CaP.

Para isso, a expressão da proteína Wnt4, proveniente do clone 6, foi induzida em larga escala. Após a lise das bactérias, a proteína recombinante Wnt4 fusionada à SUMO e à cauda de histidinas foi purificada utilizando-se uma coluna de afinidade por níquel (coluna Ni-NTA). Os ensaios de purificação foram testados em condições nativas e em condições desnaturantes da proteína.

Sob condições nativas, a proteína recombinante foi eluída da coluna de níquel com um tampão de elevada concentração de imidazol (300 mM de imidazol) e também com EDTA. As frações protéicas eluídas de cada passo da purificação sob condições nativas são mostradas na Figura 37. Essas frações foram coradas com Comassie Blue em gel de poliacrilamida e também detectadas por imunoblot utilizando o anticorpo anti-histidinas. Pelo ensaio de

imunoblot foi possível detectar uma proteína do tamanho esperado apenas na fração do lisado total de bactérias, ou seja, não foi possível purificar a proteína Wnt4 sob condições nativas.

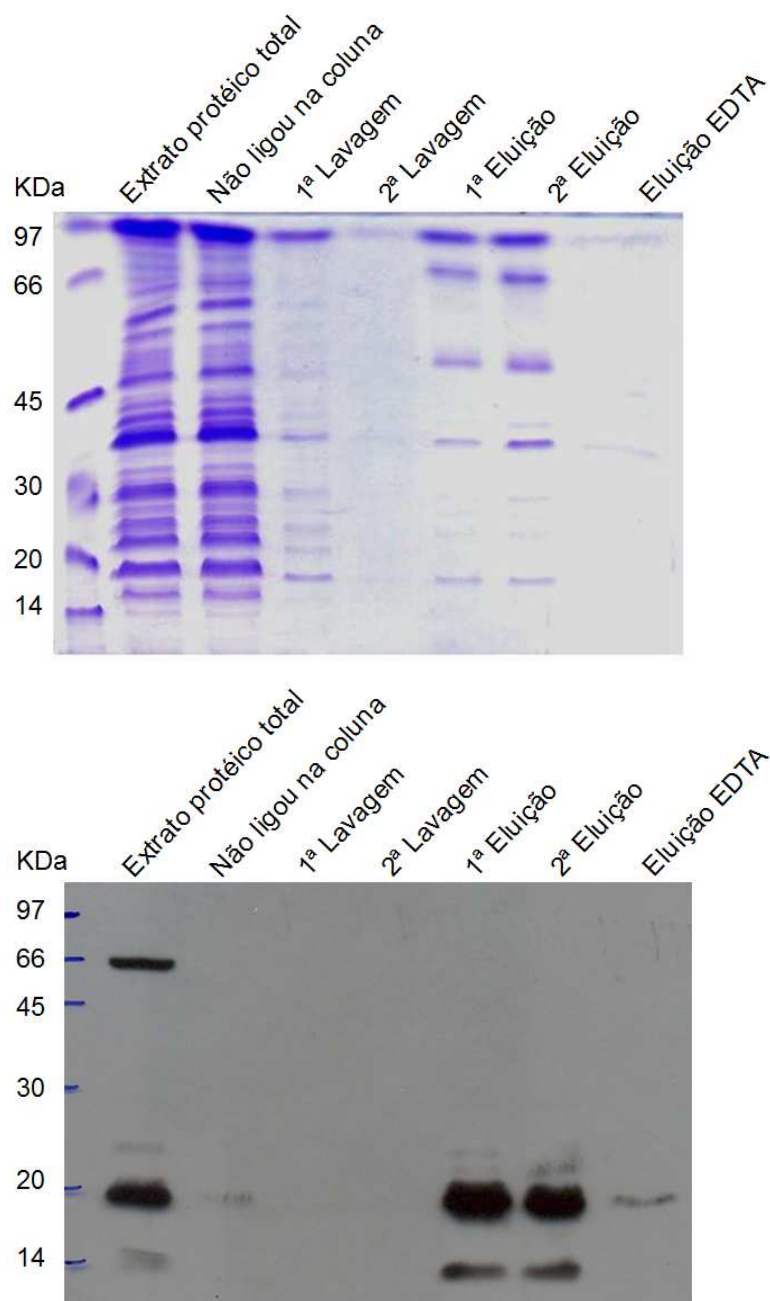


Figura 37. Purificação da proteína recombinante Wnt4 sob condições nativas. Gel de poliacrilamida corado com Comassie Blue e imunoblot com anticorpo anti-histidinas mostram as diferentes etapas da purificação. Não houve banda relativa a Wnt4 nas eluições, indicando ausência de purificação da proteína.

Sob condições desnaturantes, a proteína foi eluída em tampão de baixo pH (pH 4.0) e também em EDTA. Os passos dessa purificação também são

mostrados em gel de poliacrilamida corado com Comassie Blue e por imunoblot com anticorpo anti-histidinas (Figura 38). Pelo ensaio de imunoblot detectou-se a proteína Wnt4 recombinante na fração do lisado total, na fração de proteínas que não se ligaram à coluna, na primeira lavagem e na eluição com EDTA. Portanto, a proteína Wnt4 purificada foi detectada somente na fração eluída com EDTA e, mesmo assim, essa purificação alcançou um baixo rendimento.

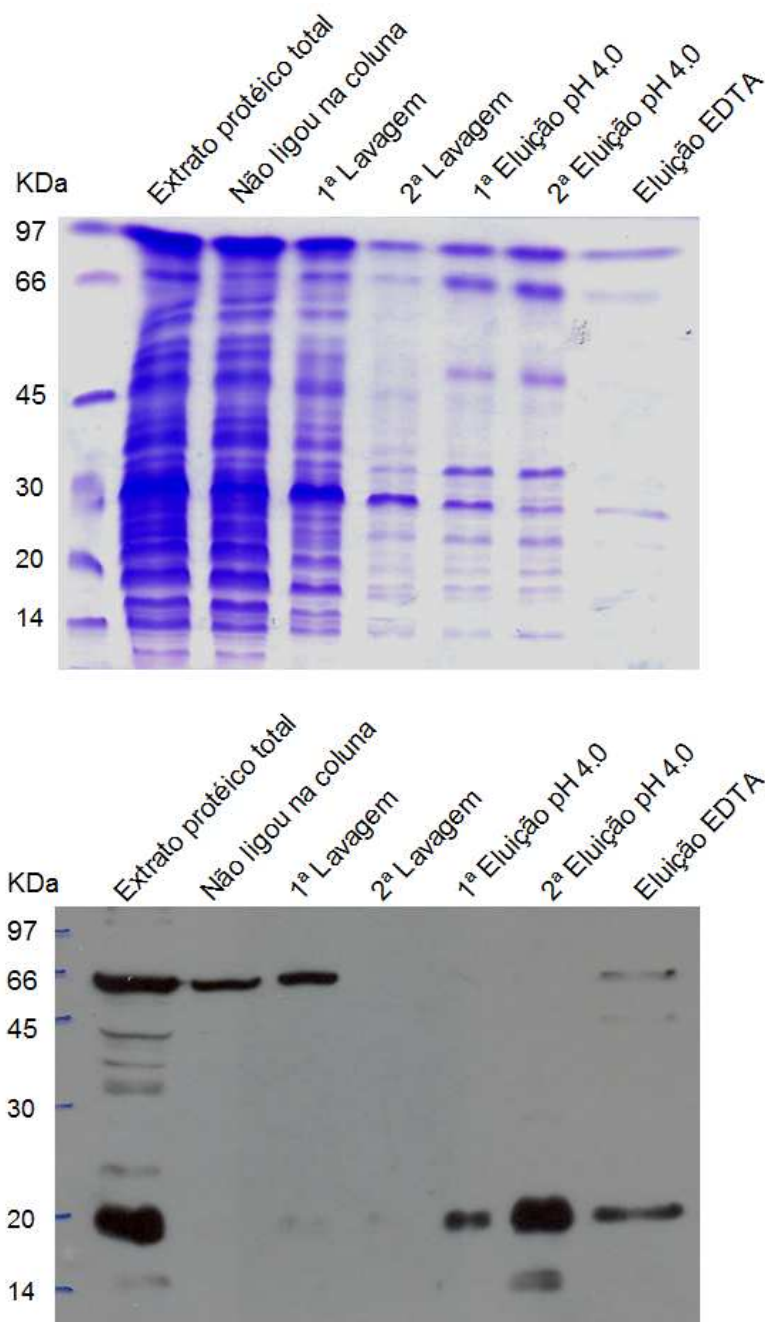


Figura 38. Purificação da proteína recombinante Wnt4 sob condições desnaturantes. Gel de poliacrilamida corado com Comassie Blue e imunoblot com anticorpo anti-histidinas mostram as diferentes etapas da purificação, revelando uma banda relativa a Wnt4 na eluição com EDTA, indicando que nessa condição foi possível obtê-la na forma purificada.

