LUCIANA MARIA SEVO TIMOSZCZUK

**Análise de proteínas cuja expressão é controlada por miRNA
e relacionada à progressão do adenocarcinoma de próstata
por imuno-histoquímica em *tissue microarray***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre em Ciências

Programa de Urologia

Orientadora: Prof. Dra. Katia Ramos Moreira Leite

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Timoszczuk, Luciana Maria Sevo

Análise de proteínas cuja expressão é controlada por miRNA e relacionada à progressão do adenocarcinoma de próstata por imuno-histoquímica em tissue microarray / Luciana Maria Sevo Timoszczuk. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.Programa de Urologia.

Orientadora: Kátia Ramos Moreira Leite.

Descritores: 1.Neoplasias da próstata 2.MicroRNAs 3.Imunoistoquímica 4.Prognóstico 5.Reação em cadeia da polimerase em tempo real 6.Proteínas proto-oncogênicas c-myc 7.Proteína do retinoblastoma 8.Lamina 9.Antígeno Ki-67

USP/FM/DBD-319/12

“Dedico este trabalho os meus pais
Teodozi e Marylane que sempre
estiveram ao meu lado me apoiando
durante toda a vida. E aos meus irmãos
Antonio e Augusto que nunca permitiram
que eu desanimasse, sempre me
trazendo grandes alegrias.”

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que me deu a oportunidade de estar neste mundo e viver experiências maravilhosas, ter pessoas incríveis a minha volta e me permitir ensinar aos outros as coisas que aprendi.

A Dra. Kátia que me acolheu com tanto carinho, tendo tanta confiança em me passar seus ensinamentos mesmo com minha pouca experiência. Que sempre foi uma excelente orientadora não só na pesquisa quanto na minha vida. Por seu exemplo de caráter e profissionalismo. Que sempre me ensinou que posso ser mais do que realmente sou. Ser orientada pela Dra. Kátia foi o melhor presente que tive nos últimos anos, me trazendo muito orgulho e muito aprendizado.

Ao Prof. Miguel Srougi que sempre valoriza o nosso trabalho, fazendo com que nos sintamos sempre importantes não importa o trabalho que fazemos. Pelo carinho que sempre teve comigo e pelos conselhos que sempre nos presenteou.

Ao Prof. Homero Bruschini por me acolher dentro do programa de Pós-Graduação em Urologia, apostando em meu trabalho e dedicação.

A Sabrina Reis por sempre ser uma amiga incondicional, por me ensinar a ser uma pesquisadora, por estar sempre ao meu lado me incentivando e me corrigindo.

A Nayara, Camila, Caio, Denis, Beto, Nelson, Iran, Claudia, Michele, Vanessa e a todos os colegas do LIM 55 por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos, toda ajuda, todos os ensinamentos, as horas divertidas e o apoio que sempre recebi de todos vocês.

Ao Isaque e a Joseane e todos do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Sítio Libanês, que me ensinaram todas as técnicas que precisei aprender e como mesmo sendo bons no que fazemos, nós devemos ser humildes. Por todos os momentos que passamos juntos sempre com tanto carinho e dedicação.

A Iones, Camila, Elisa, Beth e Sanarely por todo carinho e atenção que sempre tiveram comigo.

Ao Dr. Alberto Antunes, Dr. Daniel Abe, Dr. José Pontes, Dr. Luiz Carlos, Dr. Carlos Batagello e a todos os colegas Urologistas por todo carinho e ensinamentos que me passaram.

Aos meus pais e meus irmãos por sempre estarem comigo, me incentivando e acreditando que eu era capaz. Por ao longo de minha vida nunca terem me deixado desistir. Por todo amor e dedicação a mim. Hoje sou o reflexo de toda uma vida de

ensinamentos, carinhos e todo o amor que sempre tiveram comigo.

Ao meu companheiro Can Saro que me deu tanto amor, compreendeu meus momentos de ausência, me deu carinho nos momentos de fraqueza e sempre esteve ao meu lado não importa o momento ou a situação. E a toda sua família que sempre foi tão amorosa e carinhosa comigo.

Aos meus amigos e a toda minha família do Grupo Escoteiro K2 que aceitaram minha ausência, me deram força e me incentivaram nos momentos mais possíveis sempre acreditando em mim. E que com cada gesto e palavras tornaram minha vida mais feliz.

A todos os meus amigos queridos que por vezes deixei de lado para me dedicar ao trabalho. Mas que nem por isso vocês deixaram de me amar, de estar ao meu lado e sempre me dizer uma palavra de carinho e compreensão. Por todas alegrias que vocês sempre me deram e por muitas que sei que ainda terei.

Obrigada a todos por fazerem parte da minha vida. Que Deus sempre os abençoe. Amo todos vocês.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committe of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e

Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed, São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1.Introdução_____	1
1.1 Câncer de Próstata _____	2
1.2 miRNA_____	5
1.3 miRNA nas neoplasias _____	7
1.4 miRNA no câncer de próstata_____	8
1.5 Papel das Proteínas Reguladas pelos miR-let7, 100 e 218_____	12
1.5.1 Smarca5_____	12
1.5.2 Retinoblastoma_____	14
1.5.3 Laminina_____	15
1.5.4 Ras_____	18
1.5.5 c-Myc_____	21
1.5.6 Bub1_____	23
1.5.7 Ki-67 e proliferação _____	24
2. Objetivos_____	26
2.1 Objetivo Primário_____	27
2.2 objetivos Secundários_____	27
3. Materiais e Métodos_____	28

3.1 Pacientes (Critérios e inclusão e exclusão)	29
3.2 TMA	29
3.3 Carcinoma Localizado	30
3.3.1 Metástases linfonodais de carcinoma de próstata	31
3.3.2 Metástases ósseas de carcinoma de próstata	32
3.4 Estudo imuno-histoquímico	33
3.5 Análise computadorizada das marcações imuno-histoquímicas	34
3.6 Isolamento do RNA total	39
3.7 Transcrição reversa (RT)	40
3.8 Amplificação do miRNA	41
3.9 Análise dos resultados	42
3.10 Análise estatística	43
4. Resultados	44
4.1 Análise da expressão protéica por imuno-histoquímica dos genes controlados por miRNA	45
4.1.1 Expressão de proteínas controladas pelo miR-Let7c no carcinoma de próstata localizado, metastático em linfonodo e em osso	46
4.1.1.a Ras	46

4.1.1.b C-Myc_____	47
4.1.1.c Bub1_____	48
4.1.2 Expressão de proteínas controladas pelo miR-100 no carcinoma de próstata localizado, metastático em linfonodo e em osso_____	49
4.1.2.a Smarca5_____	49
4.1.2.b Retinoblastoma_____	50
4.1.3 Expressão de proteínas controladas pelo miR-218 no carcinoma de próstata localizado, metastático em linfonodo e em osso_____	52
4.1.3.a Laminina_____	52
4.1.4 Atividade proliferativa com o uso de Ki-67_____	53
4.2 Correlação dos níveis de expressão dos miRNA Let7c, 100 e 218 com suas proteínas alvo_____	55
4.2.1 Expressão dos miRNA Let7c, 100 e 218 no CaP localizado_____	55
4.2.2 Correlação dos níveis de expressão dos miRNA Let7 com suas proteínas alvo (Ras, c-Myc e Bub1)_____	56
4.2.3 Correlação dos níveis de expressão dos miRNA 100 com suas proteínas alvo (Smarca5 e Retinoblastoma)_____	56
4.2.4 Correlação dos níveis de expressão dos miRNA218 com sua proteína alvo (Laminina)_____	57

4.3 Expressão de miRNA e fatores prognósticos, estadiamento, PSA e Recidiva_____	58
4.4 Expressão de miRNA e curvas de sobrevida_____	60
4.5 Expressão das proteínas Ras, c-Myc, Bub1, Smarca5, pRb e Laminina e os fatores prognósticos, escore de Gleason, estadiamento e PSA pré-operatório_____	65
4.6 Expressão protéica e curvas de sobrevida_____	66
5. Discussão_____	71
6. Conclusão_____	82
7. Anexos_____	84
8. Referências bibliográficas_____	92
Apêndices	

Lista de Siglas

AKT	Serina-treonina Quinase de 60 kda
APC/C	<i>Anaphase-promoting complex</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BUB1	<i>Budding uninhibited by benzimidazoles 1</i>
CaP	Câncer de próstata
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
DAB	Diaminobenzidine
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EHS	<i>Engelbreth Holm Swarm</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>
EUA	Estados Unidos da America
G0	Fase do ciclo celular onde a célula permanece indefinidamente na intérfase
G1	Fase da interfase do ciclo celular, de síntese de proteínas
G2	Fase da interfase do ciclo celular, síntese de moléculas e organelas
GAP	Proteína ativadora de GTPase
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GEF	Fatores de troca do nucleotídeo guanina
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
GTPase	Enzimas que se ligam e hidrolizam o GTP
HeLa	Linhagem celular humana imortal de câncer cervical
HLH/LZ	<i>Region-helix-loop-helix-leucine zipper</i>
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IH	Imuno-histoquímica
INF- δ	Inferon gama
ISWI	<i>Drosophila imitation switch gene</i>

LAMB3	Laminina 5 β 3
LLC	Leucêmias linfocíticas crônicas
LM	Laminina
MAPK	Proteína quinase mitogênica ativada
MEK	<i>Mitogen regulated kinase</i>
miRNA	Micro RNA
Pb	Pares de bases
pRb	Proteína Retinoblastoma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PI3K	PI3-kinase
pri-miRNA	miRNA primário
PSA	Antígeno específico da próstata
PT	Estadiamento patológico
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
RalGEF	<i>Ral guanine nucleotide exchange factors</i>
RISC	Complexo silenciador induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RNA _m	RNA mensageiro
Rnase	Ribonuclease
RNU43	<i>U43 small nucleolar RNA</i>
RPM	Rotações por minuto
S	Fase da interfase do ciclo celular, duplicação do material genético
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SNF2H	<i>Sucrose nonfermenting protein 2 homolog</i>
StrepABC	Streptavidina biotina peroxidase
SWI/SNF	<i>SWItch/Sucrose NonFermentable</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TGF- β 1	Fator de crescimento transformante
TIP5	<i>TTF1 Interacting Protein 5</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNM	<i>Tumor, nodes, metastasis</i>
TR	Toque retal

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do modelo atual da biogênese e ação supressora pós-transcricional dos miRNA_____	6
Figura 2 - Relação dos miRNAs e as proteínas que tem sua expressão regulada pelos mesmos_____	11
Figura 3 - Ação do complexo ISWI, do qual a proteína Smarca5 faz parte, no remodelamento da cromatina. Mostrando sua dependência de ATP e sua relação com o PCNA_____	13
Figura 4 - Status da proteína pRb nas diversas fases do ciclo celular._____	16
Figura 5 - Localização da Laminina na membrana basal, e sua relação com outras proteínas de adesão com a membrana celular. _____	17
Figura 6 - Ação da proteína Ras dependente de GTP. E sua relação com a via MAPK na proliferação celular_____	19
Figura 7 - Relação do c-Myc com a proteína MAX. E a associação das duas proteínas relacionadas com a parada do ciclo celular_____	22

Figura 8 - Relação do Bub1 com a proteína Cdc20 e cinetócoro livre_____	23
Figura 9 - Abertura da imagem no sistema de análise de imagem_____	35
Figura 10 - Escolha da metodologia referente ao agente cromogênico, no caso a DAB e a coloração de fundo, hematoxilina de Harris_____	35
Figura 11 - Separação das imagens em “fundo”, DAB e hematoxilina de Harris_____	36
Figura 12 - Obtenção do <i>threshold</i> . Em preto estão as áreas consideradas positivas. Os números apontados na pequena tela à direita são mantidos para análise de todos os casos_____	37
Figura 13 - Análise da intensidade de coloração e área de marcação correspondente apenas a DAB_____	37
Figura 14 - Medida da marcação_____	38
Figura 15 - Registro da área marcada e intensidade de coloração_____	38

Figura 16 - Imunoexpressão de Ras no Carcinoma Localizado da Próstata padrão nuclear (A), padrão citoplasmático (B). Expressão de Ras na metástase linfonodal (C) e metástase óssea (D)_____ 47

Figura 17 - Imunoexpressão de c-Myc no carcinoma localizado da próstata (A e B), na metástase linfonodal (C), e na metástase óssea (D)_____ 48

Figura 18 - Imunoexpressão de Bub1 no carcinoma localizado da próstata (A e B), na metástase linfonodal (C), e na metástase óssea (D)_____ 49

Figura 19 - Imunoexpressão de Smarca5 no carcinoma localizado da próstata (A e B), na metástase linfonodal (C), e na metástase óssea (D)_____ 50

Figura 20 - Imunoexpressão de Retinoblastoma no tecido normal (A), carcinoma localizado da próstata (B), na metástase linfonodal (C), e na metástase óssea (D)_____ 51

Figura 21 - Imunoexpressão de Laminina na membrana basal do carcinoma localizado da próstata (A), padrão citoplasmático no carcinoma localizado da próstata (B), na metástase linfonodal (C), e na metástase óssea (D)_____ 52

Figura 22 - Imunoexpressão de Ki-67 no carcinoma localizado da próstata (A), na metástase linfonodal (B), e na metástase óssea (C)_____	53
Figura 23 - Gráfico ilustrando o perfil de expressão dos 3 miRNA em 61 carcinomas de próstata localizados_____	55
Figura 24 - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão dos miRNA- let7c e 218. Mediana utilizada para o miR-let7c de 17 e para o miR-218 de 119._____	61
Figura 25 - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão do miRNA-100. Mediana utilizada para o miR-100 de 62._____	62
Figura 26 - Curva de Kaplan-Meier mostrando o resultado da expressão da proteína Ras e Bub1, e a sobrevida livre de recidiva bioquímica _____	67
Figura 27 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando o resultado da expressão das proteínas Laminina e Smarca5, e a sobrevida livre de recidiva bioquímica._____	68
Figura 28 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando o resultado da expressão da proteína Retinoblastoma e c-Myc, e a sobrevida livre de recidiva bioquímica._____	69

Figura 29 - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de
recidiva de acordo com a atividade proliferativa
avaliada_____

69

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos do estudo caso controle de acordo com recorrência ou não do tumor após a cirurgia_____	31
Tabela 2 - Anticorpos utilizados para análise do nível de expressão de proteínas controladas pelos miRNA miR-let7c, miR-100 e miR-218_____	33
Tabela 3 - miRNA estudados em pacientes com carcinoma de próstata favoráveis e desfavoráveis_____	41
Tabela 4 - Porcentagem de perda de amostras, em cada tipo tumoral, nas proteínas analisadas_____	45
Tabela 5 - Expressão das proteínas cujo gene é um provável alvo dos miRNA Let7c, 100 e 218 avaliadas por imuno-histoquímica_____	54
Tabela 6 - Correlação da expressão protéica com seus miRNA_____	57
Tabela 7 - Relação dos miRNA com o PSA pré-operatório_____	58
Tabela 8 - Relação dos miRNA com o valor de Gleason dos casos_____	59

Tabela 9 - Relação de expressão dos miRNA com o estadiamento patológico dos carcinomas de próstata_____	59
Tabela 10 - Relação de expressão dos miRNA com recidiva bioquímica_____	60
Tabela 11 - Relação de expressão protéica com os níveis de PSA pré-operatório_____	63
Tabela 12 - Relação de expressão protéica coma o score de Gleason_____	64
Tabela 13 - Relação de expressão protéica com o estadiamento patológico dos tumores_____	65
Tabela 14 - Relação entre a expressão protéica coma recidiva bioquímica_____	66

Resumo

Timoszczuk LMS. Análise de proteínas cuja expressão é controlada por miRNA e relacionada à progressão do adenocarcinoma de próstata por imuno-histoquímica em *tissue microarray* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: O Câncer de Próstata (CaP) é o tumor mais comum do homem e a segunda causa de óbito por câncer no Brasil. MicroRNA (miRNA) é uma classe de pequenos RNA regulatórios não codificantes de proteínas que tem papel fundamental no controle da expressão dos genes. São responsáveis pelo controle de processos fundamentais na célula e estão envolvidos na tumorigênese em humanos. Previamente demonstramos alterações no perfil de expressão dos miRNA 100, let7c e 218 comparando carcinomas localizados e metastáticos. A caracterização de perfis de expressão de suas proteínas alvo no CaP é crucial para a compreensão dos processos envolvidos na carcinogênese, dando-nos a oportunidade do descobrimento de novos marcadores diagnósticos, prognósticos e mais importante identificação de alvos para o desenvolvimento de terapias inovadoras. **Objetivo:** Analisar a expressão das proteínas controladas pelo miR-let7c (Ras, c-Myc e Bub1), miR-100 (Smarca5 e Retinoblastoma) e miR-218 (Laminina 5 β 3) e a atividade proliferativa (Ki-67) no câncer de próstata com a técnica de imuno-histoquímica utilizando microarranjos teciduais

representativos de CaP localizado e suas metástases linfonodais e ósseas. Correlacionar os níveis de expressão dos miRNA com suas proteínas alvo. Analisar a expressão dos miRNA, proteínas e atividade proliferativa com os fatores prognósticos do câncer de próstata e com a evolução da doença. **Material e Métodos:** A imunoexpressão de Smarca5, Retinoblastoma, Laminina, Ras, c-Myc, Bub1 e Ki-67 foi avaliada através de IH pela técnica de microarranjo tecidual caracterizando três estágios do CaP, sendo 112 casos de CaP localizado, 19 metástases linfonodais e 28 metástases ósseas. As imagens obtidas foram submetidas a um *software* de análise de imagem digital MacBiophotonics ImageJ do *National Institutes of Health, EUA*, onde a intensidade de luminescência foi quantificada densitometricamente. O perfil de expressão dos miR-let7c, 100 e 218 foi analisado utilizando o bloco de parafina de 61 pacientes dos 112 pacientes com carcinoma localizado, que foram submetidos a análise protéica por IH. O processamento dos miRNA envolveu três etapas: extração do miRNA com kit específico, geração do DNA complementar e amplificação do miRNA por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) cujo controle endógeno foi RNU-43 (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Como controle, utilizamos amostras de tecido com hiperplasia prostática benigna (HPB). Avaliamos a relação entre a expressão dos miRNA e suas proteínas alvo, com o escore de

Gleason, estadiamento patológico e evolução da doença considerando recidiva bioquímica, níveis de PSA > 0,4 ng/mL, em uma média de seguimento de 77,5 meses. A análise estatística foi realizada através do software SPSS 19.0, utilizamos o test T de Student, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e qui-quadrado. O valor de p foi considerado estatisticamente significativo quando inferior na 0,05 em todos os cálculos. **Resultados:** Observamos uma diminuição de expressão de Ras ($p=0,017$) e Laminina ($p<0,0001$) conforme a progressão tumoral do CaP localizado a metástase linfonodal e óssea. Houve um aumento de expressão de Rb ($p=0,0361$) e aumento da atividade proliferativa avaliada pelo Ki-67 ($p<0,0001$). Encontramos ainda uma tendência a relação entre a positividade de expressão de c-Myc com estadiamento patológico pT3 ($p=0,070$). Todos os miRNA se mostraram superexpressos no CaP localizado. Laminina apresentou uma média de intensidade de expressão maior quanto maior a expressão de miR-218 ($p=0,038$). Porém os demais miRNA não apresentaram relação de expressão com suas proteínas alvo. Também não houve relação entre a expressão de miRNA e expressão das proteínas por IH com a recidiva bioquímica. **Conclusões:** Apesar de confirmarmos os nossos achados de superexpressão dos miRNA 100, let7c e 218 no CaP localizado, não houve correlação entre esses e a imunoexpressão de suas proteínas alvo. Demonstramos que houve alteração de

imunoexpressão de Ras, Laminina 5 β 3, Retinoblastoma e Ki-67 de acordo com a progressão tumoral no CaP. E uma maior expressão de c-Myc por IH mostrou uma significância tendência a relacionar-se com tumores não confinados estadiados pT3.

Descritores: Neoplasia da próstata, MicroRNAs, Imunoistoquímica, Prognóstico, Reação em cadeia da polimerase em tempo real, Proteínas proto-oncogênicas c-myc, Proteína do retinoblastoma, Laminina, Antígeno Ki-67.

Summary

Timoszczuk LMS. Analysis of proteins whose expression is controlled by miRNA and related to the progression of prostate adenocarcinoma by immunohistochemistry on tissue microarray. [thesis]. Sao Paulo: University of Sao Paulo Medical School; 2012.

Introduction: Prostate cancer (PCa) is the most common tumor in men and the second leading cause of cancer death in men in Brazil. MicroRNA (miRNA) is a class of small non-coding RNA that plays a key role in the control of gene expression. They are responsible for the control of key processes in the cell and are involved in tumorigenesis in humans. Previously, we demonstrated alterations in the expression profile of miRNA 100, 218 and let7c comparing localized and metastatic carcinomas. The characterization of expression profiles of their target proteins in PCa is crucial to understanding the processes involved in carcinogenesis, giving us the opportunity to discover new diagnostic or prognostic markers, and most importantly to find new targets for the development of innovative therapies. **Objective:** To analyze the expression of proteins controlled by miR-let7c (Ras, c-Myc and Bub1), miR-100 (Smarca5 and Retinoblastoma) and miR-218 (Laminin 5 β 3) and proliferative activity (Ki-67) in prostate cancer with immunohistochemistry using tissue microarrays representing localized PCa, lymph node and bone metastases. To correlate the expression levels of miRNAs with their target

proteins. To analyze the expression of miRNAs, proteins and proliferative activity with prognostic factors of prostate cancer and disease progression. **Methods:** The immunoexpression of Smarca5, Retinoblastoma, Laminin, Ras, c-Myc, Bub1 and Ki-67 was evaluated by IHC by tissue microarray technique featuring three stages of PCa, with 112 cases of localized PCa, 19 lymph node metastases and 28 bone metastases. The images obtained from IHC were submitted to analysis using the digital image software MacBiophotonics ImageJ from the National Institutes of Health, USA, where the intensity of luminescence was quantified densitometrically. We studied the expression profile of the miRNAs in the paraffin blocks of 61 patients out of the 112 patients with localized carcinoma, who underwent protein analysis by IHC. The processing of miRNA involved three steps: extraction of miRNA, generation of complementary DNA and amplification of the miRNA by quantitative real time PCR (qRT-PCR). To analyze the data we used a control endogenous RNU-43. The results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula. As control, we used the tissue from five patients with benign prostate hyperplasia (BPH) submitted to surgery. The relationship between the expression of miRNAs and their target proteins were analyzed as well as their expression with Gleason score, pathological stage and disease progression considered as PSA>0.4 ng/mL in a mean follow-up of 77.5 months. The statistical analysis was performed using SPSS 19.0

software, we used the Student t test, Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis and chi-square. The value was considered statistically significant when $p \leq 0.05$. **Results:** There was a decrease in the expression of Ras ($p=0.017$) and Laminin ($p<0.0001$) according to PCa progression from localized to lymph node and bone metastases. There was an increase in the expression of Retinoblastoma ($p=0.0361$) and an increase in proliferative activity assessed by Ki-67 ($p<0.0001$). We also found a relationship between the positivity of c-Myc expression with pT3 staged tumors ($p=0.070$). All miRNAs showed overexpression in PCa samples. Laminin showed a higher expression together with higher expression of miR-218 ($p=0.038$). The other miRNAs did not show a relationship with protein expression by IHC. There was no correlation between the expression of miRNAs and protein expression by IHC with biochemical recurrence. **Conclusions:** Although our findings confirm the overexpression of miR-100, 218 and let7c in localized PCa, there was no correlation between their expression and the protein of their target using immunohistochemistry. We demonstrated that there was a change in immunostaining of Ras, Laminin 5 β 3, Retinoblastoma and Ki-67 according to tumor progression. The increased expression of c-Myc per IHC showed a significant tendency to relate to tumor unconfined staged pT3.

Descriptors: Prostatic neoplasms, MicroRNAs, Immunohistochemistry, Prognosis, Real-time polymerase chain reaction, Proto-oncogene proteins c-myc, Retinoblastoma protein, Laminin, Ki-67 antigen.

1. Introdução

1.1 Câncer de Próstata

O Câncer de Próstata (CaP) é o tumor mais comum do homem e a segunda causa de óbito por câncer no Brasil (www.inca.gov.br). Sendo estimados nos EUA 241.740 novos casos para 2012, sendo que 28.170 morrerão da doença (Siegel et al., 2012). Os principais fatores de risco para o CaP são idade, história familiar e etnia. A incidência do CaP aumenta significativamente após os 50 anos de idade, sendo que dois em cada três tumores são diagnosticados em homens com mais de 65 anos.

Estes altos índices estão ligados principalmente ao aumento da expectativa de vida da população e hábitos alimentares. O consumo de diversos tipos de alimentos pode aumentar ou diminuir o risco do desenvolvimento de CaP. A exemplo dos alimentos ricos em carotenoides e algumas vitaminas que podem diminuir o risco do desenvolvimento do CaP, e alimentos ricos em gorduras, derivados do leite e carne vermelha que podem aumentar o risco de desenvolvimento do CaP (Schulman et al., 2001).

Por razões desconhecidas este é um tumor mais comum entre negros em comparação com outras raças. (ACS, 2009; INCA, 2012) A presença de história familiar é um fator de risco importante, ao fato que se o pai ou irmão apresentar CaP antes dos 60 anos de idade, o risco do indivíduo desenvolver CaP aumenta de três a dez vezes em relação à população geral (Crawford, 2003).

Atualmente a detecção do CaP é feita pelo exame de toque retal (TR) e através da determinação da concentração sérica do antígeno prostático específico, o PSA (Carter e Pearson, 1999).

O PSA, inicialmente isolado por Wang et al. em 1979 constitui o principal marcador do CaP. É produzido pelas células epiteliais acinares e ductais da glândula prostática normal, hiperplásica ou cancerosa. No CaP os níveis séricos de PSA dependem do grau de diferenciação, tamanho e estágio tumoral (Catalona et al., 1991).

Podemos notar níveis séricos de PSA elevados em pacientes com hiperplasia prostática benigna (HPB) e com prostatites, pois o PSA é um marcador específico do tecido prostático e não do CaP. (Schalken et al., 2005). Normalmente os níveis do PSA são encontrados baixos em condições normais, menos que 2,4 ng/ml. Porém como nossas coletas foram realizadas no ano de 1997 o valor normal de PSA utilizado foi menor que 4,0 ng/ml (Catalona et al., 1991). Entretanto é importante a associação da dosagem do PSA ao TR, já que o TR tem alta especificidade, porém baixa sensibilidade. Elevados níveis séricos de PSA são indicação de biópsia prostática guiada pela ultrassonografia transretal, método padrão ouro no diagnóstico do CaP (Greenlee et al., 2001; Gann et al., 1995).

O prognóstico do CaP depende principalmente do estágio TNM (*tumor, nodes metastasis*), grau histológico de Gleason bem como do nível e taxa de progressão do PSA. A progressão do CaP é variada,

existem tumores de baixo grau que tem evolução indolente enquanto outros possuem alta capacidade de progressão (Konishi et al., 1995; Andriole et al., 2005).

De acordo com o escore de Gleason existem cinco padrões na escala de graduação de Gleason para o CaP, considerando o glandular e a sua relação com o estroma prostático. O diagnóstico final é dado pela soma dos valores dos dois focos neoplásicos mais representativos do tumor, de forma que as neoplasias serão classificadas em um escore de 2 a 10 (Gleason, 1992; Epstein et al., 2005). Sendo que tumores com escore de Gleason de 2-6 são bem diferenciados e tem um comportamento indolente, enquanto tumores com escore de Gleason 7-10 são mais agressivos (Gleason, 1992).

A classificação TNM avalia o tumor primário (T) de acordo com as suas dimensões, acometimento de um ou ambos os lobos prostáticos e extensão tumoral; presença e localização de linfonodos acometidos pelo tumor (N) e presença de metástase à distância (M). Com base nesta classificação o tumor confinado a próstata é definido como estágio T2, enquanto aquele que se estende além da cápsula prostática e/ou acomete vesículas seminais é classificado como T3 (Sobin e Wittekind, 2002).

Outro fator prognóstico importante é o volume tumoral, que pode ser avaliado na biópsia ou na peça cirúrgica. Em estudo do nosso grupo, análise multivariada demonstrou que o volume tumoral na prostatectomia

radical juntamente com a porcentagem do padrão 4 de Gleason foram indicadores independentes de recidiva bioquímica (Leite et al., 2005).

Apesar dos fatores prognósticos clássicos serem utilizados amplamente para definição do risco do CaP e a tomada de decisão terapêutica estar baseada neles, existem muitas imperfeições, suscitando uma necessidade cada vez maior da descoberta de novos marcadores que possam fornecer maiores informações quanto ao comportamento da doença (Wright e Lange, 2007).

1.2 miRNA

MicroRNA (miRNA) formam um grupo de pequenas moléculas de RNA que contém entre 19 a 25 nucleotídeos, não codificantes de proteína com ação fundamental na regulação da expressão dos genes (Shi et al., 2007).

São sintetizados pela RNA polimerase II e modificados após a transcrição pela adição de uma capa na região 5' e uma cauda poli A na região 3'. Esta molécula denominada pri-miRNA forma uma estrutura do tipo *hairpin* que no núcleo sofre a ação do complexo microprocessador (Drosha-DGCR8), enzimas do tipo Rnase-III, quando ocorre o fenômeno *cropping*. O produto deste processamento tem aproximadamente 70 nucleotídeos é denominado pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela Exportina5, onde sofre a ação da enzima Dicer formando um duplex miRNA-miRNA contendo o miRNA maduro e sua fita complementar.

Apenas uma das fitas do duplex será montada dentro do complexo silenciador induzido por RNA (RISC) que atua sobre o seu RNA mensageiro (RNAm) alvo reprimindo sua tradução em proteína ou promovendo sua degradação. Esta ação depende do grau de complementariedade do miRNA com a região 3' do RNAm alvo (Kim, 2005)(Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática do modelo atual da biogênese e ação supressora pós-transcricional dos miRNA

Um mesmo miRNA pode ter mais de 100 RNAm alvos com funções diversas, acreditando-se que um terço dos genes humanos sejam controlados por este mecanismo (Yoon e De Michelli, 2005).

Até agosto de 2012, haviam sido identificadas 21.264 sequências de precursores de miRNAs, 25.141 sequências de miRNA maduros em 193 espécies, sendo que na espécie humana foram isoladas 1.600 sequências de precursores de miRNA e 2.042 sequências de miRNA maduro (www.mirbase.org).

São responsáveis pela regulação de processos fundamentais da célula como a proliferação, diferenciação, resposta ao estresse e apoptose. Metade dos miRNA estão localizados nos chamados sítios frágeis do DNA cujas anormalidades estão associadas ao câncer (Esquela-Kerscher e Slack, 2006).

1.3 miRNA nas neoplasias

Na maioria dos tumores os miRNA estão subexpressos, concluindo que eles atuam como supressores de tumor ligando-se a oncogenes. A sua ausência seria responsável por um aumento de expressão de oncogenes que atuariam nos processos carcinogénéticos. Um dos primeiros miRNAs a serem estudados foram os mir15-a e mir16-1 Calin et al. (2002) que estão subexpressos em leucemias linfocíticas crônicas (LLC) e tem como função a regulação de Bcl2, um gene com poderosa ação anti-apoptótica (Esquela-Kerscher e Slack, 2006).

Um dos miRNA mais estudados é o let-7, que é um conhecido regulador do oncogene RAS. Sua subexpressão é um fenômeno constante no câncer de pulmão, onde se correlaciona com diminuída sobrevida em pacientes submetido a tratamento supostamente curativo (Osada, Takahashi, 2010). Ras é uma proteína de membrana com atividade GTPase que induz a proliferação via Map-quinase. A introdução de let-7 em linhagens de câncer leva a diminuição dos níveis de Ras e diminuição na proliferação celular (Takamizawa et al., 2004).

1.4 miRNA no câncer de próstata

São poucos os estudos dedicados à avaliação dos perfis de miRNA em câncer de próstata, principalmente em espécimes clínicos. Porkka et al. (2007) publicaram um estudo de expressão de miRNA por técnica de *microarray* demonstrando subexpressão de 37 miRNA e superexpressão de 14 correlacionando com sua sensibilidade ao andrógeno. Shi et al. (2007) estudando apenas linhagens comerciais de carcinomas da próstata demonstraram um papel oncogênico de miR-125b que seria importante para o crescimento andrógeno-independente. Bonci et. al. (2008) publicaram a subexpressão de miR-15a e miR-16-1, reguladores de expressão de Bcl2 em linhagens de células de câncer de próstata.

Recentemente comparando os níveis de expressão de 14 miRNA em 18 adenocarcinomas de próstata com características desfavoráveis, com alto grau de Gleason e estágio pT3, com 4 tumores

metastáticos e 2 linhagens de câncer de próstata demonstramos uma mudança de expressão em três deles. Os miR-Let7c, miR-218 e miR-100 estiveram significativamente superexpressos nos tumores localizados em relação aos tumores metastáticos e linhagens tumorais sugerindo uma ação desses miRNA na progressão da neoplasia (Leite et al., 2011ab).

O miR-let7c foi um dos primeiros miRNA descritos e tem supostamente uma ação supressora em neoplasias. (Takamizawa et al., 2004) Porém essa simplificação é perigosa desde que a sua ação é muito mais complexa e sabidamente temporal. miR-let7c tem como alvos conhecidos os oncogenes RAS e MYC (Johnson et al., 2005). As anormalidades de RAS são incomuns no câncer de próstata sendo descritas mais freqüentemente na população japonesa. Por outro lado a amplificação de MYC é uma característica comum no câncer de próstata estando presente em metade das neoplasias intra epiteliais de alto grau e em mais de 70% dos carcinomas primários (Quinn et al., 2003). Entre as centenas de RNAm alvos de miR-let7c está o transcrito do gene BUB1(*budding uninhibited by benzimidazoles 1*). A proteína Bub1 tem papel específico no checkpoint mitótico e anormalidades na sua expressão levam a instabilidade cromossômica e aneuploidia em linhagens de fibroblastos humanos e de camundongos (Yoon et al., 2002). Subexpressão de Bub1 tem sido descrita em câncer de cólon aneuplóide (Vanaja et al., 2003) e tumor de Wilms (Best et al., 2003). Aneuploidia é um importante fator prognóstico em câncer de próstata e tem sido relacionado à progressão da doença independente do grau histológico de Gleason (Henshall et al., 2003).