A partir daí, o experimento foi repetido para tentar obter uma maior quantidade da proteína purificada. Assim, uma nova purificação sob condições desnaturantes foi realizada utilizando os clones 6, 7 e 12. Nessa purificação, foi possível detectar a proteína recombinante Wnt4 na fração de proteínas que não se ligaram à coluna, na eluição utilizando tampão de pH 4.0 e na fração eluída com EDTA. Embora detectada, a proteína eluída apresentava-se bastante degradada (Figura 39). As proteínas obtidas na eluição com pH 4.0 e com EDTA também foram incubadas com o anticorpo anti-Wnt4 num ensaio de imunoblot. Esse ensaio confirmou que a proteína purificada correspondia de fato à proteína Wnt4 recombinante (Figura 40).

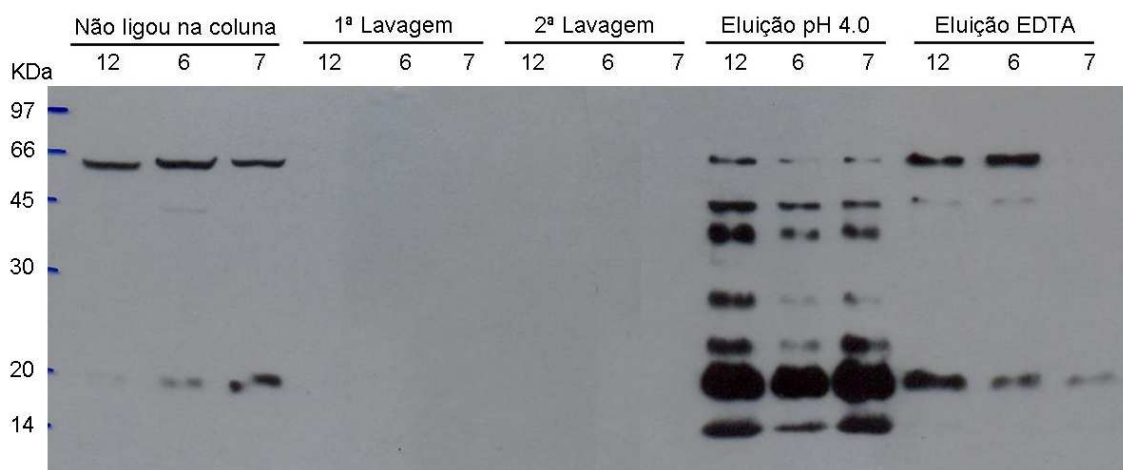


Figura 39. Imunoblot com anticorpo anti-histidinas mostrando algumas etapas da purificação da proteína recombinante Wnt4 sob condições desnaturantes, realizada a partir dos clones 12, 6 e 7. Foi possível obter a proteína purificada na eluição com solução de baixo pH e com EDTA, embora a proteína apresente produtos de degradação.

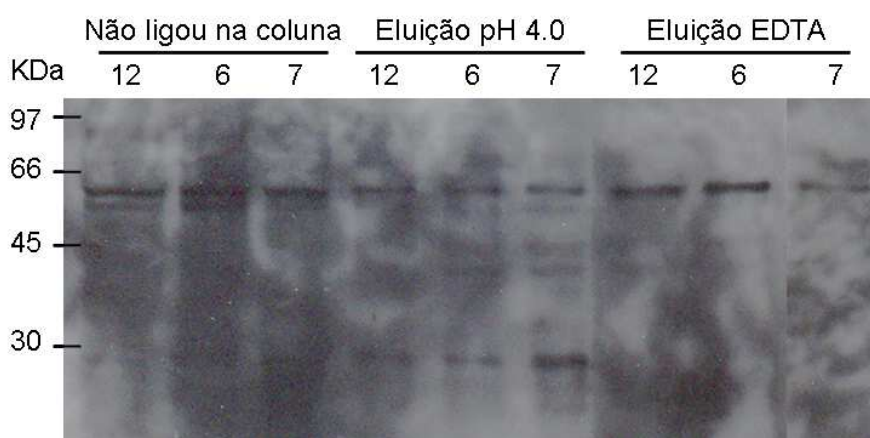


Figura 40. Imunoblot realizado para algumas etapas da purificação da proteína Wnt4 sob condições desnaturantes (purificação mostrada na Figura 39) utilizando anticorpo contra Wnt4. Esse ensaio confirma que a proteína purificada correspondia de fato à proteína Wnt4 recombinante (52 kDa).

4.6 Ensaios imunológicos com soros de pacientes com CaP

O objetivo de obter a proteína recombinante Wnt4 purificada era utilizá-la em ensaios imunológicos para verificar se os pacientes com CaP possuem autoanticorpos que reconheçam essa proteína.

Tendo obtido a proteína recombinante Wnt4 purificada, ensaios de imunoblot foram realizados utilizando-se um “pool” de soros de pacientes com CaP, um pool de soros de doadores normais e também o anticorpo contra a cauda de histidinas. Para esses ensaios, utilizou-se a proteína Wnt4 eluída com EDTA obtida da purificação sob condições desnaturantes dos clones 6 e 12. Este experimento mostrou que houve reação do soro de pacientes com CaP contra a proteína recombinante Wnt4 e que a mesma não foi reconhecida pelo soro dos doadores normais (Figura 41). Logo, estes resultados sugerem que em pacientes com CaP, a proteína Wnt4 foi capaz de induzir a produção de autoanticorpos contra esta proteína e que possivelmente esta resposta imune é ausente em indivíduos sadios. O ensaio utilizando a proteína Wnt4 obtida da eluição com tampão de pH baixo gerou resultados inconclusivos, pois houve o reconhecimento apenas de uma banda de tamanho não correspondente a 52 kDa.

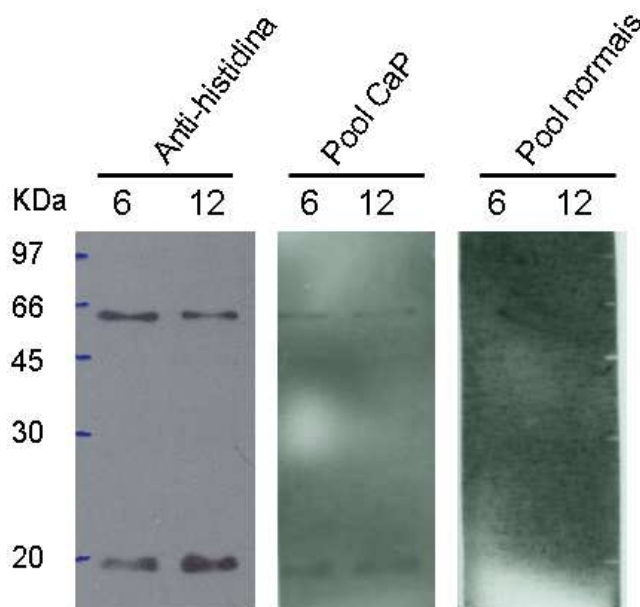


Figura 41. Imunoblot mostrando a reatividade da proteína Wnt4 purificada de dois clones independentes (6 e 12) contra o anticorpo anti-histidinas e contra uma mistura do soro de pacientes com CaP e uma mistura do soro de doadores normais. Observa-se que o soro de pacientes com CaP reconhece a proteína Wnt4 (52 kDa) obtida da eluição com EDTA, enquanto o soro dos doadores sem a neoplasia não reconhece a proteína.

5 DISCUSSÃO

A ativação aberrante da via de sinalização de Wnt tem sido freqüentemente associada ao desenvolvimento e progressão do câncer, inclusive do CaP (Chesire DR & Isaacs WB, 2003). Essa sinalização aberrante é promovida por mutações ou mudanças de expressão de diversos componentes que participam da via, as quais resultam na ativação inapropriada de genes alvos (Polakis P, 2007). Estudos de análise de expressão gênica em próstata para os membros da família Wnt mostram que muitos deles possuem uma expressão aumentada em CaP em relação a tecidos não tumorais, e que essa superexpressão estaria envolvida em mecanismos que desencadeiam a tumorigênese na próstata (Verras M & Sun Z, 2006). Poucos estudos foram realizados para o membro Wnt4 e os dados existentes sobre seu perfil de expressão ainda permanecem controversos na literatura. Por um lado, há estudos relatando uma maior expressão do cDNA de WNT4 em amostras de CaP de alto EG quando comparadas com amostras de baixo EG (Reis EM *et. al.*, 2004). Por outro lado, há estudos mostrando que parece não haver diferenças na expressão de mRNA de WNT4 entre amostras tumorais e amostras normais de próstata, assim como entre amostras metastáticas e tumores primários (Hall CL *et. al.*, 2005). Devido ao fato da superexpressão de alguns membros da família Wnt estar associada com a tumorigênese e em função da discrepância dos resultados disponíveis sobre o perfil de expressão de Wnt4 em CaP, o estudo de sua expressão torna-se um importante passo para elucidar seu possível papel na oncogênese e progressão do CaP. Além disso, há poucas publicações disponíveis relatando a expressão de Wnt4 em termos protéicos. De acordo com o nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho a descrever o perfil de expressão da proteína Wnt4 em tecidos prostáticos.

Assim, dada a relevância da via de sinalização de Wnt na tumorigênese, entender o perfil de expressão dos diferentes membros dessa família também é de grande importância para a identificação de possíveis alvos moleculares para diagnóstico, prognóstico e tratamento do CaP, assim como a caracterização de novos potenciais antígenos associados a tumor. Baseados neste racional, analisamos no presente trabalho o perfil de expressão da proteína Wnt4 em

amostras tumorais e não tumorais hiperplásicas de próstata e também a potencialidade desta proteína constituir um antígeno tumoral nesta neoplasia.