Acreditamos que superexpressão de miR-let7c no carcinoma localizado da próstata haja como um supressor de Bub1 possibilitando uma instabilidade cromossômica e que sua subexpressão no câncer avançado permita a ação de Ras e c-Myc como agentes mitogênicos.

miR-218 tem sido descrito como subexpresso em câncer de ovário, mama e melanoma (Yoon e De Micheli, 2005; Esquela-Kerscher e Slack, 2006). Cheng et al. (2005) descreveram que a inibição de miR-218 em linhagem HeLa determinou uma diminuição na proliferação celular. Porém sabe-se que miR-218 reduz os níveis de RNAm e proteína Laminina 5 β 3 (LAMB3). LAMB3 aumenta a migração de células e a tumorigenicidade em camundongos SCID, e em colaboração com o seu ligante α 6 β 4-integrina promove tumorigênese em queratinócitos humanos (Calin et al., 2002). Assim nossa hipótese é que miR-let7c e miR-218 atuam diferentemente em cada passo da carcinogênese ativando o ciclo celular e induzindo a proliferação no início e permitindo a atuação de LAMB3 durante o estágio metastático.

miR-100 tem sido descrito como superexpresso em tumores de ovário (Takamizawa et al., 2004). Possíveis alvos de miR-100 são os genes THAP2, SMARCA5 e BAZ2A. THAP2 é um membro de uma família de proteínas recentemente descritas com ação regulatória da proliferação modulando pRb/E2F (Dahiya et al., 2008). Smarca5 também denominada SNF2h é um membro da família ISWI envolvida no remodelamento da cromatina implicada na replicação do DNA facilitando a síntese de DNA em células de mamíferos (Zahao et al., 2008). Zhou et al. (2002) demonstraram

que a superexpressão de BAZ2A também conhecida como TIP5 (ITF1 Interacting Protein 5) tem um efeito repressivo sobre a transcrição do DNA. Especulamos que a superexpressão de miR-100 identificada no câncer localizado tenha um papel na carcinogênese do adenocarcinoma de próstata influenciando a transcrição de DNA e proliferação em diferentes níveis propiciando a progressão da neoplasia e o desenvolvimento de metástases. Os micro RNA e suas proteínas alvo estão graficamente representados na figura 2.

Figura 2 – Relação dos miRNAs e as proteínas que tem sua expressão regulada pelos mesmos.

1.5 Papel das Proteínas Reguladas pelos miR-let7, 100 e 218

1.5.1 Smarca5

Smarca5 (SNF2H), (Collins et al., 2002) o homólogo humano do *Drosophila imitation switch gene* (ISWI), é membro da família de proteínas de remodelamento da cromatina SWI/SNF, que tem atividade helicase e ATPase (Mohamed et al., 2007). Smarca5 é mediador da acessibilidade a molécula de DNA deslizando o octâmero de histona e, portanto, é importante para a expressão gênica, replicação do DNA, reparo de DNA, e manutenção da estrutura cromatínica (Mohamed et al., 2007; Stopka e Skoultchi, 2003). É uma proteína essencial, já que a sua deleção é letal em estudos *knock-out* (Stopka e Skoultchi, 2003).

Os complexos de remodelação da cromatina usam a energia da hidrólise de ATP para mudar posições nucleossomais (Figura 3), de modo que regiões específicas do genoma se tornem acessíveis para interação com fatores de regulação (Becker e Horz, 2002). Estão envolvidos na ativação e repressão transcricional (Fyodorov e Kadonaga, 2001; Varga-Weisz, 2001) e anormalidades na sua função têm sido associadas a transformações malignas (Reisman et al., 2009).

Existe uma ilha CpG em 60% da região promotora de Smarca5 e no seu exon 1 (Li e Dahiya, 2002). Esta ilha CpG contém sítios de ligação de

fatores de transcrição sensíveis à metilação, como Sp1, MYB, CREB, AP1 e MZF1 (Gigek et al., 2011) sugerindo que a expressão de Smarca5 pode ser regulada por metilação. O mecanismo de regulação Smarca5 ainda é desconhecido.

Estudos de expressão diferencial mostraram que Smarca5 é prevalente em populações de células em proliferação (Lazzaro, Picketts 2001) e sua baixa expressão atrasa a replicação e impede a proliferação de células progenitoras hematopoéticas.

Figura 3 – Ação do complexo ISWI, do qual a proteína Smarca5 faz parte, no remodelamento da cromatina. Mostrando sua dependência de ATP e sua relação com o PCNA.

Já foi demonstrado que o RNAm da Smarca5 é abundante em células T primárias (Wuster e Pazin, 2008) e desempenha um papel direto na transcrição de genes de citocinas, sendo assim Smarca5 pode aumentar ou diminuir a expressão de gene, dependente de citocinas (Avni et al., 2002).

1.5.2 Retinoblastoma

O gene Retinoblastoma é um importante supressor de tumor. Forma, juntamente com os genes p107 e RLB2, a família dos genes Retinoblastoma. Esse gene foi primeiramente identificado em tumores malignos de retina associados a deleções na região cromossômica em que se localiza, em pacientes com história familiar desta doença (Claudio et al., 2002). O gene codifica uma fosfoproteína nuclear, chamada de proteína do Retinoblastoma (pRb). Essa proteína exibe quantidade constante e abundante, apresentando apenas discreta variação, em todas as fases do ciclo celular (Figura 4). Porém, seu estado de fosforilação depende da fase em que o ciclo se encontra, e ela também é alvo da atividade enzimática dos complexos CDK/ciclina (CHEN et al., 1989)

A via do Retinoblastoma responde em grande parte à presença ou ausência de sinais mitogênicos e regula o ciclo celular por meio de múltiplas funções. Está relacionada a controle de processos que afetam a proliferação e diferenciação celular e a apoptose (Adams e Kaelin Jr, 1998). Está

presente em todas as células e tecidos, porém se encontra mutada em muitos tipos de câncer. A proteína do Retinoblastoma pode inibir o crescimento da célula, atuando no ciclo celular entre as fases G0 e S, ligando-se e inativando fatores de transcrição (Claudio et al., 2002).

O fator E2F apresenta um importante papel no controle de transição de G1 para S (revisado em Dyson, 1998 e Helin, 1998), regulando a transcrição de uma série de genes que por sua vez induzem a entrada em S. Estudos demonstram que pRb também se liga a histonas desacetilases, sugerindo que a repressão de E2F por pRb seja devida a alteração na estrutura da cromatina. (Brehm et al., 1998; Luo et al., 1998; Zhang et al., 2000). A inibição de histonas desacetilases elimina a habilidade de pRb de reprimir diferentes fatores de transcrição, e a transcrição de E2F é potencializada por uma histona acetilase (Trousche e Kouzarides, 1996)

A forma hipofosforilada, ativa da proteína do Retinoblastoma inibe a função apoptótica do interferon gama ($\text{INF-}\gamma$), e o fator de crescimento transformante ($\text{TGF-}\beta 1$) induz a apoptose. (Claudio et al., 2002).

1.5.3 Laminina

A Laminina é uma glicoproteína de adesão, abundante na membrana basal (Figura 5) e exerce tanto atividades estruturais quanto biológicas (Martin e Timpl, 1987; Sasaki et al., 2004). Foi identificada em 1979 por Timpl e colaboradores depois de ser isolada e purificada a partir de uma neoplasia

apresenta isoformas resultantes da combinação das diferentes cadeias e é sintetizada por praticamente todas as células epiteliais onde logo após sua síntese deposita-se na membrana basal, contribuindo para a organização da membrana basal interagindo com o colágeno IV, nidogênio e proteoglicanos. (Figura 5) (Martin e Timpl, 1987; Malinda e Kleinman, 1996; Bosman e Stamenkovic, 2003; Miner e Yurchenco, 2004) Também tem sido identificada

em células musculares lisas, tecido ósseo, músculo cardíaco, células nervosas, endoteliais e de medula óssea.

Figura 5 – Localização da Laminina na membrana basal, e sua relação com outras proteínas de adesão com a membrana celular.

Além de funções estruturais a Laminina possui diversas atividades biológicas, como a promoção da adesão celular, migração proliferação e metastatização de tumores (Martin e Timpl, 1987; Malinda e Kleinman, 1996; Ponce et al., 2001; Bosman e Stamenkovic, 2003).

Na adesão de células malignas a Laminina foi a primeira atividade biológica demonstrada para essa proteína na progressão tumoral (Malinda e Kleinman, 1996). Também demonstra atividade quimiotática quando em solução, o que pode explicar sua habilidade em estimular movimentos celulares necessários aos processos de invasão e metástase (Martin e Timpl, 1987; Malinda e Kleinman, 1996).

1.5.4 Ras

Os genes Ras que codificam as proteínas foram identificados em mamíferos, pássaros, insetos, moluscos, plantas e fungos (Barbacid, 1987). A família compreende H-Ras, KRas 4A, K-Ras 4B, N-Ras, e outras proteínas homólogas como R-Ras, TC21, Rap e Ral (Kimmelman et al., 1997; Rebollo e Martínez-A, 1999).

São proteínas-G importantes mediadores de diferenciação, proliferação, transdução de sinais e transformação maligna induzida por fatores de crescimento (Bos, 1995; Reuter et al., 2000).

Ras é uma proteína monomérica de ligação a nucleotídeos de guanina, que é ativa quando ligada a GTP e inativa quando ligada a GDP,

possuindo uma atividade intrínseca de GTPase (Figura 6)(Haubruck e McCormick, 1991; Campbell et al., 1998).

Figura 6 – Ação da proteína Ras dependente de GTP. E sua relação com a via MAPK na proliferação celular.

A função da proteína Ras é controlada por um ciclo GTP-GDP, que, por sua vez, é regulado por, no mínimo, duas classes distintas de proteínas regulatórias. A primeira, uma proteína ativadora de GTPase (GAP) reconhece a proteína Ras ligada ao GTP e estimula a atividade intrínseca da GTPase para desfazer a ligação Ras-GTP, através de hidrólise. Este fator retorna a proteína Ras ligada ao GDP, portanto na sua forma inativa. A segunda, fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEF) promovem o

desacoplamento entre Ras e o GDP para permitir a ligação espontânea entre Ras e GTP, pois a concentração de GTP no citosol é muito mais elevada que a de GDP. Esta conformação Ras-GTP é a forma ativa da proteína, que desencadeia a cascata sinalizadora (Haubruck e McCormick, 1991; Campbell et al., 1998)

A mutação de Ras está associada com muitos tipos de câncer humano (Kumar et al., 1990; Hunter, 1997). Mantém-se ligada ao GTP, estando permanentemente em seu estado ativo promovendo a transformação neoplásica.

As proteínas Ras participam do processo de controle de múltiplos eventos celulares envolvendo o crescimento, a diferenciação, a apoptose, a organização citoesquelética e o tráfego de membrana, tendo papel central nessa regulação, dependendo do tipo celular e das condições ambientais do tecido ao qual a célula pertence (Rowinsky et al., 1999; Bos, 2000).

A cascata de eventos da ativação da proteína Ras é desencadeada pelo estímulo do receptor por um ligante, por exemplo, EGF ou PDGF. O receptor tirosina-quinase ativa a rota do Ras através de uma proteína adaptadora (Grb e Sos). A ativação de Ras leva a entrada em ação da Raf Ser/Thr quinase, que por sua vez, estimula a quinase MEK (Hill e Treisman, 1995; Kivinen et al., 1998; Kolch, 2000). A cascata de eventos de fosforilação leva, em última instância, a fosforilação de fatores de transcrição, que desencadeiam mudanças na atividade celular, que vão desde a multiplicação até a diferenciação, dependendo do tipo celular

(Figura 6)(Porter e Vaillancourt, 1998, Sternberg e Alberola-Ila, 1998; Therrien et al., 1998).

Quando a mitogênese é desencadeada pela ativação de um fator de crescimento ou quando uma célula é transformada para um estado tumorigênico, ocorre uma série de eventos coordenados, que incluem as mudanças da transcrição e modificação da estrutura celular. A ativação da rota de Ras/MAPK envolve fatores de transcrição que tem papel importante em um conjunto de modificações, inclusive a transformação tumorigênica (Der et al., 1996).

1.5.5 C-Myc

C-Myc é um proto-oncogene importante na transição G0 – G1 – S. É expresso em células estimuladas para a entrada em G1 e os níveis do RNAm e da proteína estão elevados durante a fase G1 do ciclo tendo um papel fundamental no seu controle estabelecendo uma relação com as ciclinas, principalmente a D e E. (revisado em Obaya et al., 1999). (Cochran et al., 1983).

A proteína c-Myc age como fator de transcrição quando dimerizada com a proteína Max (Figura 7). Estas proteínas são classificadas como fatores de transcrição HLH/LZ, isto devido ao fato de apresentarem domínios para dimerização, ligação a DNA e domínio transativador. A proteína c-Myc também está relacionada com o processo de morte celular, principalmente no caso de proliferação descontrolada e falta de nutrientes. Sabe-se, por

exemplo, que a expressão constitutiva de c-Myc leva a transformação celular de vários tipos de linhagens estruturadas, mas a superexpressão de c-Myc pode levar a morte celular. (Blackwood e Eisenman, 1991).

O dímero c-Myc/Max pode funcionar como um regulador geral da estrutura da cromatina (McMahon et al., 2000) Por outro lado este dímero pode agir como um fator de transcrição, podendo inibir a transcrição. (Roy et al., a b 1993).

Figura 7 – Relação do c-Myc com a proteína MAX. E a associação das duas proteínas relacionadas com a parada do ciclo celular.

1.5.6 Bub1

A quinase Bub1 foi identificada pela primeira vez em leveduras de brotamento, e mais tarde foram identificados homólogos em mamíferos (Hoyt et al., 1991). Esta proteína desempenha um papel importante nos checkpoints mitóticos, com ação em muitos níveis da mitose e segregação cromossômica. Bub1 é constitutivamente associada com a proteína Bub3, e parece também fazer parte do complexo BubR1. (Larsen et al., 2007; Wang et al., 2001b; Taylor et al., 2001)

Figura 8 – Relação do Bub1 com a proteína Cdc20 e cinetócoro livre

Bub1 pode inibir diretamente a APC/C de forma catalítica fosforilando a proteína Cdc20. (Figura 8) Não só Bub1 pode regular APC/C, mas também o inverso é verdadeiro (Qi, Yu, 2007). Estudos com RNAi indicam que Bub1 desempenha um papel fundamental para o recrutamento de proteínas relacionadas ao checkpoint e outras proteínas motoras como Mad1, Mad2,

BubR1, CENP-E e Plk1. (Sharp-Baker e Chen 2001; Johnson et al., 2004; Meraldi et al., 2004)

Suas anormalidades estão relacionadas a instabilidade cromossômica e aneuploidia em fibroblastos de camundongo e linhagens celulares de carcinomas humanos. A subexpressão de Bub1 tem sido descrita em carcinomas colorretais aneuploides (Grady, 2004) e no tumor de Wilms (Haruta et al., 2008).

1.5.7 Ki-67 e proliferação

A proteína Ki-67 pertence a um grupo de moléculas que estimula o crescimento tumoral através da aceleração do ciclo celular e da proliferação, sendo expressa durante as fases G1, S, e G2 do ciclo (Schliephake, 2003).

É uma proteína não-histona de 345-395kd presente no nucléolo das células proliferativas, bem como na cromatina condensada das células mitóticas. O gene que codifica o antígeno Ki-67 localiza-se no cromossomo 10 (Brown e Gatter, 1990; Adriaenssens et al., 1998; Andersen et al., 1998).

O anticorpo monoclonal Ki-67 foi descrito por Gerdes em 1993, este anticorpo reconhece um antígeno do núcleo que é expresso exclusivamente em células que estão se proliferando. Desta forma, esse anticorpo tem sido usado largamente como marcador de proliferação celular. Acumula-se no núcleo da célula de G1 até a mitose, quando então vai diminuindo rapidamente a intensidade de sua coloração. (Soini et al., 1994). Está localizada no córtex nuclear em densos componentes de fibrila do núcleo, os

quais durante a mitose se associam aos cromossomos condensados na periferia (Isola et al., 1990; Verheijen et al., 1989a; Verheijen et al., 1989b).

2.Objetivos

2.1 Objetivo Primário

Analisar a expressão das proteínas controladas pelo mir-let7c (Ras, Myc e Bub1), mir-100 (Smarca5 e pRb) e mir-218 (Laminina 5 β 3) e a atividade proliferativa (Ki-67) no câncer de próstata com a técnica de imuno-histoquímica utilizando microarranjos teciduais representativos de:

1. Carcinoma localizado de próstata
2. Metástases linfonodais de carcinoma de próstata
3. Metástases ósseas de carcinoma de próstata

2.2 Objetivos Secundários

Correlacionar os níveis de expressão de miRNA let7c, 100 e 218 em relação a imunoexpressão de proteínas controladas por eles Ras, c-Myc, Bub1, Laminina 5 β 3, Smarca5 e pRb.

Comparar a expressão dos micro RNA, proteínas e atividade proliferativa com os fatores prognósticos do câncer de próstata e com a evolução da doença.

3. Materiais e Métodos

Para a análise do papel destas proteínas no CaP, realizamos um estudo caso-controle onde associamos a expressão destas com seu miRNA correspondente, recidiva bioquímica, PSA pré operatório, Gleason e estadiamento patológico.

3.1 Pacientes (Critérios e inclusão e exclusão)

Avaliamos retrospectivamente 954 pacientes com CaP localizado tratados com prostatectomia radical com intenção curativa entre janeiro de 1994 e abril de 2000, todas realizadas pelo Prof. Miguel Srougi(MS).

Desta população, foi selecionado aleatoriamente os pacientes de nosso estudo, sendo respeitados os critérios de inclusão, que foram: i. seguimento pós operatório de pelo menos 10 anos, ii. disponibilidade e adequação dos blocos de parafina, iii. assinatura do termo de consentimento.

3.2 TMA

A imunoexpressão foi avaliada através de IH pela técnica de microarranjo tecidual ou “tissue microarray” (TMA). O TMA é uma coleção organizada de amostras teciduais dispostas sob a forma de uma matriz, onde cada amostra é suficientemente grande para ser representativa, e convenientemente pequena para permitir o uso não predatório do bloco

doador, permitindo utilização racional dos reagentes a serem aplicados na amostra em condições experimentais homogêneas.

Utilizamos três diferentes TMA caracterizando os diferentes estádios do carcinoma de próstata. Todos os espécimes estão representados em duplicada nos blocos e existem fragmentos de tecido prostático não neoplásico como controle.

3.3 Carcinoma localizado

Cento e doze pacientes foram submetidos à prostatectomia radical pela equipe do Prof. Miguel Srougi entre janeiro de 1995 a dezembro de 1997 para tratamento de câncer localizado de próstata. Os dados clínicos e demográficos estão expostos na tabela 1. A idade média dos pacientes no momento da cirurgia foi de 63,6 anos variável de 41 a 79, o PSA médio foi 10,8 ng/mL (1,2 a 45,0 ng/mL), o escore de Gleason médio de 7,2 (6 – 9) e o seguimento médio de 79 meses variável de 20 a 120. Quarenta e quatro (39,6%) pacientes apresentaram recidiva bioquímica ($PSA > 0,4$ ng/mL). O bloco contendo a área mais representativa do tumor foi selecionada, sendo duas áreas marcadas para a construção do TMA.

Tabela 1 – Dados clínicos e demográficos do estudo caso controle de acordo com recorrência ou não do tumor após a cirurgia.

	Recorrência (n=45)	Não recorrência (n=67)	valor p
Idade (anos)			
Mediana (Q1 – Q3)	65 (60 – 68)	65 (60 – 69)	
Mínimo – Máximo	45 – 74	41 – 79	0.687
PSA_{pre} (ng/mL)			
Mediana (Q1 – Q3)	9.3 (7.6 – 14.2)	7.6 (4.9 – 10.1)	
Mínimo – Máximo	4.2 – 45.0	1.2 – 38.0	0.004
Estadio patológico			
T2	41 (80.4%)	51 (85.0%)	
T3	10 (19.6%)	9 (15.0%)	0.521
Gleason			
≤6	9 (17.6%)	20 (33.3%)	
≥7	42 (82.4%)	40 (66.7%)	0.061

3.3.1 Metástases linfonodais de carcinoma de próstata

Dezenove pacientes submetidos à prostatectomia radical por CaP cujo anátomo patológico evidenciou metástase linfonodal representam o segundo TMA. A idade média dos pacientes foi de 66 anos e o tempo médio de seguimento de 3,4 anos. Nenhum dos pacientes recebeu quimioterapia ou radioterapia previamente à cirurgia e apenas um foi submetido à deprivação androgênica neoadjuvante. O escore de Gleason era 10 em três casos, 9 em dez casos, 8 em cinco casos e 7 em apenas um caso. Além da metástase linfonodal, 16 pacientes apresentavam também

extensão extra capsular e invasão de vesículas seminais, dois apresentavam extensão extra capsular e um tinha doença confinada à próstata. O volume tumoral médio era de 45cm^3 , variável de 7 a 100cm^3 .

Os blocos contendo o tumor primário e a metástase linfonodal (tecido linfonodal) foram selecionados e as áreas representativas do tumor foram marcadas. Uma área da metástase e duas do tumor primário foram selecionadas para a construção do TMA.

3.3.2 Metástases ósseas de carcinoma de próstata

Este TMA foi construído com espécimes de tecido ósseo de 28 pacientes com metástases ósseas com a idade média de 67,3 anos variável 43 a 87 anos. As metástases ósseas eram localizadas no fêmur (16), osso ilíaco (2), vértebra (6), escápula (2), úmero (2) e osso púbico (1). Em seis pacientes dispúnhamos também das amostras do tumor primário, consistindo de espécimes provenientes de biópsia de próstata ou produto de prostatectomia radical. O escore de Gleason destes tumores primários era 6 em um caso, 7 em dois casos, 8 em um caso e Gleason 9 em dois casos. O PSA era disponível em 7 casos; o valor médio do PSA foi de 553 ng/mL, mediana de 100 ng/mL, variável de 32 a 2140 ng/mL. Nenhum dos pacientes recebeu quimioterapia ou radioterapia, 11 pacientes apresentaram metástase óssea como primeiro sinal do câncer de próstata e não receberam terapia prévia, 8 pacientes receberam terapia de deprivação androgênica, e em 9 pacientes houve perda do seguimento.

3.4 Estudo imuno-histoquímico

As reações foram realizadas pela técnica da Streptavidina, biotina peroxidase (StrepABC). As lâminas foram desparafinadas em estufa a 60°, seguido de banhos de xilol, e recuperação antigênica com tampão citrato em pH 6,0 em panela de pressão. Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 2. Os resultados foram avaliados por análise estatística, comparando as diferenças de expressão dos diferentes anticorpos em relação aos diferentes estágios do tumor, (primário, metastático em linfonodo e metastático em tecido ósseo). Ainda avaliamos a evolução dos pacientes com tumores localizados em relação ao nível de expressão das diferentes proteínas.

Tabela 2 – Anticorpos utilizados para análise do nível de expressão de proteínas controladas pelos miRNA miR-let7c, miR-100 e miR-218.

Anticorpo	Clone	Marca
PanRas	F132	Santa Cruz
c-Myc	0.N.222	Santa Cruz
Bub1	Policlonal	Abcam
Ki-67	Policlonal	Millipore
Laminina	4C7	Dako
pRb	IF8	Chemicon
Smarca5 (hSNF2H)	H-300	Santa Cruz

3.5 Análise computadorizada das marcações imuno-histoquímicas

A captura das imagens foi feita em microscópio óptico, objetiva 40x (Nikon Eclipse E200) acoplado a uma câmera fotográfica (Nikon DsFi1) utilizando o programa *NIS- Elements D 3.1*.

A intensidade de luminescência das imagens foi quantificada densitometricamente usando o *software* de análise de imagem digital MacBiophotonics ImageJ do *National Institutes of Health, EUA* com o pacote de “*plug-ins*” desenvolvido pela Universidade MacMaster (<http://www.macbiophotonics.ca/imagej>).

As imagens foram submetidas ao procedimento de deconvolução de cores específico para reações imuno-histoquímicas utilizando diaminobenzidina (DAB) como agente cromogênico dos anticorpos e a contra-coloração com a hematoxilina de Harris o que resultou na derivação da imagem original em três imagens: cores consideradas “ruído da imagem” ou fundo, hematoxilina diaminobenzidina (Figuras 9 a 11).

Figura 9 – Abertura da imagem no sistema de análise de imagem.

Figura 10 – Escolha da metodologia referente ao agente cromogênico, no caso a DAB e a coloração de fundo, hematoxilina de Harris.

Figura 11 – Separação das imagens em “fundo”, DAB e hematoxilina de Harris.

A imagem analisada é aquela referente a DAB sendo previamente determinado um padrão de avaliação denominado *threshold* que identifica as áreas consideradas como verdadeiramente positivas. Determinado esse padrão, as demais lâminas são analisadas com os mesmos parâmetros. É possível que a medida seja considerada em área e intensidade de coloração (Figuras 12 a 15).

Figura 12 – Obtenção do *threshold*. Em preto estão as áreas consideradas positivas. Os números apontados na pequena tela à direita são mantidos para análise de todos os casos.

Figura 13 – Análise da intensidade de coloração e área de marcação correspondente apenas a DAB.

Figura 14 – Medida da marcação.

Figura 15 – Registro da área marcada e intensidade de coloração.

3.6 Isolamento do RNA total

Estudamos o perfil de expressão dos três miRNA de 61 pacientes (selecionados aleatoriamente) dos 112 pacientes com carcinoma localizado, que foram submetidos a análise protéica por imuno-histoquímica.

Para extração de miRNA dos espécimes parafinados um corte de 10µm do bloco de parafina correspondente ao tumor representado no TMA foi colocado em tubo de microcentrífuga e incubado com 1ml de xilol a 50°C por 3 h para remoção da parafina. Uma lâmina corada com Hematoxilina e Eosina foi examinada para garantia de representatividade de pelo menos 75% de tumor. Após centrifugação por 2 min a 14.000 rpm o xilol foi descartado e feitos dois banhos com etanol 100% (1ml), sendo realizadas duas centrifugações por 2 min a 14.000 rpm após cada banho. Adicionou-se então protease (8µl) e tampão de digestão (800µl), deixando em incubação por 3 h a 50°C. Adicionou-se 480µl de solução aditiva, seguida por agitação em vortex. Adicionou-se 1,1ml de etanol a 100%, após mistura a solução foi transferida para a coluna GFX em um volume máximo de 700µl. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 1min. A coluna foi lavada com 700µl de solução de lavagem 1. Descartamos o sobrenadante e lavamos a coluna com 500µl da solução de lavagem 2/3. Houve nova centrifugação a 10.000 rpm por 30 seg, descartamos o sobrenadante, centrifugamos novamente a 10.000 rpm por 30 seg, ressuspensando o *pellet* em 60µl de DNase mix, constituído por 6µl de 10X tampão DNase, 4µl de DNase e 50µl de H₂O livre de nucleases, a 95°C. Deixamos repousar em temperatura ambiente por 30 min, lavamos com 700µl de solução de lavagem 1, mantendo incubado por 1 min a

temperatura ambiente. Centrifugamos a 10.000 rpm por 30 seg, descartamos o sobrenadante, lavamos por duas vezes com 500µl de solução de lavagem 2/3, seguindo após cada lavagem uma centrifugação a 10.000 rpm por 30 seg. Descartamos o sobrenadante, submetemos a nova centrifugação com adição de 60µl de solução de eluição a 95°C. Deixamos por 1 min a temperatura ambiente, centrifugamos a 14.000 rpm por 1 min e armazenamos a solução a -20°C até o experimento. Do mesmo modo as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA), e a integridade verificada em Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, CA, EUA).

3.7 Transcrição reversa (RT)

O miRNA foi diluído em água livre de nucleases e deste foi utilizado 5 µl , onde foram adicionados 0,15 µl do mix de dNTPs (100 mM total), 0,5 µl da enzima MultiscribeTM RT enzyme (50 U/ µl), 1,5 µl do tampão da enzima (RT Buffer 10X), 0,19 µl de inibidor de RNase (20 U/ µl), 4,66 µl de água livre de nucleases e 3 µl de *primers* específicos para cada miRNA.

As misturas foram submetidas a 16°C por 30 min, 42°C por 30 min e 85°C por 30 min em um termociclador para síntese da fita de cDNA.

3.8 Amplificação do miRNA

Todas as amostras com coeficiente 28S/18S superior a 1.8 foram utilizadas para a determinação dos níveis de expressão de miRNA. Para isso quantificamos 3 miRNA selecionados de um total de 156 disponíveis (TaqMan miRNA Assays; Applied Biosystems). Os miRNA estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 – miRNA estudados em pacientes com carcinoma de próstata favoráveis e desfavoráveis.

miRNA	Gene alvo	Referência
Let-7c	<i>RAS, MYCC, HMGA2, BUB1</i>	Johnson et al., 2005 Johnson et al., 2007 Mayr et al., 2007 Sampson et al., 2007
100	<i>THAP2, KBTBD8, C4orf16, SMARCA5, BAZ2A, VLDLR</i>	Bessi�re et al., 2008
218	Coativador 3 do receptor nuclear, Proteína tirosina quinase <i>FRK</i> , Proteína treonina/serina quinase <i>DCAMKL1</i> , antígeno nuclear induzido por <i>MYC</i> , Laminina 5 β 3	Volinia et al., 2006

Os *primers* que foram utilizados para amplificao dos genes foram desenhados com o auxlio do programa primerExpress (Applied Biosystems, California, USA), que desenha *primers* com as caractersticas necessrias para os experimentos de *Real Time* PCR no termociclador ABI 7500 Fast. As principais caractersticas destes oligos so: amplificar fragmentos cujo tamanho mximo no exceda 20 pb, quantidade moderada de CG (40-60%), no possuir capacidade de anelar entre si ou formarem estrutura secundria,

e temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C. Levando em conta os parâmetros citados, os *primers* então foram desenhados para cada um dos genes que foram analisados.

Para quantificação das amostras foi utilizado o reagente TaqMan (Applied Biosystems, California, USA). Este protocolo utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela *Taq* polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* da fluorescência emitida que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite então a detecção do produto de PCR em tempo real (qRT-PCR).

3.9 Análise dos resultados

Para analisar os dados obtidos, utilizamos um controle endógeno em cada placa de reação. Isto nos permitiu uma comparação relativa entre os diversos experimentos realizados. O controle utilizado foi o RNU-43 (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados usando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ onde $\Delta\Delta C_T$ [$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ miRNA alvo, espécime CaP} - C_T \text{ RNU43, espécime CaP}) - (C_T \text{ miRNA alvo, tecido normal} - C_T \text{ RNU43, tecido normal})$]. Os valores

relativos obtidos ($\delta Ct = Ct \text{ do miRNA} - Ct \text{ do RNU43}$) foram analisados com o programa CLUSTER, que permite a identificação de miRNA diferencialmente expressos no carcinoma de próstata em relação ao tecido prostático normal. Além disso utilizamos 5 amostras de HPB, como o padrão normal (sem câncer), para fins de comparação.

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software SPSS 19.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Para as variáveis ordinais, de distribuição homogênea utilizamos o teste T de Student. Quando a distribuição dos grupos não era homogênea utilizamos para análise testes não paramétricos de Mann-Whitney. Para três ou mais variáveis ordinais utilizamos o teste de ANOVA quando as variáveis foram homogêneas e o teste de Kruskal-Wallis quando heterogêneas. Utilizamos o teste do qui-quadrado para comparar valores de escala nominal. O valor de p foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05 (para todos os cálculos).

4.Resultados

4.1 Análise da expressão protéica por imuno-histoquímica dos genes controlados por miRNA

A análise microscópica das proteínas foi realizada em microscópio ótico em aumento de 40x e considerado para as proteínas com expressão citoplasmática (Ras, Bub1 e Laminina) a média de intensidade de expressão (unidade arbitraria). Para as proteínas com expressão nuclear (c-Myc e Smarca5) a porcentagem de área corada. Já para Ki-67 e Retinoblastoma, cuja positividade também foi nuclear, avaliamos porcentagem de núcleos corados. Os resultados estão resumidos na tabela 5.

Tabela 4 – Porcentagem de perda de amostras, em cada tipo tumoral, nas proteínas analisadas.

Anticorpo	% de perda CaP Localizado	% de perda Metástase LN	% de perda Metástase Óssea
Smarca5	2,6%	21%	23,7%
Retinoblastoma	8%	42,1%	7,6%
Laminina	13,39%	36,8%	11,5%
Ras	1,7%	26,3%	7,6%
c-Myc	4,4%	21%	15,3%
Bub1	4,4%	36,8%	7,6%
Ki-67	14,2%	42,1%	30,7%

A perda de amostras nos diversos cortes do TMA avaliados variou de 1,7% a 42,1% De acordo com a tabela 4. Nota-se que o número final de

casos sem resultado por marcador variou de 2 a 16 casos, o que denota perda final aceitável em nossa análise.

4.1.1 Expressão de proteínas controladas pelo miR-Let7c no carcinoma de próstata localizado, metastático em linfonodo e em osso

4.1.1.a Ras

O padrão de expressão de Ras foi citoplasmático e eventualmente nuclear, como demonstrado na figura 16. Houve uma média de expressão do antígeno de 124,93 nos casos de carcinoma de próstata localizado, de 17,64 nos carcinomas metastáticos em linfonodo e de 104,04 nas metástases ósseas. (Tabela 5) Essa perda de expressão em relação ao tumor localizado e a metástase linfonodal, e o ganho de expressão da metástase linfonodal para a óssea mostrou-se significativa do ponto de vista estatístico ($p=0,017$).

Figura 16 – Imunoexpressão de Ras no Carcinoma Localizado da Próstata padrão nuclear (A), padrão citoplasmático (B). Expressão de Ras na metástase linfonodal (C) e metástase óssea (D).

4.1.1.b C-Myc

O c-Myc apresentou uma porcentagem de área corada de 40,15% nos casos de carcinoma de próstata localizado. Observamos uma maior positividade nuclear associada à expressão citoplasmática. No TMA de metástases linfonodais, observamos um aumento de expressão de c-Myc, para 57,25%. Já nas metástases ósseas observamos uma pequena perda na expressão da proteína que apresentou uma porcentagem de área corada de 51,74% nos casos. (Tabela 5) Embora tenha havido diminuição na porcentagem de área corada representativos da progressão da neoplasia,

essa diferença não foi significativa do ponto de vista estatístico ($p= 0,253$) (Figura 17).

Figura 17 – Imunoexpressão de c-Myc no carcinoma localizado da próstata (A e B), na metástase linfonodal (C), e na metástase óssea (D).

4.1.1.c Bub1

O padrão de expressão de Bub1 foi em geral nuclear e citoplasmático, mas de modo interessante não havia expressão focal, sendo os casos completamente negativos ou completamente positivos. No carcinoma de próstata localizado uma média de intensidade de expressão imuno-histoquímica de Bub1 de 164,65. Observamos nas amostras de metástases

linfonodais uma perda na expressão de Bub1 para 144,19, mas de novo na metástase óssea houve um aumento de expressão da proteína com média de 152,56. (Tabela 5) Porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,649$) (Figura 18).