Como passo inicial para a caracterização do perfil de expressão da proteína Wnt4 em tecidos de CaP, avaliamos a expressão desta proteína em extratos protéicos totais de tumores de pacientes com CaP através de ensaios de imunoblot. Em todas as amostras de CaP testadas identificamos uma proteína reconhecida pelo anticorpo anti-Wnt4, cujo peso molecular (aproximadamente 50 kDa) encontra-se acima daquele predito pelo tamanho do cDNA completo para o gene WNT4. Smolich *et. al.* (1993) demonstraram que o peso molecular predito para a proteína Wnt4 *in vivo* ou em sua forma secretada é maior em relação a seu peso molecular deduzido pela seqüência de aminoácidos. É possível que a proteína Wnt4 sofra modificações após sua tradução, o que poderia promover este aumento do peso molecular observado no ensaio de imunoblot realizado. Sabe-se que as proteínas da família Wnt sofrem modificações pós-tradução essenciais para sua função, como a glicosilação, fosforilação e palmitolação, e que uma série de membros da família dos ligantes de Wnt apresenta aumento do peso molecular em função destas modificações (Komekado H *et. al.*, 2007; Kurayoshi M *et. al.*, 2007; Willert K *et. al.*, 2003).

Baseados nesses dados de que tumores prostáticos expressam a proteína Wnt4, analisamos em seguida seu perfil de expressão em tecidos tumorais e não tumorais hiperplásicos (HPB) de próstata, utilizando ensaios de imunohistoquímica em um grande número de amostras na forma de um TMA. Nossos resultados mostram que em tecidos tumorais e de HPB, a marcação de Wnt4 é predominantemente citoplasmática, havendo também marcação de membrana. A localização citoplasmática da proteína Wnt4 encontrada em nosso estudo corrobora os dados de avaliação da expressão desta proteína realizados em testículos e ovários de cangurus em desenvolvimento (Yu H *et. al.*, 2006). Uma grande proporção das amostras prostáticas analisadas no presente estudo revelou uma marcação mais forte na membrana apical das células epiteliais dos ácinos prostáticos. Esse perfil de marcação está de acordo com o que se sabe até o presente momento a respeito do mecanismo de ação da proteína Wnt4, uma vez que, para exercer sua função, ela é

secretada pelas células ligando-se a receptores de membrana para ativar sua cascata de sinalização.

Com o propósito de investigar se Wnt4 poderia ser considerado um marcador específico do CaP em relação ao tecido não tumoral hiperplásico, analisamos sua expressão em tecidos de CaP e HPB e observamos que o valor de intensidade mediana de marcação para Wnt4 não foi estatisticamente diferente entre os dois grupos de amostras. Estes resultados sugerem que esta proteína não seria um marcador tecidual adequado para auxiliar na diferenciação entre o CaP e glândulas hiperplásicas. Apesar do CaP não apresentar diferença de expressão de Wnt4 em relação a HPB, não podemos afirmar, baseados nos achados deste estudo, que não existe diferença entre o perfil de expressão de Wnt4 no CaP e tecido prostático normal, tampouco entre CaP e outras anormalidades do tecido prostático, tais como AIP e NIP. A avaliação destas potenciais diferenças não foi possível em função do TMA utilizado neste estudo ter sido construído somente com tecidos provenientes de pacientes com CaP e HPB.

Avaliamos também a associação do perfil de expressão de Wnt4 com parâmetros clínicos e patológicos importantes para o diagnóstico e prognóstico do CaP, como o Escore de Gleason, os níveis de PSA pré-operatório e pós-operatório, a recorrência bioquímica, a recidiva clínica da doença e presença de um segundo tumor primário.

O Escore de Gleason é o grau de diferenciação das células tumorais prostáticas e, portanto, fornece indicações a respeito da progressão e agressividade do tumor de próstata. Os valores de PSA geralmente estão aumentados em pacientes que possuem CaP, mas, por também ser uma proteína detectada em situações não tumorais da próstata, o PSA passa a ter baixa especificidade quando utilizado como parâmetro de diagnóstico do CaP. No entanto, os valores de PSA pós-operatório são de extrema importância para monitorar a recorrência bioquímica dos pacientes, a qual é capaz de prever a doença metastática e o tempo de sobrevida dos mesmos. Contudo, na literatura discute-se a utilização de uma definição padrão para a recorrência bioquímica, dada a diversidade de critérios atualmente empregados para conceituá-la. Um estudo realizado em 2006 analisou os diversos critérios utilizados na literatura médica e propôs a utilização de uma definição padrão

para a recorrência bioquímica dos pacientes com CaP (Stephenson AJ *et. al.*, 2006). A definição de recorrência bioquímica que melhor explicou a progressão da doença metastática foi um aumento nos níveis de PSA de pelo menos 0,4 ng/mL seguido de outro aumento. Além disso, esta definição mostrou estar associada com uma probabilidade relativamente alta de progressão do PSA, terapia secundária e um rápido aumento do tempo de duplicação do PSA. Outros parâmetros importantes de prognóstico para o câncer e que foram avaliados neste estudo são a recidiva clínica da doença, caracterizada pela presença visível de tumor na loja prostática, e a presença de um segundo tumor primário, o qual corresponde à detecção de metástases e é um parâmetro que está intimamente associado à sobrevida dos pacientes. Assim, possíveis correlações entre esses parâmetros e a expressão de Wnt4 em amostras tumorais seriam de importância para a avaliação desta proteína como um potencial marcador de prognóstico para o CaP.

Neste estudo, a expressão de Wnt4 mostrou não ter correlação com o Escore de Gleason, sugerindo que Wnt4 não estaria envolvido na progressão do CaP. Dados da literatura utilizando ensaios de microarranjos de cDNA identificaram WNT4 como um dos transcritos superexpressos em amostras de alto grau de Gleason quando comparadas com amostras de baixo grau de Gleason (Reis EM *et. al.*, 2004). É possível que a não correspondência entre os dados de expressão do transcrito WNT4 e do perfil de expressão da proteína codificada por este gene possa ser explicada pela discrepância de critérios adotados para designar o grau ou Escore de Gleason entre os dois estudos. Além disto, o número de amostras teciduais de alto e baixo EG analisadas nestes dois estudos foi bastante diferente, além de serem provenientes de pacientes distintos, não havendo necessariamente uma correspondência em termos de análise do perfil de expressão de RNA e o de proteína. Por esta razão, estão em andamento estudos em colaboração com o grupo do Dr. Carlos Moreno, da Universidade de Emory (Atlanta, GA, EUA). Nesta colaboração, ensaios de TMA estão sendo realizados para a proteína Wnt4 em amostras tumorais para as quais também serão analisadas o perfil de expressão de RNA. Outra possível explicação para a diferença observada entre os dois estudos é que as diferenças de expressão em termos de RNA de WNT4 entre amostras de EG diferentes não sejam refletidas em níveis

protéicos. Uma das explicações seria que, embora as amostras de alto EG possuam maiores níveis de RNA de WNT4 em comparação às amostras de baixo EG, estes RNAs não seriam traduzidos com eficiência suficiente para resultar em maiores níveis de proteína.

Ao avaliar a correlação entre a expressão de Wnt4 e a recidiva clínica do CaP, observou-se que há uma tendência das amostras dos pacientes que apresentaram recidiva em apresentar um maior valor mediano de intensidade de marcação para Wnt4 do que as amostras daqueles que não apresentaram recorrência. Entretanto, os resultados não apresentaram significância estatística. Situação semelhante ocorreu nas análises da recorrência bioquímica, as quais revelaram um pequeno aumento, porém não significativo, do valor mediano da intensidade de marcação para Wnt4 em amostras de pacientes que apresentaram a recorrência em relação aos que não apresentaram. Por outro lado, ao comparar as diferentes intensidades de marcação de Wnt4, foi possível detectar diferença na sobrevida livre de recorrência bioquímica entre pacientes que possuem tecidos com forte marcação e pacientes que possuem amostras com marcação muito fraca ou ausente para Wnt4. Pacientes cujos tecidos de CaP marcam fortemente para Wnt4 apresentam menor tempo de recidiva bioquímica (cerca de 4 anos) quando comparados com pacientes que apresentam tecidos com marcação muito fraca ou ausente (recorrência em aproximadamente 6 anos). É provável que Wnt4, uma vez superexpresso em tumor de próstata, atue de forma indireta na progressão do CaP, controlando a expressão de genes ou proteínas relacionados à agressividade do tumor de tal forma que este mecanismo de regulação estaria promovendo progressão mais rápida do tumor em recidiva. Este resultado sugere que a forte marcação da proteína Wnt4 em amostras de CaP poderia ser um marcador que poderia auxiliar a distinguir pacientes que recidivariam mais cedo, complementando a avaliação de outros marcadores prognósticos. Neste caso, a análise do perfil de expressão da proteína Wnt4 deveria ser realizada em conjunto com outros marcadores, já que amostras de pacientes que marcam fracamente ou possuem marcação de intensidade média para Wnt4 estariam numa faixa onde não haveria resultados conclusivos sobre o tempo para ocorrer a recorrência bioquímica.