Figura 18 – Imunoexpressão de Bub1 no carcinoma localizado da próstata (A e B), na metástase linfonodal (C), e na metástase óssea (D).

4.1.2 Expressão de proteínas controladas pelo miR-100 no carcinoma de próstata localizado, metastático em linfonodo e em osso

4.1.2.a Smarca5

A expressão de Smarca5 tem padrão nuclear e na análise de expressão da proteína no CaP localizado observamos um valor muito

expressivo de porcentagem de área corada de 68,04%. Na metástase linfonodal obtivemos uma perda de expressão de Smarca5 sendo que a porcentagem de área foi de 48,42%. (Tabela 5) Nas metástases ósseas encontramos um ganho de expressão de SAMARCA5, onde a porcentagem de área corada foi de 80,54%, (Figura 19) sendo essas alterações de expressão de SAMRCA5 conforme a progressão tumoral não significante estatisticamente ($p=0,315$).

Figura 19 – Imunoexpressão de Smarca5 no carcinoma localizado da próstata (A e B), na metástase linfonodal (C), e na metástase óssea (D).

4.1.2.b Retinoblastoma

A expressão de pRb teve padrão nuclear (Figura 20) sendo a média de núcleos positivos no CaP localizado de próstata foi de 12,5%. Em

metástases linfonodais houve um aumento de expressão de pRb cuja média foi de 25,7%. Já nas metástases ósseas a pRb sofre uma pequena perda de expressão para 20,2%. (Tabela 5) Esse aumento de expressão de pRb conforme a progressão tumoral foi significativo estatisticamente ($p= 0,036$) quando comparamos a expressão de pRb no CaP localizado e na metástase linfonodal.

Figura 20 – Imunoexpressão de Retinoblastoma no tecido normal (A), carcinoma localizado da próstata (B), na metástase linfonodal (C), e na metástase óssea (D).

4.1.3 Expressão de proteínas controladas pelo miR-218 no carcinoma de próstata localizado, metastático em linfonodo e em osso

4.1.3.a Laminina

A Laminina apresentou uma positividade citoplasmática nas células tumorais e no estroma, junto à camada basal nos tumores localizados, enquanto que na metástase linfonodal a positividade foi citoplasmática. (Figura 21) No tumor localizado a média de intensidade de expressão foi de 127,28. (Tabela 5) Praticamente a mesma proporção de casos de metástase linfonodais mostrou imunoexpressão da proteína com média de 132,49. Porém em metástases ósseas a expressão de Laminina apresentou uma média de apenas 9,21, sendo essa perda de expressão significativa do ponto de vista estatístico ($p < 0,0001$).

Figura 21 – Imunoexpressão de Laminina na membrana basal do carcinoma localizado da próstata (A), padrão citoplasmático no carcinoma localizado da próstata (B), na metástase linfonodal (C), e na metástase óssea (D).

4.1.4 Atividade proliferativa com o uso de Ki-67

Observamos nas amostras de tumor localizado uma média de núcleos (Figura 22) corados de 11,22% para o Ki-67. Já em metástase linfonodais encontramos um aumento na expressão de Ki-67, onde a média de núcleos corados foi de 22,31%. Já em metástase óssea obtivemos um aumento expressivo de nos valores de núcleos corados 42,5% ($p < 0,0001$). (Tabela 5)

Figura 22 – Imunoexpressão de Ki-67 no carcinoma localizado da próstata (A), na metástase linfonodal (B), e na metástase óssea (C).

Tabela 5 – Expressão das proteínas cujo gene é um provável alvo dos miRNA Let7c, 100 e 218 avaliadas por imuno-histoquímica.

	Localizado	Linfonodo	Osso	P=
Ras				
Média de intensidade	124,93	17,64	104,04	0,017
c-Myc				
Porcentagem de área corada	40,15%	57,25%	51,74%	0,253
Bub1				
Média de intensidade	164,65	144,19	152,56	0,649
Laminina	127,28	132,49	9,21	<0.0001
Média de intensidade				
Smarca5				0,315
Porcentagem de área corada	68,04%	48,42%	80,54	
Retinoblastoma				
Média de núcleos corados	12,5%	25,7%	20,2%	0,036
Ki-67				
Média de núcleos corados	11,2%	22,3%	42,5%	<0.0001

4.2 Correlação dos níveis de expressão dos miRNA Let7c, 100 e 218 com suas proteínas alvo

4.2.1 Expressão dos miRNA Let7c, 100 e 218 no CaP localizado

Os perfis de expressão dos miRNA dos CaP localizados estão expostos na figura 23. Todos os miRNA se mostraram superexpressos no CaP em relação ao tecido normal. MiR-100 e miR-218 apresentaram superexpressão em 98,4% dos casos e miR-let7c foi superexpresso em 92% dos casos, confirmando resultados de estudo prévio (Leite et. Al, 2011).

Figura 23 – Gráfico ilustrando o perfil de expressão dos 3 miRNA em 61 carcinomas de próstata localizados.

4.2.2 Correlação dos níveis de expressão dos miRNA Let7 com suas proteínas alvo (Ras, c-Myc e Bub1)

Utilizamos a mediana de 4,7 de expressão do miR-Let7c. Observamos que a expressão de c-Myc apresenta uma média de expressão de 47,48 nos casos onde o miR é $\leq 4,7$ por outro lado nos casos onde a média de miR é $> 4,701$ a média de expressão de c-Myc foi de 36,86, embora essa diferença não tenha sido significativa ($p=0,368$). O mesmo fenômeno pôde ser observado em relação à expressão de Ras, onde a média de expressão da proteína foi de 142,47 nos casos onde miR é $\leq 4,7$ por outro lado nos casos onde a média de miR é $> 4,701$ a média de expressão de Ras foi de 108,96, embora essa diferença também não tenha sido significativa ($p=0,266$). Com Bub1 a expressão da proteína foi maior nos os casos que apresentaram expressão do miRNA $> 4,701$ ($p=0,355$). (Tabela 6)

4.2.3 Correlação dos níveis de expressão dos miRNA 100 com suas proteínas alvo (Smarca5 e Retinoblastoma)

Quanto ao miRNA utilizamos a mediana de expressão de miR-100 de 16,32 para Smarca5 e de 9 para Retinoblastoma. Smarca5 apresentou uma média de expressão maior nos casos onde a expressão de miR foi $\leq 16,32$ ($p= 0,391$). Em relação à imunoexpressão de Retinoblastoma a mediana de expressão do miRNA utilizada, foi de 9 sendo que a expressão de Retinoblastoma foi maior nos casos com cuja a expressão do miR foi ≤ 9 ($p=0,213$). (Tabela 6)

4.2.4 Correlação dos níveis de expressão dos miRNA218 com sua proteína alvo (Laminina)

Para miR-218 utilizamos uma mediana de expressão de 27,1. Observamos que Laminina apresentou uma média de intensidade de expressão maior quanto maior a expressão do miR-218 ($p=0,038$). (Tabela 6)

Tabela 6 – Correlação da expressão protéica com seus miRNA.

miRNA	Proteína	Mediana	P=
Let7c	c-Myc	$\leq 4,7 - 47,48$	0,368
		$> 4,701 - 36,86$	
	Bub1	$\leq 4,7 - 183,22$ $> 4,701 - 198,45$	0,355
100	Ras	$\leq 4,7 - 142,47$	0,266
		$> 4,701 - 108,96$	
	Smarca5	$\leq 16,32 - 81,37$ $> 16,321 - 76,86$	0,391
218	Retinoblastoma	$\leq 9 - 68,04$	0,356
		$> 9 - 33,15$	
	Laminina	$\leq 27,1 - 128,9$ $> 27,101 - 171,67$	0,038

4.3 Expressão de miRNA e fatores prognósticos, estadiamento, PSA e Recidiva

Os três miRNA estudados mostraram uma maior expressão relacionada aos casos onde o PSA pré-operatório foi maior que 10 ng/mL, apesar de não tenha havido significância estatística (Tabela 7).

Tabela7 – Relação dos miRNA com o PSA pré-operatório

Micro RNA						
Média (DP)						
PSA ng/mL	Let7c		100		218	
	≤10	>10	≤10	>10	≤10	>10
	8,13 (53,86)	21,45 (14,73)	28,13 (176,15)	78,10 (65,63)	32,27 (383,43)	170,60 (167,97)
P=	0,152		0,816		0,508	

O mesmo ocorreu na análise da relação entre o escore de Gleason e a expressão dos miRNA. Notamos maiores níveis de expressão dos miRNA nos tumores com escore de Gleason maior ou igual a 7 (Tabela 8).

Ao contrário quando comparamos a expressão dos miRNA com o estadiamento patológico notamos uma média de expressão maior nos casos de tumores localizados, estadiados pT2 (Tabela 9). Porém também não encontramos nenhuma significância estatística nestes resultados.

Tabela 8 – Relação dos miRNA com o valor de Gleason dos casos.

Micro RNA						
Média						
Let7c		100		218		
Escore de Gleason	≤6	>7	≤6	>7	≤6	>7
	5,48	17,27	23,71	59,69	38,53	118,63
	(4,60)	(50,09)	(27,87)	(166,51)	(32,12)	(380,00)
P=	0,354		0,694		0,391	

Da mesma forma observamos uma maior expressão dos miRNA nos casos que não recidivaram em relação aos casos que recidivaram, embora também não tenha havido significância estatística (Tabela 10).

Tabela 9 – Relação de expressão dos miRNA com o estadiamento patológico dos carcinomas de próstata.

Micro RNA						
Média (DP)						
Let7c		100		218		
pT	2	3	2	3	2	3
	15,40	7,75	56,63	21,26	109,47	36,30
	(47,14)	(7,00)	(158,68)	(13,32)	(345,87)	(29,48)
P=	0,613		0,466		0,509	

Tabela10 – Relação de expressão dos miRNA com recidiva bioquímica.

Micro RNA						
Média (DP)						
Let7c		100		218		
Recidiva bioquímica	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
	6,26	19,74	21,36	70,52	43,17	135,92
	(6,12)	(55,91)	(24,34)	(184,95)	(46,32)	(410,78)
P=	0,190		0,155		0,505	

4.4 Expressão de miRNA e curvas de sobrevida

Foram construídas curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com as expressões dos miRNA, com um tempo de seguimento médio 79,2 meses; As figuras 24 e 25 mostram as curvas de sobrevida livre de recidiva bioquímica em relação aos níveis de expressão de miRNA Let7c ($p=0,653$), miRNA 100 ($p=0,152$) e miRNA 218 ($p=0,958$), que não apresentaram significância estatística.

Figura 24 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão dos miRNA- let7c e 218. Mediana utilizada para o miR-let7c de 17 e para o miR-218 de 119.

Figura 25 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão do miRNA-100. Mediana utilizada para o miR-100 de 62.

4.5 Expressão das proteínas Ras, c-Myc, Bub1, Smarca5, pRb e Laminina e os fatores prognósticos, escore de Gleason, estadiamento e PSA pré-operatório

O estudo das proteínas mostrou uma expressão maior nos casos onde o PSA pré-operatório foi ≤ 9 ng/mL, apenas c-Myc e Smarca5 apresentaram uma expressão maior quando o PSA pré-operatório foi > 10 ng/mL, embora sem significância estatística (Tabela 11).

Tabela 11 – Relação de expressão protéica com os níveis de PSA pré-operatório.

PSApré ng/mL				
	Resultado	≤9	>10	P=
Laminina	Média de intensidade	134,43	116,81	0,502
Ras	Média de intensidade	128,76	118,49	0,653
c-Myc	Porcentagem de área corada	36%	47,08%	0,216
BUB1	Média de intensidade	86,66	80,93	0,104
KI67	Média de núcleos corados	11,58%	10,75%	0,607
Retinoblastoma	Média de núcleos corados	12,85%	11,98%	0,674
Smarca5	Porcentagem de área corada	62,72%	76,85%	0,150

Em relação ao escore de Gleason a expressão aumentada das proteínas mostrou-se maior nos carcinomas com Gleason >7 porém sem significância estatística, apenas Smarca5 apresentou expressão maior com Gleason ≤6. (Tabela 12).

Tabela 12 – Relação de expressão protéica coma o escore de Gleason.

Gleason				
	Resultado	≤6	>7	P=
Laminina	Média de intensidade	124,41	128,23	0,898
Ras	Média de intensidade	117,48	127,60	0,687
c-Myc	Porcentagem de área corada	32,45%	42,74%	0,303
BUB1	Média de intensidade	158,38	166,76	0,660
KI67	Média de núcleos corados	10,51%	11,45%	0,617
Retinoblastoma	Média de núcleos corados	11,15%	12,99%	0,428
Smarca5	Porcentagem de área corada	70,45%	67,16%	0,650

Em relação entre a expressão das proteínas com o estadiamento patológico c-Myc mostrou-se mais expresso nos casos pT3 (p=0,07) a maioria das proteínas apresentou uma maior expressão em tumores pT3 porém não houve diferença estatística, apenas Laminina e Retinoblastoma apresentaram uma maior expressão nos tumores órgão-confinados, estadiados pT2 (Tabela 13).

Tabela 13 – Relação de expressão protéica com o estadiamento patológico dos tumores.

Estadiamento Patológico				
	Resultado	PT2	PT3	P=
Laminina	Média de intensidade	129,44	117,23	0,718
Ras	Média de intensidade	122,15	139,15	0,569
c-Myc	Porcentagem de área corada	36,63%	57,51%	0,070
BUB1	Média de intensidade	163,96	167,81	0,859
KI67	Média de núcleos corados	10,58%	13,82%	0,105
Retinoblastoma	Média de núcleos corados	12,55%	12,29%	0,920
Smarca5	Porcentagem de área corada	67,98%	68,31%	0,969

Em relação à recidiva bioquímica não houve diferença de expressão das proteínas ou dos índices de atividade proliferativa nos casos que sofreram ou não recidiva bioquímica (Tabela 14).

Tabela 14 – Relação entre a expressão protéica coma recidiva bioquímica.

Recidiva Bioquímica				
	Resultado	sim	não	P=
Laminina	Média de intensidade	112,91	149,20	0,167
Ras	Média de intensidade	122,13	129,29	0,752
c-Myc	Porcentagem de área corada	41,44%	38,14%	0,710
BUB1	Média de intensidade	166,11	162,55	0,833
KI67	Média de núcleos corados	11,54%	10,74%	0,624
Retinoblastoma	Média de núcleos corados	49,74%	55,41%	0,345
Smarca5	Porcentagem de área corada	66,80%	69,94%	0,632

4.6 Expressão protéica e curvas de sobrevida

Foram construídas curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de recidiva de acordo com as expressões das seis proteínas, com um tempo de seguimento médio de 77,5 meses. Nenhuma das curvas apresentou significância estatística (figura 26 a 28). O mesmo ocorreu com a atividade proliferativa avaliada pelo Ki-67 (Figura 29).

Figura 26 – Curva de Kaplan-Meier mostrando o resultado da expressão das proteínas Bub1 e Ras, e a sobrevida livre de recidiva bioquímica.

Figura 27 – Curvas de Kaplan-Meier mostrando o resultado da expressão das proteínas Laminina e Smarca5, e a sobrevida livre de recidiva bioquímica.

Figura 28 – Curvas de Kaplan-Meier mostrando o resultado da expressão da proteína Retinoblastoma e c-Myc, e a sobrevida livre de recidiva bioquímica.

Figura 29 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de recidiva de acordo com a atividade proliferativa avaliada.

5.Discussão

O objetivo do nosso estudo foi verificar através da técnica de imuno-histoquímica a expressão das proteínas controladas pelos miRNA 100, 218 e Let7c que são Ras, c-Myc, Bub1, Smarca5, Retinoblastoma e Laminina, no carcinoma localizado da próstata, em metástases linfonodais de CaP e nas metástases ósseas de CaP. Além disso avaliamos a atividade proliferativa, utilizando a proteína Ki-67, nestes mesmos grupos. Para analisar a possível relação miRNA e proteína, avaliamos os níveis de expressão dos miRNA pela técnica de qRT-PCR. Também correlacionamos os níveis de expressão dos miRNA e a expressão imuno-histoquímica das proteínas por eles reguladas com a evolução da neoplasia considerando a recidiva bioquímica.

A principal vantagem do TMA reside na análise simultânea de vários cortes histológicos arranjados em apenas uma lâmina.

A realização de reações de IH em lâminas com TMA permite a avaliação da expressão de uma proteína em inúmeros casos em uma única reação, o que confere homogeneidade a avaliação, uma vez que todos os espécimes foram preparados e avaliados em condição idêntica. Outras vantagens do método são a rapidez na análise de múltiplos casos, economia de reagentes, praticidade e uso não predatório do material evitando o desgaste e com isso permitindo o uso em outras pesquisas.

As desvantagens são a representação ausente ou inadequada, especialmente quando se trata de neoplasia heterogênea. Importante lembrar que a avaliação é limitada em relação a um caso específico, já que o método é voltado ao estudo de populações. Embora não haja consenso

sobre o número ideal de fragmentos amostrados, recomenda-se comumente a coleta de mais de um fragmento por caso, no intuito de menor perda de casos e maior representatividade (Hoos et al., 2001).

Observamos uma diminuição progressiva da expressão de Ras conforme a progressão tumoral do CaP localizado a metástase óssea ($p=0,017$). O Ras são um grupo de genes e proteínas importantes mediadores de diferenciação, proliferação, transdução de sinais e transformação maligna induzidas por fatores de crescimento (Bos, 1995; Reuter et al., 2000). As proteínas Ras em mamíferos são estudadas sobretudo porque suas mutações estão associadas com muitos tipos de tumores humanos (Kumar et al., 1990; Hunter, 1997). O trabalho de Lim e Counter (2005) demonstra em detalhes o papel da proteína Ras no desenvolvimento e progressão de tumores. Através da construção de animais transgênicos que expressam a proteína Ras de forma induzível demonstraram que a proteína Ras é essencial para a iniciação de um tumor, mas uma vez o tumor estabelecido, Ras e as vias de ERK ou RafGEF não são mais necessárias, sendo que a manutenção do tumor formado a partir da atividade descontrolada de Ras é garantida apenas pela via PI3k/Akt. Sendo assim os autores demonstram o importante papel de Ras na promoção do tumor, mas não na progressão deste confirmando nossos achados imuno-histoquímicos. Por outro lado, Fan (1988) sugeriu que as proteínas Ras estão envolvidas no processo de metastatização dos carcinomas da próstata.

Observamos também uma diminuição expressiva na expressão de Laminina conforme a progressão do CaP ($p < 0,0001$). A Laminina, glicoproteína de adesão abundante na membrana basal, é um componente estrutural e biologicamente ativo. Onde juntamente com o colágeno IV vai formar diversas redes na membrana. (Martin e Timpl, 1987; Sasaki et al., 2004). Possui diversas atividades biológicas como promoção da adesão celular, migração, proliferação, angiogênese e metastatização de tumores (Martin e Timpl, 1987; Malinda e Kleinman, 1996; Ponce et al., 2001; Bosman e Stamenkovic, 2003). No entanto, há uma escassez de estudos que examinem o papel direto de Lamininas no câncer de próstata. Alterações na composição da Laminina dentro do microambiente do tumor têm sido associadas com a progressão do câncer (Nagle, 2004). Lamininas são expressas em tecido normais e malignos da próstata, mas diferentes isoformas predominam em cada caso. Em lesões não-malignas da próstata a isoforma LM332 é predominante (Nagle, 2004; Hao et al., 1996; Brar et al., 2003). LM332 é perdida durante a promoção do câncer de próstata, (Ljubimova et al., 2004, 2001; Khazenzon et al., 2003) e essa perda pode contribuir para a formação de uma matriz extra-celular estruturalmente mais fraca, mais propícia a disseminação metastática (Nagle, 2004; Hao et al., 1996; Cress et al., 1995). Os mecanismos responsáveis pela perda de LM332 não são bem compreendidos, embora tenha sido proposto a metilação aberrante de sua região promotora (Sathyanarayana et al., 2003). Semelhante aos nossos achados Hao et al. (1996) demonstraram a perda da Laminina 5 β 3 no carcinoma da próstata.

A proteína do Retinoblastoma mostrou um ganho de expressão durante a progressão do carcinoma localizado para as metástases ($p=0,036$). A Retinoblastoma é uma fosfoproteína nuclear regula o ciclo celular de diversas formas; é fosforilada durante o ciclo, principalmente na fase G1, e desfosforilada durante a mitose. Quando a pRb esta fosforilada ela impede a proliferação celular. Esta envolvida ainda nos processos de diferenciação celular e apoptose. (Adams e Kaelin Jr, 1998). Esta proteína está presente em todas as células e tecidos, porém se encontra mutada em muitos tipos de câncer. Embora tenhamos identificado imunoexpressão de pRb no carcinoma da próstata, comparando a expressão tumoral com o tecido normal (Figura 12) notamos que a glândula normal tem expressão forte, nuclear em 100% das células, essa expressão é parcialmente perdida no carcinoma localizado. O aumento de expressão dos demais estágios tumorais em relação ao câncer localizado pode se dever a um processo reativo do tecido que aumenta a expressão da proteína na tentativa de regular o ciclo celular anormalmente acelerado no processo de carcinogênese.

Ambrosch et al., (2001) também não demonstraram perda de expressão de pRb no carcinoma do trato digestivo superior. Os autores acreditam que a perda da expressão da proteína Retinoblastoma independe da progressão do tumor em casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Nakahara et al., (2000) ao avaliarem também carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, notaram que a proteína estava presente em 43,6% dos casos. Maddison et al.,(2004) tentando testar diretamente a

hipótese de que existe uma relação causal entre a perda de pRb e o início da doença da próstata, aplicou um sistema condicional para revogar pRb na próstata do rato adulto. Com 12 semanas de idade, os ratos diminuíram a expressão da proteína pRb o que levou a um aumento da proliferação celular e consequente hiperplasia das células epiteliais com correspondente aumento da expressão de genes regulados por pRb como o E2F. Tomados em conjunto, os dados mostram que a perda de pRb mediada controle do ciclo celular podem iniciar a doença da próstata e apoiar a afirmação de que revogação da pRb pode ser um evento precoce no câncer de próstata. Podemos explicar assim a nossa perda inicial de Retinoblastoma e o aumento de produção da mesma, conforme a progressão do tumor.

Quando avaliamos a atividade proliferativa com o uso de Ki-67, encontramos um aumento de proliferação conforme a progressão tumoral ($p < 0,0001$). Como já mencionado anteriormente o Ki-67 é um anticorpo monoclonal descrito por Gerdes em 1983 que identifica uma proteína não histona presente no nucléolo das proliferativas, bem como na cromatina condensada das mitóticas. Apresenta uma meia vida de 60-90 minutos (Adriaenenssens et al., 1998; Andersen et al., 1998). A proteína Ki-67 pertence a um grupo de moléculas que estimula o crescimento tumoral através da aceleração do ciclo celular (Schliephake, 2003). Este anticorpo tem sido utilizado largamente como marcador de proliferação celular, se acumula no núcleo da célula de G1 até a mitose, quando então vai diminuindo rapidamente a intensidade de sua coloração (Soini et al., 1994). O Ki-67 pode ser utilizado para avaliar frações de crescimento de tecidos

normais reacionais e neoplásicos e tem sido relacionado a tumores com maior agressividade (Chang et al., 1999; Whittles et al., 1999; Healy et al., 1995; Tannapfel et al., 1999; Brown e Gatter, 1990)

Já no adenocarcinoma de próstata Raymond et al. (1988) evidenciou uma expressão maior de Ki-67 quando comparado com hiperplasia prostática, e concluiu que o Ki-67 tem um papel importante no prognóstico do tumor. Stattin et al., (1997) já comprovou que Ki-67 pode ser um útil marcador preditivo do CaP.

A análise de Smarca5 não mostrou uma alteração de expressão significativa durante a progressão tumoral ($p=0,315$). Smarca5 é um mediador da acessibilidade a molécula de DNA facilitando o deslizamento do octâmero de histona sendo importante no controle da expressão dos genes, replicação do DNA, reparo de DNA, e manutenção da estrutura cromatínica (Mohamed et al., 2007 , Stopka e Skoultchi, 2003). Estudos com embriões de camundongos *knock out* para Smarca5 demonstraram que este gene é necessário para proliferação celular, atenuação da mitose sendo observada letalidade precoce desses animais (Stopka e Skoultchi, 2003). Em estudos de eritropoiese, Stopka et al. (2000) Observaram que durante o processo de diferenciação celular há uma perda da expressão de Smarca5 que está presente nas fases de proliferação e que a manutenção de sua expressão impediria os processos de diferenciação celular.

Gigek et al. (2011) estudaram a expressão da proteína Smarca5 no câncer gástrico e observaram maior imunorreatividade de Smarca5 em

amostras de câncer gástrico do que em mucosa normal, sugerindo que a imunorreatividade de Smarca5 pode ser utilizado como um potencial marcador de proliferação e malignização dos tecidos. Não existem estudos semelhantes ao nosso na literatura que comparem a expressão da proteína em diversos estágios do tumor. Claramente identificamos uma perda de imunoexpressão de Smarca5 na progressão do câncer localizado para a metástase linfonodal e um posterior aumento de expressão na progressão para metástase óssea, o que pode estar relacionada a importância da proteína nas fases iniciais do tumor, mantendo seu estado proliferativo, desnecessário para o estágio posterior de metastatização linfonodal, vindo a ser necessário posteriormente na progressão para a metástase óssea.

Não encontramos relação entre o c-Myc ($p=0,253$) e Bub1($p=0,649$) e a progressão tumoral. Ambos não apresentaram alterações conforme a progressão do tumor. O Bub1 é uma proteína que desempenha uma papel importante nos checkpoints mitóticos, com ação em muitos níveis da mitose e segregação cromossômica (Larsen et al., 2007; Wang et al., 2001b; Taylor et al., 2001). Estudos com RNA de interferência indicam que Bub1 desempenha um papel fundamental para o recrutamento de proteínas relacionadas ao checkpoint (Sharp e Chen 2001; Johnson et al., 2004; Meraldi et al., 2004). Sendo assim esta proteína se faz necessária ao longo de todo o desenvolvimento do tumor, e isto pode explicar a sua pouca diferença de expressão nos diferentes tipos de carcinoma da próstata.

Apesar de c-Myc sempre ter sido associado a indução da proliferação celular, sabe-se que c-Myc está relacionada também com o processo de

morte celular, principalmente no caso de proliferação descontrolada e falta de nutrientes. Como já mencionado sabe-se, por exemplo, que a expressão constitutiva de c-Myc leva a transformação celular de vários tipos de linhagens celulares, mas a sua superexpressão pode levar a morte celular (Blackwood e Eisenman, 1991). Os nossos dados apesar de não terem apresentado uma significância estatística concordam com a literatura onde a superexpressão de c-Myc tem sido descrita como importante na progressão metastática de CaP em modelos animais (Wang et al., 2003). Nós encontramos um pequeno aumento de expressão de c-Myc nos casos de metástases. Além da metastatização, a expressão de c-Myc já foi relacionada com um crescimento andrógeno-independente (Gil et al., 2005; Williams et al., 2005; Chuan et al., 2010).

Em relação a expressão das proteínas por imuno-histoquímica e os fatores prognósticos não observamos diferença estatística em relação ao grau histológico de Gleason, estadiamento TNM ou níveis séricos de PSA pré-operatórios. Houve uma significância marginal na expressão de Myc em relação ao estadiamento sendo sua expressão quase duas vezes maior nos carcinomas pT3 (57,51) em relação aos tumores pT2 (36,63)($p=0,07$).

Analizamos também a expressão das proteínas e a recidiva bioquímica ($PSA > 0,2$ ng/mL) dos pacientes com carcinoma localizado submetidos a prostatectomia radical em um acompanhamento médio de 77,5 meses. Não houve relação entre a expressão das diversas proteínas e a recidiva bioquímica.

Em relação aos miRNA confirmamos os nossos achados anteriores que demonstravam uma superexpressão dos miRNA-100, miRNA-218 e miR-Let7c Leite et al. (2011bc) no CaP localizado.

Quando relacionamos a expressão dos miRNA com fatores prognósticos do CaP, estadiamento patológico, PSA pré-operatório, escore de Gleason e recidiva bioquímica não observamos nenhuma relação entre os dados.

Identificamos que os miRNA-100, miRNA-218, miRNA-Let7c estão super expressos no câncer de próstata localizado, porém nossos dados não sugerem uma ação ou influência desses miRNA sobre suas prováveis proteínas alvo. Além disso na nossa casuística de CaP localizado não houve uma relação entre a expressão desses miRNA com fatores prognósticos ou evolução da doença.

Não observamos relação estatisticamente significativa em relação a expressão dos miRNA Let7c, 100 e 218 e as proteínas por eles reguladas. Apesar de haver uma diferença estatística em relação a expressão do miR-218 e Laminina, essa relação foi oposta com uma maior expressão de Laminina relacionada a maior expressão do miRNA, mostrando que possivelmente não existe controle da expressão dessa proteína por esse miRNA.

A ausência de relação entre a expressão dos miRNA e suas proteínas alvo pode ser explicada pelo fato que a imuno-histoquímica é um método de análise de expressão protéica semi-quantitativa não havendo

uma comparação entre o tecido normal e tumor o que é a regra pela técnica de qRT-PCR. Talvez novos estudos quantitativos que analisem a expressão das proteínas podem demonstrar uma relação entre a expressão das proteínas e dos miRNA que não encontramos em nosso estudo.

6. Conclusão

Apesar de confirmarmos os nossos achados de superexpressão dos miRNA 100, let7c e 218 no CaP localizado, não houve correlação entre esses e a imunoexpressão de suas proteínas alvo.

Demonstramos que houve alteração de imunoexpressão de Ras, Laminina 5 β 3, Retinoblastoma e da atividade proliferativa avaliada pela expressão de Ki-67 durante a progressão tumoral no CaP.

A maior expressão de c-Myc por IH mostrou uma significância tendência a relacionar-se com tumores não confinados estadiados pT3. A expressão das demais proteínas assim como dos miRNA não mostraram correlação com os fatores prognósticos clássicos do CaP.

7.Anexos

Anexo A – Termo de Aprovação da CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 05/08/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0757/09**, intitulado: "**ANÁLISE DE PROTEÍNAS CUJA EXPRESSÃO É CONTROLADA POR MIRNA E RELACIONADAS A PROGRESSÃO DO ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA EM TISSUE MICROARRAY**" apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Kátia Ramos Moreira Leite**

Pesquisador (a) Executante: **Luciana Maria Sevo Timoszczuk**

CAPPesq, 06 de Agosto de 2009

PROF. DR. CLAUDIO LEONE
Vice - Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo B - Protocolo de Imuno-histoquímica

- 1- O material obtido através de cirurgia é encaminhado para macroscopia.
- 2- O material sofre clivagem quando o patologista seleciona fragmentos de tecido da lesão ou outras partes seguindo protocolos pré-definidos. Esses fragmentos são acondicionados em cassetes histológicos e mantidos em formol a 10% até seu processamento.
- 3- Processamento, o material é embebido em banhos seqüenciais de álcool e xilol para desidratação e diafanização com posterior impregnação em parafina líquida. (Processo realizado por máquina processadora rápida vertical)
- 4- Seqüencialmente o material segue para inclusão em moldes metálicos e confecção de blocos de parafina, estando pronto para a fase de corte. (Realizada em central de inclusão).
- 5- O bloco de parafina é submetido a cortes de 3 a 5 micras no micrótomo, retirando-se uma fita do material que é embebido em banho maria e pescado com lâminas de vidro. (ver item 6)
- 6- Para que sejam utilizadas, antes de pescar o tecido, as lâminas devem ser silanizadas (passar por aplicação de silânio) ou são adquiridas lâminas que já possuem silânio.
- 7- Colocar as lâminas na estufa por 30min a 1h, para derreter a parafina.
- 8- Colocar os tampões de recuperação para pré aquecimento por 40 min (Citrato pH 6.0, citrato sem ajustar pH, EDTA pH 8.0, EDTA pH 9.0)

- 9- Desparafinizar os cortes de tecido em laminas silanizadas por 5 min cada banho de xilol (4 banhos)
- 10-Mergulhar 4 vezes nos banhos de álcool, nas graduações: 3x 99,5%, 1x95%, 1x80% e 1x50%. Finalizar com banho em água destilada.
- 11-Colocar as lâminas em panela de vapor para recuperação antigênica por 30 min nos respectivos tampões. (em panela de pressão o período de recuperação é alterado).
- 12-Após o período de recuperação, deixar as lâminas esfriando dentro de seus respectivos tampões por 20min.
- 13-Lavar abundante em água corrente.
- 14-Após lavar, mergulhar as lâminas em banhos de H₂O₂ (água oxigenada 3% ou 10 vol) 2x de 10 min.
- 15-Lavar abundante em água corrente.
- 16-Colocar as lâminas em um recipiente tampão Tris-HCl ph 7,6.
- 17-Colocar as lâminas em um suporte, câmara úmida, ou processador de imuno- histoquímica.
- 18-Limpar as lâminas e marcar o contorno do tecido com caneta específica.
- 19-Encubar as lâminas com os anticorpos primários por 30 min ou over night. (dependendo da especificação na bula do fabricante)
- 20-Lavar as lâminas com uma piceta contendo tampão TRIS-HCl ph 7.6
- 21-Encubar as lâminas com os anticorpos secundários, kit LSAB ou outro reagente para essa finalidade.
- 22-Lavar as lâminas com uma piceta contendo tampão TRIS-HCl ph 7.6

- 23-Dissolver 50 mg de DAB (diaminobenzidine) em 100ml de tampão PBS pH 7.4 e adicione 1600µl de H₂O₂ a 3%. E agite em um agitador.
- 24-Encube com DAB por 15 min. (no caso de DAB líquida, utilizar outra diluição e tempo de encubação)
- 25-Lavar as lâminas com uma pinceta contendo tampão TRIS-HCl pH 7.6
- 26-Contra corar com Hematoxilina 1-2 min (6 min se ela for reutilizada)
- 27-Lavar em água corrente
- 28-Passar as lâminas rapidamente por um banho de água amoniacal a 0,2% (100ml de água destilada com 2ml de hidróxido de amônia)
- 29-Desidratar em alcoóis graduados: 50%, 80%, 95% e 3x 99,5%.
Diafanizar com 4 banhos de xilol
- 30-Montar laminas com lamínulas e verniz.