Diversos artigos mostram que tumores de próstata que se tornam invasivos e capazes de metastatizar perdem a expressão de E-caderina (Jaggi M *et. al.*, 2005; De Marzo AM *et. al.*, 1999). Com o intuito de verificar se a expressão de E-caderina nos tumores se correlacionava com a expressão de Wnt4 e se, portanto, Wnt4 poderia ser considerado um marcador de diferenciação capaz de distinguir amostras com potencial metastático, avaliamos a expressão de E-caderina no TMA em estudo. Avaliamos também o perfil de expressão da proteína Topoisomerase II- α , a qual apresenta participação importante no processo de divisão celular e, portanto, seu “status” de expressão seria um indicador do nível de proliferação celular. Para E-caderina, observamos que aproximadamente 75% das amostras de pacientes com CaP apresentam marcação mediana a forte para esta proteína e que não há diferença significativa de sua expressão entre amostras de CaP e HPB. Estes dados, em parte, estão de acordo com os dados apresentados por Rubin *et. al.* (2001), os quais demonstraram que, de um modo em geral, há uma elevada expressão de E-caderina em amostras de tecido prostático, incluindo amostras benignas (87% das amostras apresentaram expressão), amostras de NIP (80%) e de carcinoma (82%). No entanto, Rubin demonstrou diferença estatística ao considerar a expressão aberrante (marcação negativa ou marcação menor que 70% das células examinadas) de E-caderina entre amostras de CaP (18% das amostras apresentaram expressão aberrante) em relação às amostras não tumorais (13%). Já os resultados de expressão de Topoisomerase II- α demonstram que há uma grande diferença de marcação entre tecidos de CaP e tecidos de HPB. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura, os quais mostram que a expressão de Topoisomerase II- α é maior em amostras de CaP em relação a tecidos de hiperplasia (Willman JH & Holden JA, 2000).

A análise das intensidades de marcação de E-caderina e Topoisomerase II- α mostrou que não há correlação com o Escore de Gleason, com a recidiva clínica, presença de um segundo tumor e recorrência bioquímica, assim como o tempo que pacientes levam para apresentá-la. Nossos dados não estão de acordo com os dados encontrados na literatura para esses marcadores (Murphy AJ *et. al.*, 2007; Hughes C *et. al.*, 2006; Ray ME *et. al.*, 2006; Loric S *et. al.*, 2001; Willman JH & Holden JA, 2000).

Ao analisar a correlação entre os perfis de marcação de Wnt4, E-caderina e Topoisomerase II- α , os resultados mostraram que o valor mediano de intensidade para Wnt4 se correlaciona significativamente com o valor mediano de intensidade para as proteínas E-caderina e Topoisomerase II- α em amostras de CaP. Contudo, a partir destes dados gerados, não podemos inferir sobre possíveis correlações entre o perfil de marcação destas três proteínas e parâmetros de prognóstico para o CaP, uma vez que os dados encontrados neste estudo referentes ao perfil de expressão de E-caderina e de Topoisomerase II- α isolados não estão de acordo com o que se conhece da literatura. O fato do perfil de expressão de E-caderina e Topoisomerase II- α não terem apresentado correlação com os dados clínico-patológicos avaliados neste estudo poderia ser explicado pelo pequeno número amostral em cada subgrupo analisado quando os resultados foram categorizados para as intensidades de marcação destas proteínas. Uma alternativa para tentar responder a esta questão seria analisar a expressão dessas proteínas em um TMA específico de EG, por exemplo, o qual conteria um número amostral suficiente para correlacionar cada EG com os parâmetros clínicos e patológicos dos pacientes, como sugerido pelo trabalho de Kajdacsy-Balla *et. al.* (2007).

Cabe ressaltar que a técnica de TMA constitui hoje uma importante ferramenta para analisar o perfil de expressão de proteínas em câncer, o que permite identificar possíveis alvos biológicos de diagnóstico, prognóstico e tratamento para a doença. Os TMAs têm uma vantagem muito importante que consiste na utilização de uma grande quantidade de amostras numa única reação de imunohistoquímica, o que permite rapidamente identificar potenciais biomarcadores, validar sua expressão e correlacioná-la com aspectos clínicos e patológicos de interesse, incluindo o tipo de tumor, sua progressão e a resposta à terapia (McDonnell TJ *et. al.*, 2008; Karam JA *et. al.*, 2007; Ma S *et. al.*, 2007; Prowatke I *et. al.*, 2007).

Uma das grandes potencialidades da análise da imunohistoquímica em TMAs seria a identificação de proteínas superexpressas em câncer. Sabe-se que um dos principais mecanismos relacionados à quebra de tolerância imunológica é a superexpressão dos antígenos tumorais, que faz com que eles passem a ser reconhecidos pelo sistema imune. Esse reconhecimento é capaz de gerar resposta de autoanticorpos, os quais potencialmente podem servir

como repórteres da tumorigênese e eventualmente como marcadores séricos para o diagnóstico precoce do CaP. Dados da literatura mostram que anticorpos contra antígenos tumorais podem ser detectados mesmo no momento inicial do desenvolvimento do tumor (Kaur *et. al.*, 1997; Lubin *et. al.*, 1995). A identificação de autoanticorpos contra proteínas tumorais corresponde em um dos passos iniciais para a caracterização de novos potenciais antígenos tumorais.

Neste trabalho, além da caracterização do perfil de expressão da proteína Wnt4 em amostras prostáticas, esta foi avaliada como um possível antígeno associado ao tumor de próstata. Os resultados de imunoblot obtidos no nosso estudo sugerem que somente soros de pacientes com CaP apresentam anticorpos anti-Wnt4, estando estes ausentes nas amostras de soros de indivíduos saudáveis. A presença destes anticorpos anti-Wnt4 em amostras de soros de pacientes com CaP sugere que Wnt4 é capaz de induzir quebra da tolerância imunológica e desencadear uma resposta imune humoral específica em pacientes com CaP, mas não em indivíduos saudáveis.

Como mostrado nas análises de TMA, amostras de CaP não apresentaram diferença de expressão de Wnt4 em relação a HPB. Estes resultados sugerem que não existe superexpressão da proteína Wnt4 entre tecido tumoral e não tumoral hiperplásico. A partir destes dados, podemos sugerir que o mecanismo pelo qual a proteína Wnt4 desencadeia a resposta imune humoral não corresponde à superexpressão desta proteína no tecido de CaP, mas provavelmente através de outro mecanismo que levaria à quebra da tolerância imunológica. No entanto, também não podemos descartar essa hipótese de superexpressão de Wnt4 no CaP como mecanismo que levaria a formação de anticorpos anti-Wnt4 porque ainda não dispomos de dados de comparação do nível de expressão da proteína Wnt4 entre amostras de CaP e tecido prostático normal.

Com relação ao reconhecimento da proteína Wnt4 recombinante por anticorpos anti-Wnt4 presentes no “pool” de soros humanos, ainda é preciso testar se este reconhecimento seria específico para a proteína Wnt4, uma vez que é possível que anticorpos presentes nos soros humanos reconheçam a proteína SUMO presente em fusão com a proteína Wnt4 recombinante. Já foi demonstrado na literatura que as proteínas SUMO-1 e SUMO-2 são capazes

de desencadear a resposta de anticorpos em pacientes com cirrose biliar primária, caracterizada como uma doença autoimune (Janka C *et. al.*, 2005). No entanto, ainda não há nenhum relato de presença destes anticorpos em pacientes com neoplasias ou indivíduos saudáveis. Uma das estratégias para identificar se esse reconhecimento imune é específico para a proteína Wnt4 ou para a proteína SUMO seria a realização de experimentos utilizando a proteína Wnt4 não fusionada a SUMO, a qual seria retirada por meio de clivagem com protease específica. Outra estratégia seria utilizar como controle dos ensaios de imunoblot a proteína expressada e purificada a partir de um clone recombinante que contivesse somente a proteína SUMO e a cauda de histidinas, na ausência do cDNA de WNT4 clonado.

Além disso, é necessário testar um maior número de soros para avaliar se de fato os indivíduos normais não possuem anticorpos contra Wnt4 e a frequência com que pacientes com CaP apresentam anticorpos contra esta proteína. A extensão dos experimentos de avaliação da resposta imune humoral iniciada neste estudo esbarra na grande dificuldade de obtenção da proteína Wnt4 recombinante em grandes quantidades. Dados da literatura mostram que as proteínas da família Wnt são extremamente difíceis de serem purificadas e solubilizadas (Willert K *et. al.*, 2003), tal como aconteceu no processo de purificação da proteína Wnt4 recombinante utilizada em nosso estudo. A proteína Wnt4 apresenta muitos resíduos de cisteína em sua composição, os quais são altamente conservados entre os diferentes membros da família Wnt. A presença destes resíduos seria um dos fatores responsáveis pela propriedade predominantemente insolúvel desta proteína. Até o presente momento, algumas publicações descreveram a purificação de somente dois membros da família Wnt, o Wnt3a e Wnt5a (Komekado H *et. al.*, 2007; Kurayoshi M *et. al.*, 2007; Mikels AJ & Nusse R, 2006; Verras M *et. al.*, 2004), purificação esta que é baseada em diversas etapas que passam por colunas de sefarose, cromatografia de exclusão e troca catiônica em heparina, sendo que todos os passos foram realizados na presença de detergente para manter a solubilidade e a atividade da proteína (Willert K *et. al.*, 2003).