**Anexo C - Protocolo para Extração de miRNA de Tecido Parafinado –
mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion®)**

1. Raspar a paratina das lâminas utilizando um bisturi e colocar dentro de um tubo ependorf.
2. Colocar no tubo 1ml de xilol a 100% (quente) a 50°C.
3. Vortex e centrifugar brevemente a amostra.
4. Aqueça a amostra por 3min á 50°C.
5. Centrifugar 2 min a amostra (observar a formação de pelet).
6. Remover o xilol com cuidado sem remover o pelet
7. Adicionar 1ml de etanol 100%
8. Vortex e centrifugar por 2min
9. Remover o etanol com cuidado sem remover o pelet
10. Lavagem com 1ml de etanol 100%
11. Repetir os passos 8 e 9
12. Centrifugar para remover restos de etanol
13. Deixar pelet secar a temperatura ambiente de 15 á 45 min.
14. Colocar o tampão de digestão, se o volume for maior que 40µl colocar 200µl, se menor 100µl
15. Colocar 4µl de protease
16. Incubar a amostra por 15min a 50°C e 15min a 80°C
17. Adicionar o aditivo mais etanol nas seguintes concentrações

Volume os tampões de digestão		
	100µl	200µl
Isolation Additive	120 µl	240 µl
100% ethanol	275 µl	550 µl
Total	395 µl	790 µl

18. Movimentar o líquido com a pipeta
19. Repassar 700µl da solução para a coluna
20. Centrifugar 15seg-10.000g
21. Colete o filtrado e anote o volume
22. Ao filtrado adicione 2/3 do volume de etanol 100%(mix)
23. Pegar o filtrado e colocar em um outro filtro (não mais que 700 µl)
24. Centrifugar por 15 seg
25. Descarte o filtrado
26. Adicionar 700 µl de wash solution 1 (mirvana) e centrifugue 5-10seg
27. Adicionar 500 µl de wash solution 2/3 (mirvana) e centrifugue 5-10seg
28. Adicionar 500 µl de wash solution 2/3 (mirvana) e centrifugue 5-10seg
29. Depois de descartar o filtrado centrifugue por 1min os tubos vazios
para secar e remover resíduos
30. Transfira o filtro para um novo tubo e adicione 50µl de H₂O pré
aquecida a 95°C. feche o tubo e centrifugue por 20-30seg
31. Quantificar as amostras e estocar a -20°C

Anexo D - Expressão relativa dos miRNA em 61 casos de carcinoma de próstata localizado.

	Mir100	Mir218	Mirlet7c		Mir100	Mir218	Mirlet7c
1	10,64	11,47	4,93	56	105,27	104,63	12,15
3	11,62	16,04	4,10	57	24,37	9,74	0,10
4	15,01	27,46	3,58	58	29,36		
10	20,31	40,74	5,50	59	19,84	28,15	4,00
11	4,65	8,50	2,23	60	116,48	113,95	0,73
12	1,29	0,89	0,33	61	2,48	6,54	1,60
13	35,95	69,18	15,78	62	11,98	21,98	4,23
16	7,15	12,21	1,44	63	40,93	74,24	20,84
19	12,80	27,69	4,01	64	31,23	57,73	11,56
20	23,26	55,15	6,20	65	28,56	27,21	9,63
21	6,00	16,53	2,41	66	18,39	9,83	5,90
22	7,41	7,96	1,20	67	12,12	31,00	6,20
23	6,52	18,15	3,47	68	101,48	96,82	17,17
24	17,63	43,09	4,66	69	18,73	28,70	7,09
25	65,12	744,54	24,80	70	1,99	4,58	1,91
29	50,67	8,78	13,60	86	11,53	18,98	4,51
30	13,18	16,09	3,50	87	8,67	14,63	3,34
31	305,92	429,70	71,17	88	11,70	1,21	5,13
32	25,62	26,91	7,69	89	35,88	68,98	17,50
36	216,02	126,26	57,49	90	21,63	48,54	7,06
39	1086,14	2357,76	329,29	91	10,23	76,92	4,70
40	66,26	100,93	25,92	92	9,23	24,66	0,16
41	2,09	57,33	11,87	93	3,75	17,19	2,37
43	34,94	69,66	9,54	94	4,97	14,87	2,33
44	19,21	13,49	3,76	95	0,91	34,25	1,74
48	32,72	9,10	3,01	104	37,69	89,90	7,59
49	46,33	77,08	11,71	105	5,13	15,80	1,93
50	116,08	168,80	20,42	106	6,47	15,79	6,51
52	43,50	167,99	19,69	107	4,18	8,50	3,98
54	14,23	26,65	0,20	108	4,56	8,16	0,97
55	7,25	6,67	1,16				

8.Referências Bibliográficas

Adams PD, Kaelin WG Jr. Negative control elements of the cell cycle in human tumors. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(6):791-7.

Adriaenssens E, Dumont L, Lottin S, Bolle D, Leprêtre A, Delobelle A, Bouali F, Dugimont T, Coll J, Cury JJ. H19 overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression. *Am J Pathol*. 1998;153(5):1597-607.

Ambrosch P, Schlott T, Hilmes D, Ruschenburg I. p16 alterations and retinoblastoma protein expression in squamous cell carcinoma and neighboring dysplasia from the upper aerodigestive tract. *Virchows Arch* 2001;438(4):343-9.

ACS - American Cancer Society . Available from: <http://www.cancer.org>

Andersen SN, Rognum TO, Bakka A, Clausen OP. Ki-67: a useful marker for the evaluation of dysplasia in ulcerative colitis. *Mol Pathol* 1998; 51(6):327-32.

Andriole GL, Levin DL, Crawford ED, Gelmann EP, Pinsky PF, Chia D, Kramer BS, Reding D, Church TR, Grubb RL, Izmirlian G, Ragard LR, Clapp JD, Prorok PC, Gohagan JK; PLCO Project Team. Prostate Cancer Screening in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial: findings from the initial screening round of a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(6):433-8.

Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 2005;24(5):326-32.

Avni O, Lee D, Macian F, Szabo SJ, Glimcher LH, Rao A. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol*. 2002;3(7):643-51.

Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:779-827

Becker PB, Hörz W. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:247-73.

Bessière D, Lacroix C, Campagne S, Ecochard V, Guillet V, Mourey L, Lopez F, Czaplicki J, Demange P, Milon A, Girard JP, Gervais V. Structure-function

analysis of the THAP zinc finger of THAP1, a large C2CH DNA-binding module linked to Rb/E2F pathways. *J Biol Chem*. 2008;283(7):4352-63.

Best CJ, Leiva IM, Chuaqui RF, Gillespie JW, Duray PH, Murgai M, Zhao Y, Simon R, Kang JJ, Green JE, Bostwick DG, Linehan WM, Emmert-Buck MR. Molecular differentiation of high- and moderate-grade human prostate cancer by cDNA microarray analysis. *Diagn Mol Pathol* 2003;12(2):63-70.

Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 1991;251(4998):1211-7.

Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, D'Urso L, Pagliuca A, Biffoni M, Labbaye C, Bartucci M, Muto G, Peschle C, De Maria R. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 2008;14(11):1271-7.

Bos JL. p21ras: an oncoprotein functioning in growth factor-induced signal transduction. *Eur J Cancer* 1995;31A(7-8):1051-4.

Bos JL. Ras, In: Hall A. Ed. *CTPases*. Oxford, Oxford University Press. P67-88, 2000

Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 2003;200(4):423-8.

Brar PK, Dalkin BL, Weyer C, Sallam K, Virtanen I, Nagle RB. Laminin alpha-1, alpha-3, and alpha-5 chain expression in human prepubertal [correction of prepubetal] benign prostate glands and adult benign and malignant prostate glands. *Prostate* 2003;55(1):65-70.

Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 1998;391(6667):597-601.

Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990;17(6):489-503.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*. 1998;17(11 Reviews):1395-413.

Carter HB, Pearson JD. Prostate-specific antigen testing for early diagnosis of prostate cancer: formulation of guidelines. *Urology*. 1999;54(5):780-6.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, Petros JA, Andriole GL. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med*. 1991; 324(17):1156-61.

Chang J, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Clark GM, Makris A, Assersohn L, Gregory RK, Osborne CK, Dowsett M. Biologic markers as predictors of clinical outcome from systemic therapy for primary operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(10):3058-63.

Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang JY, Lee WH. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*. 1989;58(6):1193-8.

Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(4):1290-7.

Chuan YC, Iglesias-Gato D, Fernandez-Perez L, Cedazo-Minguez A, Pang ST, Norstedt G, Pousette A, Flores-Morales A. Ezrin mediates c-Myc actions in prostate cancer cell invasion. *Oncogene*. 2010;29(10):1531-42.

Claudio PP, Tonini T, Giordano A. The retinoblastoma family: twins or distant cousins? *Genome Biol*. 2002;3(9):3012-3015.

Cochran BH, Zullo J, Verma IM, Stiles CD. Expression of the c-fos gene and of an fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science*. 1984;226(4678):1080-2.

Collins N, Poot RA, Kukimoto I, García-Jiménez C, Dellaire G, Varga-Weisz PD. An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet*. 2002;32(4):627-32.

Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology*. 2003;62(6):3-12. Review.

Cress AE, Rabinovitz I, Zhu W, Nagle RB. The alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins in human prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 1995;14(3):219-28.

Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang TL, Davidson B, Shih IeM, Zhang Y, Wood W 3rd, Becker KG, Morin PJ. MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS One*. 2008;3(6):e2436.

*Der CJ, BurrIDGE K, Chrzanowska-Wodnicka M, Clark GJ, Coffey RJ, Gangarosa LM, Khosravi-Far R, Oldham SM, Solski PA, Van Aelst L,

Westwick JK, White MA, Wigler MH. Ras causes tumorigenic transformation by activation of Raf/MAPK-dependent and independent signaling pathways . Proc Am Assoc Cancer Res. 1996; 37:653-654.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. Genes Dev. 1998;12(15):2245-62.

Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL; ISUP Grading Committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. Am J Surg Pathol. 2005;29(9):1228-42.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6(4):259-69..

Fan K. Heterogeneous subpopulations of human prostatic adenocarcinoma cells: potential usefulness of P21 protein as a predictor for bone metastasis. J Urol.1988;139(2):318-22.

Fyodorov DV, Kadonaga JT. The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription. Cell. 2001;106(5):523-5.

Gann PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. JAMA. 1995;273(4):289-94.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol. 1984;133(4):1710-5.

Gigek CO, Lisboa LC, Leal MF, Silva PN, Lima EM, Khayat AS, Assumpção PP, Burbano RR, Smith Mde A. SMARCA5 methylation and expression in gastric cancer. Cancer Invest. 2011;29(2):162-6.

Gil J, Kerai P, Lleonart M, Bernard D, Cigudosa JC, Peters G, Carnero A, Beach D. immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc. Cancer Res. 2005;65(6):2179-85.

Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. Hum Pathol. 1992;23(3):273-9.

Grady WM. Genomic instability and colon cancer. Cancer Metastasis Rev. 2004;23(1-2):11-27.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. CA Cancer J Clin. 2001 Jan-Feb;51(1):15-36. Erratum in: CA Cancer J Clin 2001;51(2):144.

Hao J, Yang Y, McDaniel KM, Dalkin BL, Cress AE, Nagle RB. Differential expression of laminin 5 (alpha 3 beta 3 gamma 2) by human malignant and normal prostate. *Am J Pathol.* 1996;149(4):1341-9.

Haruta M, Matsumoto Y, Izumi H, Watanabe N, Fukuzawa M, Matsuura S, Kaneko Y. Combined BubR1 protein down-regulation and RASSF1A hypermethylation in Wilms tumors with diverse cytogenetic changes. *Mol Carcinog.* 2008;47(9):660-6.

Haubruck H, McCormick F. Ras p21: effects and regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1072(2-3):215-29.

Healy E, Angus B, Lawrence CM, Rees JL. Prognostic value of Ki67 antigen expression in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 1995;133(5):737-41.

Healy E, Angus B, Lawrence CM, Rees JL. Prognostic value of Ki67 antigen expression in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 1995;133(5):737-41.

Helin K. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8(1):28-35.

Henshall SM, Afar DE, Hiller J, Horvath LG, Quinn DI, Rasiah KK, Gish K, Willhite D, Kench JG, Gardiner-Garden M, Stricker PD, Scher HI, Grygiel JJ, Agus DB, Mack DH, Sutherland RL. Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res.* 2003;63(14):4196-203.

Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell.* 1995;80(2):199-211.

Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, Kuo D, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol.* 2001;158(4):1245-51.

Hoyt MA, Totis L, Roberts BT. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell.* 1991;66(3):507-17.

Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell.* 1997;88(3):333-46.

INCA(Instituto Nacional do Câncer) [online]. Ministério da Saúde, Brasil;2012. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.

Isola J, Helin H, Kallioniemi OP. Immunoelectron-microscopic localization of a proliferation-associated antigen Ki-67 in MCF-7 cells. *Histochem J.* 1990;22(9):498-506.

Johnson VL, Scott MI, Holt SV, Hussein D, Taylor SS. Bub1 is required for

kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 8):1577-89.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;120(5):635-47.

Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* 2007;67(16):7713-22.

Khazenzon NM, Ljubimov AV, Lakhter AJ, Fujita M, Fujiwara H, Sekiguchi K, Sorokin LM, Petäjäniemi N, Virtanen I, Black KL, Ljubimova JY. Antisense inhibition of laminin-8 expression reduces invasion of human gliomas in vitro. *Mol Cancer Ther.* 2003;2(10):985-94.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(5):376-85.

Kimmelman A, Tolacheva T, Lorenzi MV, Osada M, Chan AM. Identification and characterization of R-ras3: a novel member of the RAS gene family with a non-ubiquitous pattern of tissue distribution. *Oncogene.* 1997;15(22):2675-85.

Kivinen L, Tsubari M, Haapajärvi T, Datto MB, Wang XF, Laiho M. Ras induces p21Cip1/Waf1 cyclin kinase inhibitor transcriptionally through Sp1-binding sites. *Oncogene.* 1999;18(46):6252-61.

Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 2000;351:289-305.

Konishi N, Hiasa Y, Matsuda H, Tao M, Tsuzuki T, Hayashi I, Kitahori Y, Shiraishi T, Yatani R, Shimazaki J, et al. Intratumor cellular heterogeneity and alterations in ras oncogene and p53 tumor suppressor gene in human prostate carcinoma. *Am J Pathol.* 1995;147(4):1112-22.

Kumar R, Sukumar S, Barbacid M. Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. *Science.* 1990;248(4959):1101-4.

Larsen NA, Al-Bassam J, Wei RR, Harrison SC. Structural analysis of Bub3 interactions in the mitotic spindle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(4):1201-6.

Lazzaro MA, Picketts DJ. Cloning and characterization of the murine Imitation Switch (ISWI) genes: differential expression patterns suggest distinct developmental roles for Snf2h and Snf2l. *J Neurochem.* 2001;77(4):1145-56.

Leite KR, Canavez JM, Reis ST, Tomiyama AH, Piantino CB, Sañudo A, Camara-Lopes LH, Srougi M. miRNA analysis of prostate cancer by quantitative real time PCR: comparison between formalin-fixed paraffin embedded and fresh-frozen tissue. *Urol Oncol*. 2011;29(5):533-7.

Leite KR, Sousa-Canavez JM, Reis ST, Tomiyama AH, Camara-Lopes LH, Sañudo A, Antunes AA, Srougi M. Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis. *Urol Oncol*. 2011;29(3):265-9.

Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Sañudo A, Dall'Oglio MF, Camara-Lopes LH, Srougi M. MicroRNA-100 expression is independently related to biochemical recurrence of prostate cancer. *J Urol*. 2011;185(3):1118-22

Leite KR, Srougi M, Kauffmann JR, Bevilacqua RG, Nesrallah AJ, Nesrallah LJ, Camara-Lopes LH. [Well differentiated localized prostate carcinoma: prognostic relevance of tertiary Gleason pattern 4 and tumor volume]. *Rev Assoc Med Bras*. 2005;51(6):329-33.

Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002;18(11):1427-31.

Lim KH, Counter CM. Reduction in the requirement of oncogenic Ras signaling to activation of PI3K/AKT pathway during tumor maintenance. *Cancer Cell*. 2005;8(5):381-92..

Ljubimova JY, Lakhter AJ, Loksh A, Yong WH, Riedinger MS, Miner JH, Sorokin LM, Ljubimov AV, Black KL. Overexpression of alpha4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. *Cancer Res*. 2001;61(14):5601-10.

Luo RX, Postigo AA, Dean DC. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*. 1998;92(4):463-73.

McMaster Biophotonics Facility – ImageJ for microscopy; 2012. Available from: <http://www.macbiophotonics.ca/imagej>

Maddison LA, Sutherland BW, Barrios RJ, Greenberg NM. Conditional deletion of Rb causes early stage prostate cancer. *Cancer Res*. 2004;64(17):6018-25.

Malinda KM, Kleinman HK. The laminins. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996;28(9):957-9.

Martin GR, Timpl R. Laminin and other basement membrane components. *Annu Rev Cell Biol*. 1987;3:57-85.

Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*. 2007;315(5818):1576-9.

McMahon SB, Wood MA, Cole MD. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol*. 2000;20(2):556-62.

Meraldi P, Draviam VM, Sorger PK. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell*. 2004;7(1):45-60.

Miner JH, Yurchenco PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:255-84.

miRBase - The miRBase Sequence Database - Release 19; 2012. Available from: <ftp://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/README>

Mohamed MA, Greif PA, Diamond J, Sharaf O, Maxwell P, Montironi R, Young RA, Hamilton PW. Epigenetic events, remodelling enzymes and their relationship to chromatin organization in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. *BJU Int*. 2007;99(4):908-15.

Nagle RB. Role of the extracellular matrix in prostate carcinogenesis. *J Cell Biochem*. 2004;91(1):36-40.

Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T. Alterations of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett*. 2000;160(1):3-8.