Nosso estudo consiste na primeira evidência experimental que sugere que a proteína Wnt4 é capaz de induzir resposta imune humoral em pacientes com CaP e, portanto, desencadear a formação de autoanticorpos contra esta

proteína. Além disto, consiste na primeira informação gerada na literatura a respeito da descrição do perfil de expressão da proteína Wnt4 no tumor de próstata e de um membro da família dos ligantes de Wnts como potencial antígeno associado a tumor. Embora o presente estudo tenha gerado evidências de que esta proteína não apresenta expressão diferencial de acordo com o estado de diferenciação do tumor de próstata e entre amostras de CaP e HPB, ainda não podemos descartar a possibilidade de que a superexpressão desta proteína seja o mecanismo responsável pela quebra de tolerância imunológica em pacientes com CaP, uma vez que a expressão de Wnt4 somente foi comparada entre amostras de CaP e de HPB. De acordo com os dados obtidos em nosso estudo, pacientes cujos tumores de CaP possuem maior expressão de Wnt4 são aqueles que possuem um menor tempo para a recorrência bioquímica da doença. É possível, portanto, que a proteína Wnt4 diretamente ou a via de sinalização ativada por este ligante quando superexpresso exerça alguma ação em genes ou proteínas envolvidas com a progressão do tumor de próstata, de forma a controlar proteínas envolvidas no processo de recidiva da doença. Estudos que visem investigar a ação da expressão de Wnt4 sobre genes envolvidos no processo de recorrência bioquímica (Tricoli JV *et. al.*, 2004; Bettuzzi S *et. al.*, 2003; Latil A *et. al.*, 2003) poderiam elucidar este mecanismo proposto.

6 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos no presente trabalho concluímos que:

1. A proteína Wnt4 não apresenta expressão diferencial entre CaP e HPB e ambas as amostras teciduais apresentam perfil de marcação citoplasmático e de membrana, ressaltando-se uma forte marcação na borda apical das células epiteliais voltadas para o lúmen dos ácinos prostáticos. Este dado é compatível com o perfil de expressão de proteínas secretadas e que se ligam em receptores membranares.
2. O perfil de marcação da proteína Wnt4 não está correlacionado com o Escore de Gleason, níveis de PSA, presença de um segundo tumor primário e recidiva clínica do CaP. No entanto, pacientes cujas amostras tumorais marcam fortemente para esta proteína apresentam recorrência bioquímica precoce do CaP.
3. O perfil de marcação das proteínas E-caderina e Topoisomerase II- α , marcadores típicos de potencial metastático, invasividade e proliferação de células do CaP, não se correlaciona com os diversos parâmetros clínico-patológicos analisados neste estudo. Apenas a marcação da Topoisomerase II- α apresenta-se diferencialmente expressa entre CaP e HPB.
4. O presente estudo também fornece as primeiras evidências de que a proteína Wnt4 é capaz de induzir resposta imune humoral em pacientes com CaP, constituindo, portanto, um potencial antígeno tumoral.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5th edition. Editora Elsevier.

Adam JK, Odhav B, Bhoola KD. Immune responses in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* **2003**, 99: 113-132.

Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, Lincecum J, Becker KA, Cumberledge S, Bernfield M. Syndecan-1 is required for Wnt-1 induced mammary tumorigenesis in mice. *Nature Genetics* **2000**, 25: 329-332.

Bagowski CP, Xiong W, Ferrell JE Jr. c-Jun N-terminal kinase activation in *Xenopus laevis* eggs and embryos. A possible non-genomic role for the JNK signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276: 1459-65.

Baker NE. Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryos. *The EMBO Journal* **1987**, 6: 1765-1773.

Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Oncology* **2003**, 21: 383-391.

Benedit P, Paciucci R, Thomson TM, Valeri M, Nadal M, Càceres C, de Torres I, Estivill X, Lozano JJ, Morote J, Reventós J. PTOV1, a novel protein overexpressed in prostate cancer containing a new class of protein homology blocks. *Oncogene* **2001**, 20: 1455-1464.

Biason-Lauber A, De Filippo G, Konrad D, Scarano G, Nazzaro A, Schoenle EJ. WNT4 deficiency – a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a case report. *Human Reproduction* **2007**, 22: 224-229.

Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. Brief report: a WNT4 mutation associated with mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *The New England Journal of Medicine* **2004**, 351: 792-798.

- Bostwick DG, Meiers I, Shanks JH.** Glutathione S-transferase: differential expression of α , μ and π isoenzymes in benign prostate, prostatic intraepithelial neoplasia, and prostatic adenocarcinoma. *Human Pathology* **2007**, 38: 1394-1401.
- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T.** Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *The American Journal of Pathology* **1999**, 155: 1033-1038.
- Bradley RS & Brown MC.** The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix. *The EMBO Journal* **1990**, 9: 1569-1575.
- Bradley SV, Oravecz-Wilson KI, Bougeard G, Mizukami I, Li L, Munaco AJ, Sreekumar A, Corradetti MN, Chinnaiyan AM, Sanda MG, Ross TS.** Serum antibodies to huntingtin interacting protein-1: a new blood test for prostate cancer. *Cancer Research* **2005**, 65: 4126-4133.
- Brisken C, Heineman A, Chavarria T, Elenbaas B, Tan J, Dey SK, McMahon JA, McMahon AP, Weinberg RA.** Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes & Development* **2000**, 14: 650-654.
- Brown AM.** Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle? *Breast Cancer Research* **2001**, 3: 351-355.
- Bussemakers MJG, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HFM, Schalken JA, Debruyne FMJ, Ru N, Isaacs WB.** DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research* **1999**, 59: 5975-5979.
- Cabrera CV, Alonso MC, Johnston P, Phillips RG, Lawrence PA.** Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. *Cell* **1987**, 50: 659-663.
- Castilla C, Congregado B, Chicho'n D, Torrubia FJ, Japo'n MA, Sa'ez C.** Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic bak. *Endocrinology* **2006**, 147: 4960-4967.

Catalona WJ & Smith DS. Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical retropubic prostatectomy for prostate cancer intermediate-term results. *The Journal of Urology* **1998**, 160: 2428-2434.

Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, Evans CL, Linton HJ, Amirkhan A, Horninger W, Klocker H, Mikolajczyk SD. Serum pro prostate specific antigen improves cancer detection compared to free and complexed prostate specific antigen in men with prostate specific antigen 2 to 4 ng/ml. *The Journal Of Urology* **2003**, 170: 2181-2185.

Chen G, Shukeir N, Potti A, Sircar K, Aprikian A, Goltzman D, Rabbani SA. Up-regulation of Wnt-1 and β -catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma. Potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer* **2004**, 101: 1345-1356.

Chesire DR & Isaacs WB. B-catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. *Endocrine-Related Cancer* **2003**, 10: 537-560.

Christian JL, McMahon JA, McMahon AP, Moon RT. Xwnt8, a Xenopus Wnt1/int-1 related gene responsive to mesoderm-inducing growth factors, may play a role in ventral mesodermal patterning during embryogenesis. *Development* **1991**, 111: 1045-1055.

Chung LW. The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer Surveys* **1995**, 23: 33-42.

Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* **2006**, 127: 469-480.

Coffey DS. Prostate cancer. An overview of an increasing dilemma. *Cancer* **1993**, 71: 880-886.

Cohen ED, Mariol MC, Wallace RM, Weyers J, Kamberov YG, Pradel J, Wilder EL. DWnt4 regulates cell movement and focal adhesion kinase during Drosophila ovarian morphogenesis. *Developmental Cell* **2002**, 2: 437-448.

- Cooper CS, Campbell C, Jhavar S.** Mechanisms of Disease: biomarkers and molecular targets from microarray gene expression studies in prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* **2007**, 12: 677-687.
- D'Amico AV, Chen MH, Cox MC, Dahut W, Figg WD.** Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. *New England Journal of Medicine* **2004**, 351: 125-135.
- Daniels T, Zhang J, Gutierrez I, Elliot ML, Yamada B, Heeb MJ, Sheets SM, Wu X, Casiano CA.** Antinuclear autoantibodies in prostate cancer: immunity to LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. *The Prostate* **2005**, 62: 14-26.
- Datta MW, True LD, Nelson PS, Amin MB.** The role of tissue microarrays in prostate cancer biomarker discovery. *Adv Anat Pathol* **2007**, 14: 408-418.
- De Marzo AM, DeWeese TL, Platz EA, Meeker AK, Nakayama M, Epstein JL, Isaacs WB, Nelson WG.** Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *Journal of Cellular Biochemistry* **2004**, 91: 459-477.
- De Marzo AM, Knudsen B, Chan-Tack K, Epstein JI.** E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. *Urology* **1999**, 53: 707-713.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG.** Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews in Cancer* **2007**, 7: 256-269.
- Desai AA, Schilsky RL, Young A, Janisch L, Stadler WM, Vogelzang NJ, Cadden S, Wright JA, Ratain MJ.** A Phase I study of antisense oligonucleotide GTI-2040 given by continuous intravenous infusion in patients with advanced solid tumors. *Annals of Oncology* **2005**, 16: 958-65.
- Desai B, Rogers MJ, Chellaiah MA.** Mechanisms of osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. *Molecular Cancer* **2007**, 6: 18.

- Deutsch E, Maggiorella L, Eschwege P, Bourhis J, Soria JC, Abdulkarim B.** Environmental, genetic, and molecular features of prostate cancer. *The Lancet Oncology* **2004**, 5: 303-13.
- Dhanasekaran SM, Barrete TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Plenta KJ, Rubin MA & Chinnaiyan AM.** Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* **2001**, 412: 822-826.
- Dillioglulugil O, Leibman BD, Kattan MW, Seale-Hawkins C, Wheeler TM, Scardino PT.** Hazard rates for progression after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *Urology* **1997**, 50: 93-99.
- Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, **2007**.
- Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H.** Differential expression of the estrogen receptor beta (Erbeta) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic, and recurrence prostatic adenocarcinoma. *Prostate* **2003**, 54: 79-87.
- Fossa A, Berner A, Fossa SD, Hernes E, Gaudernack G, Smeland EB.** NY-ESO-1 protein expression and humoral immune responses in prostate cancer. *The Prostate* **2004**, 59: 440-447.
- Foster CS, Falconer A, Dodson AR, Norman AR, Dennis N, Fletcher A, Southgate C, Dowe A, Dearnaley D, Jhavar S, Eeles R, Feber A, Cooper CS.** Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome. *Oncogene* **2004**, 23: 5871-5879.
- Fukuda T, Asai N, Enomoto A, Takahashi M.** Activation of c-Jun amino-terminal kinase by GDNF induces G2/M cell cycle delay linked with actin reorganization. *Genes to Cells* **2005**, 10: 655-63.
- Gavin DP, Old LJ, Schreiber RD.** The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **2004**, 21: 137-148.
- Giles RH, van Es JH, Clevers H.** Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* **2003**, 1653: 1-24.

- Gonzalo ML & Isaacs WB.** Molecular pathways to prostate cancer. *The Journal of Urology* **2003**, 170: 2444-2452.
- Guo X, Day TF, Jiang X, Garrett-Beal L, Topol L, Yang Y.** Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes & Development* **2004**, 18: 2404-2417.
- Hadaschik BA & Gleave ME.** Therapeutic options for hormone-refractory prostate cancer in 2007. *Urologic Oncology* **2007**, 25: 413-419.
- Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET.** Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Research* **2005**, 65: 7554-7560.
- Hatsell S, Rowlands T, Hiremath M, Cowin P.** Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **2003**, 8: 145-158.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW.** Identification of c-myc as a target of the APC pathway. *Science* **1998**, 281: 1509-1512.
- Hou X, Tan Y, Li M, Dey SK, Das SK.** Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. *Molecular Endocrinology* **2004**, 18: 3035-3049.
- Huang HC, Klein PS.** The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biology* **2004**, 5: 234.
- Hughes C, Murphy A, Martin C, Fox E, Ring M, Sheils O, Loftus B, O'Leary J.** Topoisomerase II-alpha expression increases with increasing Gleason score and with hormone insensitivity in prostate carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* **2006**, 59: 721-724.
- Hunter DD, Zhang M, Ferguson JW, Koch M, Brunken WJ.** The extracellular matrix component WIF-1 is expressed during, and can modulate, retinal development. *Molecular and Cellular Neurosciences* **2004**, 27: 477-488.

Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urologic Oncology* **2005**, 23: 402-406.

Janka C, Selmi C, Gershwin ME, Will H, Sternsdorf T. Small ubiquitin-related modifiers: a novel and independent class of autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **2005**, 41: 609-616.

Jordan BK, Shen JHC, Olaso R, Ingraham HA, Vilain E. Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/ β -catenin synergy. *PNAS* **2003**, 100: 10866-10871.

Kajdacsy-Balla A, Geynisman JM, Macias V, Setty S, Nanaji NM, Beman JJ, Dobbin K, Melamed J, Kong X, Bosland M, Orenstein J, Bayerl J, Becich J, Dhir R, Datta MW. Practical aspects of planning, building, and interpreting tissue microarrays: The Cooperative Prostate Cancer Tissue Resource experience. *Journal of Molecular Histology* **2007**, 38: 113-121.

Karam JA, Lotan Y, Roehrborn CG, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Shariat SF. Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence. *Prostate* **2007**, 67: 614-622.

Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Serum p53 antibodies in patients with oral lesions: correlation with p53/HSP70 complexes. *International Journal of Cancer* **1997**, 74: 609-613.

Kim SJ, Uehara H, Yazici S, Busby JE, Nakamura T, He J, Maya M, Logothetis C, Mathew P, Wang X, Do KA, Fan D, Fidler IJ. Targeting platelet-derived growth factor receptor on endothelial cells of multidrug-resistant prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **2006**, 98: 783-93.

Koizumi F, Noguchi Y, Saika T, Nakagawa K, Sato S, Eldib AM, Nasu Y, Kumon H, Nakayama E. XAGE-1 mRNA expression in prostate cancer and antibody response in patients. *Microbiol Immunol* **2005**, 49: 471-476.

- Komekado H, Yamamoto H, Chiba T, Kikuchi A.** Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes to Cells* **2007**, 12: 521-534.
- Koziol JA, Zhang JY, Casiano CA, Peng XX, Shi FD, Feng AC, Chan EKL, Tan EM.** Recursive partitioning as an approach to selection of immune markers for tumor diagnosis. *Clinical Cancer Research* **2003**, 9: 5120-5126.
- Kühl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT.** Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275: 12701-12711.
- Kurayoshi M, Yamamoto H, Izumi S, Kikuchi A.** Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *The Biochemical Journal* **2007**, 402: 515-523.
- Laitinen S, Martikainen PM, Tolonen T, Isola J, Tammela TL, Visakorpi T.** EZH2, Ki-67 and MCM7 are prognostic markers in prostatectomy treated patients. *International Journal of Cancer* **2008**, 122: 595-602.
- Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, De Marzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD, Pollack JR.** Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **2004**, 101: 811-816.
- Larsson A, Ronquist G, Wulfing C, Eltze E, Bettendorf O, Carlsson L, Nilsson BO, Semjonow A.** Antiprostasome antibodies: possible serum markers for prostate cancer metastasizing liability. *Urologic Oncology* **2006**, 24: 195-200.
- Li Y, Hively WP, Varmus HE.** Use of MMTV-Wnt-1 transgenic mice for studying the genetic basis of breast cancer. *Oncogene* **2000**, 19: 1002-1009.
- Liao G, Tao Q, Kofron M, Chen JS, Schloemer A, Davis RJ, Hsieh JC, Wylie C, Heasman J, Kuan CY.** Jun NH2-terminal kinase (JNK) prevents nuclear beta-catenin accumulation and regulates axis formation in *Xenopus* embryos. *PNAS* **2006**, 103: 16313-8.

- Ligon KL, Echelard Y, Assimacopoulos S, Danielian PS, Kaing S, Grove EA, McMahon AP, Rowitch DH.** Loss of Emx2 function leads to ectopic expression of Wnt1 in the developing telencephalon and cortical dysplasia. *Development* **2003**, 130: 2275-2287.
- Lim L, Manser E, Leung T, Hall C.** Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways. *European Journal of Biochemistry* **1996**, 242: 171-85.
- Line A, Stengrevics A, Slucka Z, Li G, Jankevics E, Rees RC.** Serological identification and expression analysis of gastric cancer-associated genes. *British Journal of Cancer* **2002**, 86: 1824-1830.
- Liu L, Yoon JH, Dammann R, Pfeifer GP.** Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene* **2002**, 21: 6835-6840.
- Loeb S & Catalona WJ.** Prostate-specific antigen in clinical practice. *Cancer Letters* **2007**, 249: 30-39.
- Loric S, Paradis V, Gala JL, Berteau P, Bedossa P, Benoit G, Eschwe'ge.** Abnormal E-cadherin expression and prostate cell blood dissemination as markers of biological recurrence in cancer. *European Journal of Cancer* **2001**, 37: 1475-1481.
- Lu S, Lee J, Revelo M, Wang X, Lu S, Dong Z.** Smad3 is overexpressed in advanced human prostate cancer and necessary for progressive growth of prostate cancer cells in nude mice. *Clinical Cancer Research* **2007**, 13: 5692-702.
- Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, Trédanel J, Legros Y, Cazals D, Hirsch A, Soussi T.** Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nature Medicine* **1995**, 1: 701-702.
- Ma S, Guan XY, Beh PS, Wong KY, Chan YP, Yuen HF, Vielkind J, Chan KW.** The significance of LMO2 expression in the progression of prostate cancer. *Journal of Pathology* **2007**, 211: 278-285.

Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *PNAS USA* **1999**, 96: 1603-1608.

Masiello D, Chen SY, Xu Y, Verhoeven MC, Choi E, Hollenberg AN, Balk SP. Recruitment of beta-catenin by wildtype or mutant androgen receptors correlates with ligand stimulated growth of prostate cancer cells. *Molecular Endocrinology* **2004**, 18: 2388-2401.

Mathew P, Fidler IJ, Logothetis CJ. Combination docetaxel and platelet-derived growth factor receptor inhibition with imatinib mesylate in prostate cancer. *Seminars in Oncology* **2004**, 31: 24-9.

McDonnell TJ, Chari NS, Cho-Vega JH, Troncoso P, Wang X, Bueso-Ramos CE, Coombes K, Brisbay S, Lopez R, Prendergast G, Logothetis C, Do KA. Biomarker expression patterns that correlate with high grade features in treatment naive, organ-confined prostate cancer. *BMC Medical Genomics* **2008**, 1: 1.

McGarvey TW, Nguyen T, Puthiyaveetil R, Tomaszewski JE, Malkowicz SB. TERE1, a novel gene affecting growth regulation in prostate carcinoma. *Prostate* **2003**, 54: 144-155.

McMahon AP. The Wnt family of developmental regulators. *Trends in Genetics* **1992**, 8: 236-242.

McNeel DG, Nguyen LD, Storer BE, Vessela R, Lange PH, Disis ML. Antibody immunity to prostate cancer associated antigens can be detected in the serum of patients with prostate cancer. *Journal fo Urology* **2000**, 164: 1825-1829.

Michaelson JS & Leder P. Beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene* **2001**, 20: 5093-5099.

Mikels AJ & Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits β -catenin-TCF signaling depending on receptor context. *Plos Biology* **2006**, 4: 570-582.

Mikolajczyk SD, Song Y, Wong JR, Matson RS, Rittenhouse HG. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? *Clinical Biochemistry* **2004**, 37: 519-528.

Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca²⁺ pathways. *Oncogene* **1999**, 18: 7860-7872.

Miller JR. The Wnts. *Genome Biology* **2001**, 3: 3001.1-3001.15.

Minden A, Lin A, Smeal T, Dérillard B, Cobb M, Davis R, Karin M. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Molecular and Cellular Biology* **1994**, 14: 6683-8.

Mintz PJ, Kim J, Do K-A, Wang X, Zinner RG, Cristofanilli M, Arap MA, Hong WK, Troncso P, Logothetis CJ, Pasqualini R, Arap W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nature Biotechnology* **2003**, 21: 57-63.

Miyake H, Muramaki M, Kurahashi T, Yamanaka K, Hara I, Fujisawa M. Enhanced expression of heat shock protein 27 following neoadjuvant hormonal therapy is associated with poor clinical outcome in patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer. *Anticancer Research* **2006**, 26: 1583-1587.

Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Gleave NE. Testosterone-repressed prostate message-2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer. *Cancer Research* **2000**, 60: 170-176.

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and β -catenin signaling: diseases and therapies. *Nature Reviews Genetics* **2004**, 5: 691-701.

Mousses S, Bubendorf L, Wagner U, Hostetter G, Kononen J, Cornelison R, Goldberger N, Elkahloun AG, Willi N, Koivisto P, Ferhle W, Raffeld M, Sauter G, Kallioniemi OP. Clinical validation of candidate genes associated with prostate cancer progression in the CWR22 model system using tissue microarrays. *Cancer Research* **2002**, 62: 1256-1260.

Mulroy T, McMahon JA, Burakoff SJ, McMahon AP, Sen J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *European Journal of Immunology* **2002**, 32: 967-971.

Murphy AJ, Hughes CA, Barrett C, Magee H, Loftus B, O'Leary JJ, Sheils O. Low-level TOP2A amplification in prostate cancer is associated with HER2 duplication, androgen resistance, and decreased survival. *Cancer Research* **2007**, 67: 2893-2898.

Nelson PS, Plymate SR, Wang K, True LD, Ware JL, Gan L, Liu AY, Hood L. Hevin, an antiadhesive extracellular matrix protein, is down-regulated in metastatic prostate adenocarcinoma. *Cancer Research* **1998**, 58: 232-236.

Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *The Journal of Urology* **2004**, 172: S6-S12.

Nikoleishvili D, Pertia A, Tsintsadze O, Gogokhia N, Chkhotua A. Down-regulation of p27(Kip 1) cyclin-dependent kinase inhibitor in prostate cancer: distinct expression in various prostate cells associating with tumor stage and grades. *Georgian Med News* **2007**, 143: 34-38.

Nusse R & Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus, contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **1982**, 31: 99-109.

Oesterling JE, Chan DW, Epstein JI, Kimball AWJ, Bruzek DJ, Rock RC, Brendler CB, Walsh PC. Prostate specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostatic cancer treated with radical prostatectomy. *The Journal of Urology* **1988**, 139: 766-772.

Ooyen AV & Nusse R. Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene int-1; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell* **1984**, 39: 233-240.

Ornstein DK, Rayford VA, Fusaro VA, Conrads TP, Ross SJ, Hitt BA, Wiggins WW, Veenstra TD, Liotta LA, Petricoin EF III. Serum proteomic profiling can discriminate prostate cancer from benign prostates in men with total specific

antigen levels between 2.5 and 25 ng/ml. *The Journal of Urology* **2004**, 172: 1302-1305.

Papkoff J & Schryver B. Secreted int-1 protein is associated with the cell surface. *Molecular and Cellular Biology* **1990**, 10: 2723-2730.

Parmigiani RB, Bettoni F, Grosso DM, Lopes A, Cunha IW, Soares FA, Carvalho AL, Fonseca F, Camargo AA. Antibodies against the câncer-testis antigen CTSP-1 are frequently found in prostate cancer patients and are an independent prognostic factor for biochemical-recurrence. *International Journal of Cancer* **2008**, [Epub ahead of print].

Pawlowski JE, Ertel JR, Allen MP, Xu M, Butler C, Wilson EM, Wierman ME. Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277: 20702-20710.

Pendergraft WF, Pressler BM, Jennette JC, Falk RJ, Preston GA. Autoantigen complementarity: a new theory implicating complementary proteins as initiators of autoimmune disease. *Journal of Molecular Medicine* **2005**, 83: 12-25.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes and Development* **2007**, 14: 1837-1851.

Pongracz JE & Stockley RA. Wnt signaling in lung development and diseases. *Respiratory Research* **2006**, 7: 15.

Pontes ER, Matos LC, da Silva EA, Xavier LS, Diaz BL, Small IA, Reis EM, Verjovski-Almeida S, Barcinski MA, Gimba ERP. Auto-antibodies in prostate cancer: humoral immune response to antigenic determinants coded by the differentially expressed transcripts FLJ23438 and VAMP3. *The Prostate* **2006**, 66: 1463-1473.

Prowatke I, Devens F, Benner A, Gröne EF, Mertens D, Gröne HJ, Lichter P, Joos S. Expression analysis of imbalanced genes in prostate carcinoma using tissue microarrays. *British Journal of Cancer* **2007**, 96: 82-88.

- Rao A, Luo C, Hogan PG.** Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual Review of Immunology* **1997**, 15: 707-747.
- Ray ME, Mehra R, Sandler HM, Daignault S, Shah RB.** E-cadherin protein expression predicts prostate cancer salvage radiotherapy outcomes. *The Journal of Urology* **2006**, 1409-1414.
- Reis EM, Nakaya HI, Louro R, Canavez FC, Flatschart AVF, Almeida GT, Egidio CM, Paquola AC, Machado AA, Festa F, Yamamoto D, Alvarenga R, Silva CC, Brito GC, Simon SD, Moreira-Filho CA, Leite KR, Câmara-Lopes LH, Campos FS, Gimba E, Vignal GM, El-Dorry H, Sogayar MC, Barcinski MA, Silva AM, Verjovski-Almeida S.** Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene* **2004**, 23: 6684-6692.
- Riffenburg R & Amling CL.** Use of early PSA velocity to predict eventual abnormal PSA values in man at risk for prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* **2003**, 6: 39-44.
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R.** The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *Wingless*. *Cell* **1987**, 50: 649-657.
- Robles LD, Frost AR, Davila M, Hutson AD, Grizzle WE, Chakrabarti R.** Down-regulation of *Cdc6*, a cell cycle regulatory gene, in prostate cancer. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277: 25431-25438.
- Rogers CG, Yan G, Zha S, Gonzalzo ML, Isaacs WB, Luo J, De Marzo AM, Nelson WG, Pavlovich CP.** Prostate cancer detection on uroanalysis for α -methylacyl coenzyme a racemase protein. *The Journal of Urology* **2004**, 172: 1501-1503.
- Rubin MA, Mucci NR, Figurski J, Fecko A, Pienta KJ, Day ML.** E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. *Human Pathology* **2001**, 32: 690-697.
- Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Sooryanarayana V, Barrete TR, Sanda MG, Pienta KJ, Ghosh D & Chinnaiyan AM.** α -Methylacyl Coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* **2002**, 287: 1662-1670.

Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, Mikoshiba K. The Wnt/calcium pathway activates NFAT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* **2002**, 417: 295-299.

Sanson B. Generating patterns from fields of cells. *EMBO Reports* **2001**, 2: 1083-1088.

Santamaría A, Fernández PL, Farré X, Benedit P, Reventós J, Morote J, Paciucci R, Thomson TM. PTOV-1, a novel protein overexpressed in prostate cancer, shuttles between the cytoplasm and the nucleus and promotes entry into the S phase of the cell division cycle. *American Journal of Pathology* **2003**, 162: 897-905.

Shi FD, Zhang JY, Liu D, Rearden A, Elliot M, Nachtsheim D, Daniels T, Casiano CA, Heeb MJ, Chan EK, Tan EM. Preferential humoral immune response in prostate cancer to cellular proteins p90 and p62 in a panel of tumor-associated antigens. *The Prostate* **2005**, 63 (3): 252-258.

Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Tamayo P, Renshaw AA, D'Amico AV, Richie JP, Lander ES, Loda M, Kantoff PW, Golub TR, Sellers WR. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell* **2002**, 1: 203-209.

Singh S, Sadacharan S, Su S, Belldegrun A, Persad S, Singh G. Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. *Cancer Research* **2003**, 63: 2306-2311.

Smalley MJ & Dale TC. Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **2001**, 6: 37-52.

Smolich BD, McMahon JA, McMahon AP, Papkoff J. Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Molecular Biology of the Cell* **1993**, 4: 1267-1275.

Sokol S, Christian JL, Moon RT, Melton DA. Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell* **1991**, 67: 741-752.

Song LN, Herrell R, Byers S, Shah S, Wilson EM, Gelmann EP. Beta-catenin binds to the activation function 2 region of the androgen receptor and modulates the effects of the N-terminal domain and TIF2 on ligand-dependent transcription. *Molecular and Cellular Biology* **2003**, 23: 1674-1687.

Sreekumar A, Laxman B, Rhodes DR, Bhagavathula S, Harwood J, Giacherio D, Ghosh D, Sanda MG, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Humoral immune response to α -Methylacyl-CoA Racemase and prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **2004**, 96 (11): 834-843.

Stamey TA & Kabalin JN. Prostate specific antigen in the diagnoses and treatment of adenocarcinoma of the prostate. I. Untreated patients. *The Journal of Urology* **1989**, 141: 1070-1075.

Stamey TA, Warrington JA, Caldwell MC, Chen Z, Fan Z, Mahadevappa M, McNeal JE, Nolley R, Zhang Z. Molecular genetic profiling of Gleason grade 4/5 prostate cancers compared to benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Urology* **2001**, 166: 2171-2177.

Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* **1994**, 372: 679-683.

Steinberg DM, Sauvageot J, Piatandosi S, Epstein JI. Correlation between needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings. *American Journal of Surgery Pathology* **1997**, 21: 566-576.

Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, Dotan ZA, Bianco Jr FJ, Lilja H, Scardino PT. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *Journal of Clinical Oncology* **2006**, 24: 3973-3978.

Teh MT, Blaydon D, Ghali LR, Briggs V, Edmunds S, Pantazi E, Barnes MR, Leigh IM, Kelsell DP, Philpott MP. Role for WNT16B in human epidermal keratinocyte proliferation and differentiation. *Journal of Cell Science* **2007**, 120: 330-9.

- Terada Y, Tanaka H, Okado T, Shimamura H, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S.** Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *Journal of the American Society of Nephrology* **2003**, 14: 1223-1233.
- Terry S, Yang X, Chen MW, Vacherot F, Buttyan R.** Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* **2006**, 99: 402-410.
- Tetsu O & McCormick F.** Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **1999**, 398: 422-426.
- Tian Q, Jin H, Cui Y, Guo C, Lu X.** Regulation of Wnt gene expression. *Development, Growth & Differentiation* **2005**, 47: 273-281.
- Tian Q, Nakayama T, Dixon MP, Christian JL.** Post-transcriptional regulation of Xwnt-8 expression is required for normal myogenesis during vertebrate embryonic development. *Development* **1999**, 126: 3371-3380.
- Tolonen TT, Tammola S, Jokinen S, Parviainen T, Martikainen PM.** Bax and Bcl-2 are focally overexpressed in the normal epithelium of cancerous prostates. *Scand J Urol Nephrol* **2007**, 41: 85-90.
- Trougakos IP, So A, Jansen B, Gleave ME, Gonos ES.** Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress. *Cancer Research*. **2004**, 64: 1834-1842.
- Truica CI, Byers S, Gelmann EP.** Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer Research* **2000**, 60: 4709-4713.
- Tsutsumi H, Miyamoto C, Furuichi Y, Yoshiike M, Wa SN, Iwamoto T.** VHL tumor suppressor gene: its mutation and protein level in renal cell carcinoma. *Oncology Reports* **2003**, 10: 1357-1361.

Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* **1999**, 397: 405-409.

Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrete TR, Kumar-Sinha C, Sanda, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RGAB, Otte AP, Rubin MA & Chinnaiyan AM. The polycomb group EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **2002**, 419: 624-629.

Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signaling. *Developmental Cell* **2003**, 5: 367-377.

Venanzoni MC, Giunta S, Muraro GB, Storari L, Crescini C, Mazzucchelli R, Montironi R, Seth A. Apolipoprotein E expression in localized prostate cancers. *International Journal of Oncology* **2003**, 22: 779-786.

Verras M, Brown J, Li X, Nusse R, Sun Z. Wnt3a growth factor induces androgen receptor-mediated transcription and enhances cell growth in human prostate cancer cells. *Cancer Research* **2004**, 64: 8860-8866.

Verras M & Sun Z. Roles and regulation of Wnt signaling and β -catenin in prostate cancer. *Cancer Letters* **2006**, 237: 22-32.

Vogelzang NJ, Nelson JB, Schulman CC, et al. Meta-analysis of clinical trials of atrasentan 10 mg in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2005**, 23: 4563 [Abstract].

Wagenlehner FME, Elkahwaji JE, Algaba F, Bjerklund-Johansen T, Naber KG, Hartung R, Weidner W. The role of inflammation and infection in the pathogenesis of prostate carcinoma. *BJU International* **2007**, 100: 733-737.

Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D, Mehra R, Montie JE, Pienta KJ, Sanda MG, Kantoff PW, Rubin MA, Wei JT, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Autoantibody signatures in prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* **2005**, 353: 1224-1235.

- Ware JL.** Growth factors and their receptors as determinants in the proliferation and metastasis of human prostate cancer. *Cancer Metastasis Reviews* **1993**, 12: 287-301.
- Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM.** Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* **2002**, 1: 279-288.
- Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, Frierson Jr HF, Hampton GM.** Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Research* **2001**, 61: 5974-5978.
- Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals ST.** Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *The American Journal of Pathology* **1999**, 154: 515-523.
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates III JR, Nusse R.** Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **2003**, 423: 448-452.
- Willman JH, Holden JA.** Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II-alpha in benign, premalignant, and malignant lesions of the prostate. *Prostate*. **2000 Mar 1;42(4):280-6.**
- Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Hofstaedter F, Hartmann A, Knuechel R, Rosenthal A, Pilarsky C.** WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung and bladder cancer. *Journal of Pathology* **2003**, 201: 204-212.
- Wright K, Wilson P, Morland S, Campbell I, Walsh M, Hurst T, Ward B, Cummings M, Chenevix-Trench G.** beta-catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumors. *International Journal of Cancer* **1999**, 82: 625-629.

- Yamamoto T, Ito K, Ohi M, Kubota Y, Suzuki K, Fukabori Y, Kurokawa K, Yamanaka H.** Diagnostic significance of digital rectal examination and transrectal ultrasonography in men with prostate-specific antigen levels of 4 NG/ML or less. *Urology* **2001**, 58: 994-998.
- Yang F & Yang XF.** New concepts in tumor antigens: their significance in future immunotherapies for tumors. *Cellular and Molecular Immunology* **2005**, 2: 331-341.
- Yang F, Li X, Sharma M, Sasaki CY, Longo DL, Lim B, Sun Z.** Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277: 11336-11344.
- Yang X, Chen M-W, Terry S, Vacherot F, Bemis DL, Capodice J, Kitajewski J, de la Taille A, Benson MC, Guo Y, Buttyan R.** Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells. *Oncogene* **2006**, 25: 3436-3444.
- Yu H, Pask AJ, Shaw G, Renfree MB.** Differential expression of WNT4 in testicular and ovarian development in a marsupial. *BMC Developmental Biology* **2006**, 6: 44.
- Zellweger T, Chi K, Miyake H, Adomat H, Kiyama S, Skov K, Gleave ME.** Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by inhibition of the cell survival protein clusterin. *Clinical Cancer Research*. 2002, 8: 3276-3284.
- Zhang JY, Casiano CA, Peng XX, Koziol JA, Chan EKL, Tan EM.** Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **2003**, 12: 136-143.
- Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM.** Evidence that APC regulates surviving expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Research* **2001**, 61: 8664-8667.
- Zhou Y, Toth M, Hamman MS, Monahan SJ, Lodge PA, Boynton AL, Salgaller ML.** Serological cloning of PARIS-1: a new TBC domain-containing, immunogenic

tumor antigen from a prostate cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, 290 (2): 830-838.

Zhu H, Mazor M, Kawano Y, Walker MM, Leung HY, Armstrong K, Waxman J, Kypka RM. Analysis of Wnt gene expression in prostate cancer: mutual inhibition by WNT11 and the androgen receptor. *Cancer Research* **2004**, 64: 7918-7926.



COORDENAÇÃO DE PESQUISA
Serviço de Pesquisa Clínica - SPC-CPQ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-INCA

Rio de Janeiro, 22 de novembro de 2004


Dr. Marcelo André Barcinski
Coordenador do Estudo

Ref.: 27/01 – Proteínas Caracterizadas no Projeto Genoma/Câncer como Marcadores para o Diagnóstico e o Prognóstico em Câncer de Próstata

Prezado Doutor,

Informamos através do presente, que o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA em sua Reunião de 27/09/04 analisou e **aprovou** o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão de 01/09/04) do protocolo acima.

Atenciosamente


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)