Obaya AJ, Mateyak MK, Sedivy JM. Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene*. 1999;18(19):2934-41.

Osada H, Takahashi T. let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. *Cancer Sci*. 2011;102(1):9-17.

Ponce ML, Nomizu M, Kleinman HK. An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the alpha(v)beta3 and alpha5beta1 integrins. *FASEB J*. 2001;15(8):1389-97.

Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res*. 2007;67(13):6130-5.

Porter AC, Vaillancourt RR. Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene*. 1998;16:1343-52.

Qi W, Yu H. KEN-box-dependent degradation of the Bub1 spindle checkpoint

kinase by the anaphase-promoting complex/cyclosome. *J Biol Chem.* 2007;282(6):3672-9.

Quinn DI, Henshall SM, Brenner PC, Kooner R, Golovsky D, O'Neill GF, Turner JJ, Delprado W, Grygiel JJ, Sutherland RL, Stricker PD. Prognostic significance of preoperative factors in localized prostate carcinoma treated with radical prostatectomy: importance of percentage of biopsies that contain tumor and the presence of biopsy perineural invasion. *Cancer.* 2003;97(8):1884-93.

Raymond WA, Leong AS, Bolt JW, Milios J, Jose JS. Growth fractions in human prostatic carcinoma determined by Ki-67 immunostaining. *J Pathol.* 1988;156(2):161-7.

Rebollo A, Martínez-A C. Ras proteins: recent advances and new functions. *Blood.* 1999;94(9):2971-80.

Reisman D, Glaros S, Thompson EA. The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene.* 2009;28(14):1653-68.

Reuter CW, Morgan MA, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood.* 2000;96(5):1655-69.

Rowinsky EK, Windle JJ, Von Hoff DD. Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol.* 1999;17(11):3631-52.

Roy AL, Carruthers C, Gutjahr T, Roeder RG. Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature.* 1993a;365(6444):359-61.

Roy AL, Malik S, Meisterernst M, Roeder RG. An alternative pathway for transcription initiation involving TFII-I. *Nature.* 1993b;365(6444):355-9.

Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ. MicroRNA let-7c down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 2007;67(20):9762-70

Sasaki T, Fässler R, Hohenester E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol.* 2004;164(7):959-63

Sathyanarayana UG, Padar A, Suzuki M, Maruyama R, Shigematsu H, Hsieh JT, Frenkel EP, Gazdar AF. Aberrant promoter methylation of laminin-5-encoding genes in prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* 2003;9(17):6395-400

Schalken JA, Bergh A, Bono A, Foster C, Gospadarowicz M, Isaacs WB, Rubin M, Schröder F, Tribukait B, Tsukamoto T, Wiklund P. Molecular prostate cancer pathology: current issues and achievements. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2005;(216):82-93.

Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32(3):233-45.

Schulman CC, Ekane S, Zlotta AR. Nutrition and prostate cancer: evidence or suspicion? *Urology.* 2001;58(3):318-34.

Sharp-Baker H, Chen RH. Spindle checkpoint protein Bub1 is required for kinetochore localization of Mad1, Mad2, Bub3, and CENP-E, independently of its kinase activity. *J Cell Biol.* 2001;153(6):1239-50.

Shi XB, Xue L, Yang J, Ma AH, Zhao J, Xu M, Tepper CG, Evans CP, Kung HJ, deVere White RW. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(50):19983-8

Sobin JH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. International Union Against Cancer – UICC. New York: Willey-Liss, 2002

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(1):10-29.

Soini Y, Kamel D, Pääkkö P, Lehto VP, Oikarinen A, Vähäkangas KV. Aberrant accumulation of p53 associates with Ki67 and mitotic count in benign skin lesions. *Br J Dermatol.* 1994;131(4):514-20.

Stattin P, Damber JE, Karlberg L, Bergh A. Cell proliferation assessed by Ki-67 immunoreactivity on formalin fixed tissues is a predictive factor for survival in prostate cancer. *J Urol.* 1997;157(1):219-22

Sternberg PW, Alberola-Ila J. Conspiracy theory: RAS and RAF do not act alone. *Cell.* 1998;95(4):447-50.

Stopka T, Skoultchi AI. The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14097-102.

Stopka T, Zakova D, Fuchs O, Kubrova O, Blafkova J, Jelinek J, Necas E, Zivny J. Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia. *Leukemia.* 2000;14(7):1247-52.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T.

Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004;64(11):3753-6.

Tannapfel A, Geissler F, Köckerling F, Katalinic A, Hauss J, Wittekind C. Apoptosis and proliferation in relation to histopathological variables and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol.* 1999;187(4):439-45.

Taylor SS, Hussein D, Wang Y, Elderkin S, Morrow CJ. Kinetochore localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components Bub1 and BubR1 are differentially regulated by spindle events in human cells. *J Cell Sci.* 2001;114:4385-95.

Therrien M, Wong AM, Rubin GM. CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell.* 1998;95(3):343-53.

Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem.* 1979;254(19):9933-7.

Trouche D, Kouzarides T. E2F1 and E1A(12S) have a homologous activation domain regulated by RB and CBP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(4):1439-42.

Vanaja DK, Cheville JC, Iturria SJ, Young CY. Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression. *Cancer Res.* 2003;63(14):3877-82.

Varga-Weisz P. ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene.* 2001;20(24):3076-85.

Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, van Driel R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci.* 1989a;92:123-30.

Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci.* 1989b;92:531-40.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambros S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2257-61.

Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. 1979. *J Urol.* 2002;167:960-4

Wang S, Gao J, Lei Q, Rozengurt N, Pritchard C, Jiao J, Thomas GV, Li G, Roy-Burman P, Nelson PS, Liu X, Wu H. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell.* 2003;4(3):209-21.

Wang X, Chen S, Zhang Z. [Expression of surviving gene and its relationship with expression of P53, c-myc, k-ras proteins in non-small-cell lung cancer]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2001;24(6):371-4. Chinese.

Wang X, Babu JR, Harden JM, Jablonski SA, Gazi MH, Lingle WL, de Groen PC, Yen TJ, van Deursen JM. The mitotic checkpoint protein hBUB3 and the mRNA export factor hRAE1 interact with GLE2p-binding sequence (GLEBS)-containing proteins. *J Biol Chem.* 2001;276(28):26559-67.

Whittles CE, Biddlestone LR, Burton A, Barr H, Jankowski JA, Warner PJ, Shepherd NA. Apoptotic and proliferative activity in the neoplastic progression of Barrett's oesophagus: a comparative study. *J Pathol.* 1999;187(5):535-40.

Williams K, Fernandez S, Stien X, Ishii K, Love HD, Lau YF, Roberts RL, Hayward SW. Unopposed c-MYC expression in benign prostatic epithelium causes a cancer phenotype. *Prostate.* 2005;63(4):369-84.

Wright JL, Lange PH. Newer potential biomarkers in prostate cancer. *Rev Urol.* 2007;9(4):207-13.

Wurster AL, Pazin MJ. BRG1-mediated chromatin remodeling regulates differentiation and gene expression of T helper cells. *Mol Cell Biol.* 2008;28(24):7274-85.

Yoon DS, Wersto RP, Zhou W, Chrest FJ, Garrett ES, Kwon TK, Gabrielson E. Variable levels of chromosomal instability and mitotic spindle checkpoint defects in breast cancer. *Am J Pathol.* 2002;161(2):391-7.

Yoon S, De Micheli G. Prediction of regulatory modules comprising microRNAs and target genes. *Bioinformatics.* 2005;21 Suppl 2:ii93-100.

Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, Harbour JW, Dean DC. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell.* 2000;101(1):79-89.

- Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, Coppola D, Cheng JQ. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem*. 2008;283(45):31079-86
- Zhou Y, Santoro R, Grummt I. The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J*. 2002;21(17):4632-40.

Apêndices

Artigos Científicos Submetidos

1. Clinics - The relationship between the expression of the micro RNAs let7c, 100 and 218 and their target RAS, c-MYC, BUB1, SMARCA5 and LAMB3 in prostate cancer

Congressos

1. XXVIII – Congresso Brasileiro de Patologia/ Congresso Latino Americano de Patologia

Apresentação oral: A relação de expressão dos miRNA 100 e Let7c com a imunoexpressão das proteínas por eles reguladas no câncer de próstata localizado.

2. XXXIII – Congresso Brasileiro de Urologia

Apresentação oral: Relação da Imunoexpressão das Proteínas Relacionadas a Proliferação Celular RB, RAS, C-MYC e Ki-67 e estabilidade cromossômica BUB1 com a Progressão do Câncer de Próstata.

Prêmio

1. XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia/ Congresso Latino Americano de Patologia

Apresentação oral classificada entre os 10 melhores

Ética

Aprovação do Comitê de Ética sob o número: 0757/09

Certificado

11 a 15 de outubro de 2011 - Centro de Eventos Ruth Cardoso- Maceió - Alagoas - Brasil

Conferimos o presente certificado de menção honrosa ao

DRA. LUCIANA MARIA SEVO TIMOSZCZUK pelo trabalho **A RELAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS MIRNA 100 E LET7C COM A IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS POR ELES REGULADAS NO CÂNCER DE**

PRÓSTATA LOCALIZADO, selecionado entre os melhores apresentados no **XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Patologia e XXVIII Congresso de La Sociedad Latinoamericana de Patologia.**

Maceió, 14 de outubro de 2011.

Fernando Augusto Soares
Presidente do XXVIII Congresso Latino Americano de Patologia

Henrique de Oliveira Costa
Presidente do XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia

Promoção e Realização

Sociedade Brasileira de Patologia

Sociedad
Latinoamericana
de Patologia

Certificado

11 a 15 de outubro de 2011 - Centro de Eventos Ruth Cardoso- Maceió - Alagoas - Brasil

Conferimos o presente certificado a

LUCIANA MARIA SEVO TIMOSZCZUK

pela sua participação, na qualidade de
PALESTRANTE na atividade **APRESENTAÇÃO ORAL**,
com o tema : "A RELAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS MIRNA 100 E LET7C COM A
IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS POR ELE REGULADAS NO CÂNCER DE
PRÓSTATA LOCALIZADO "

Fernando Augusto Soares
Presidente do XXVIII Congresso Latino Americano de Patologia

Maceió, 15 de outubro de 2011

Henrique de Oliveira Costa
Presidente do XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia

Promoção e Realização

Sociedade Brasileira de Patologia

Sociedad
Latinoamericana
de Patologia

**XXXIII CONGRESSO
BRASILEIRO DE UROLOGIA**
Uma ponte para o futuro.

FLORIANÓPOLIS - SC - BRASIL
Centro de Convenções de Florianópolis
22 a 26 de novembro de 2011

Realização:

**SOCIEDADE
BRASILEIRA
DE UROLOGIA**
SBU

Lilly
Respostas que fazem a diferença.

CERTIFICADO

Certificamos que

Luciana Maria Sevo Timoszczuk

participou do XXXIII Congresso Brasileiro de Urologia, realizado no período de 22 a 26 de novembro de 2011, no Centro de Convenções de Florianópolis, Santa Catarina.

Na qualidade de Autora do trabalho *“Relação da Imunoexpressão das Proteínas Relacionadas a Proliferação Celular RB, RAS, C-MYC, E KI-67 e Estabilidade Cromossômica Bub1 com a Progressão do Câncer de Próstata”*.

Florianópolis, 26 de novembro de 2011

Edilbert Melchert
Presidente do Congresso

Modesto Jacobino
Presidente da Sociedade Brasileira de Urologia

**The relationship between the expression of the micro RNAs
let7c, 100 and 218 and their target RAS, c-MYC, BUB1,
SMARCA5 and LAMB3 in prostate cancer**

Journal:	CLINICS
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	dos Reis, Sabrina; University of Sao Paulo, Medical school, urology Timoszczuk, Luciana Pontes, Jose Viana, Nayara; University of Sao Paulo, Medical school, urology Silva, Iran; University of Sao Paulo, Medical school, urology Dip, Nelson; University of Sao Paulo, Medical school, urology Srougi, Miguel; Faculdade de Medicina, Urology Leite, Katia; Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, LIM 55 - Urology
Keyword - Click here to find your MeSH terms.:	Prostate cancer, Prognosis, Micro RNA, Immunohistochemistry

Running headline: MicroRNAs and its targets in prostate cancer

The relationship between the expression of the micro RNAs let7c, 100 and 218 and their target RAS, c-MYC, BUB1, SMARCA5 and LAMB3 in prostate cancer

Sabrina T. Reis, Luciana S. Timoszczuk, José Pontes, Jr., Nayara Viana, Iran A. Silva, Nelson Dip, Miguel Srougi, Katia R. M. Leite

Laboratory of Medical Research, Urology Department – LIM55, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

Corresponding author:

Katia R. M. Leite, MD, PhD
Av. Dr. Arnaldo 455, Room 2145
01246-903, Sao Paulo, SP, Brazil
Tel 55 11 30617183
katiaramos@uol.com.br

Grant sponsors: This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo) under protocol number 2009/52158-1

conception and design: Katia R.M. Leite, Sabrina T. Reis, Luciana S. Timoszczuk;
acquisition of data: Luciana S. Timoszczuk José Pontes, Jr., Nelson Dip; **Drafting of the manuscript:** Sabrina Thalita dos Reis, Katia R M Leite; **Administration support:** Nayara Izabel Viana, Iran Amorim Silva; **critical revision and important intellectual content:** Katia Ramos M. Leite; **supervision:** Miguel Srougi

Abstract

Introduction: We have recently described alterations in the expression of miRNAs during the progression from localized to metastatic PC characterized by the loss of expression of miR-let7c, miR-100 and miR-218. The aim of this study is to verify the expression of proteins that are controlled by miR-let7c, 100 and 218 using immunohistochemistry in TMAs representative of localized PC and PC that had metastasized to the lymph nodes and bone.

Materials and methods: For the representatives TMA, we retrospectively evaluated patients with localized PC (n=112), with lymph node metastases (n=19) and with PC bone metastases (n=28). The protein expression was evaluated by IHC and the computerized image system. miRNA expression was evaluated by quantitative real time PCR.

Results: Statistical analysis showed that RAS expression was significantly increased in localized PC and bone metastases compared to the lymph nodes ($p=0.017$). RB showed an increase in expression from localized PC to lymph node and bone metastasis. LAMB3 was highly expressed in localized and lymph node metastases but was expressed at low levels in bone metastases ($p<0.001$). Cell proliferation showed an increase from localized PC to lymph node metastases and bone metastases ($p<0.001$). MiR-100 and 218 were overexpressed in 98.4% of the cases, and miR-let7c in was overexpressed 91.8% of the cases.

Conclusion: We found that the expression of RAS, RB, LAMB3 and Ki-67 changed in the different stages of PC. Furthermore, we confirmed the overexpression of the miRNAs let7c, 100 and 218 in localized PC.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Key words: Prostate cancer; Prognosis; Tumor markers; Micro RNA; Immunohistochemistry; RAS; MYC; BUB1; SMARCA5; LAMB3; Ki-67.

For Review Only

Introduction

Prostate cancer (PC) is a common disease with a multifactorial and complex etiology. PC is the most common male malignancy and the second leading cause of death among men in many countries, including Brazil. In the United States, 241,740 new cases and 28,170 deaths related to PC are estimated for the year 2012 (1).

The widespread use of prostate-specific antigen (PSA) has increased prostate cancer detection rates at earlier stages. However, up to 20% of clinically localized cases recur during a 10-year follow-up period after local radical treatment. In addition, current clinical and pathological parameters fail to determine an accurate prognosis in many cases (2). Prior identification of patients with poor prognoses is of paramount importance in clinical practice, especially for determining whether additional treatments are necessary. Currently, there are no clinical parameters or molecular markers that can accurately assess the aggressive behavior and metastatic potential of PC. Nevertheless, both tumor invasion and progression to metastasis, which are the signatures of malignancy, are related to cell proliferation and chromosomal stability.

We have recently described alterations in the expression profile of micro RNAs (miRNAs) during the progression from localized to metastatic PC characterized by the loss of expression of miR-let7c, miR-100 and miR-218 (3). miRNAs are a class of noncoding RNAs responsible for the control of one third of the human genes involved in many carcinogenic processes. C-MYC, RAS

and BUB1 are the target genes for miR-let7c, while SMARCA5 and RB are the target genes for miR-100 and Laminin 5 β 3 is the target for miR-218.

C-MYC is a multifunctional, nuclear phosphoprotein that plays a role in cell cycle progression, apoptosis and cellular transformation; this protein also functions as a transcription factor that regulates the transcription of specific target genes (4). The RAS protein functions as a binary molecular switch that controls intracellular signaling networks involved in cytoskeletal integrity, cell proliferation, differentiation, adhesion, apoptosis, and migration (5). Bub-1 is a kinase protein involved in spindle checkpoint by phosphorylating a member of the mitotic checkpoint complex (6). SMARCA5 mediates DNA accessibility by sliding the histone octamer, which is important for gene expression, DNA replication, DNA repair, and the maintenance of the chromatin structure (7). The Retinoblastoma (RB) protein is a key negative regulator of the cell cycle and an important tumor suppressor gene (8). Finally, Laminin 5 β 3 (LAMB3) and its ligand α 6 β 4-integrin have a role in cell migration, and their expression has been related to cell transformation in SCID mice (9).

The aim of this study was to verify the expression of proteins that are controlled by miR-let7c, 100 and 218 using immunohistochemistry (IHC) in tissue microarrays (TMA) representative of both localized PC and PC that had metastasized to the lymph nodes and bone.

For Review Only

Methods

Patients

For the representative TMA of localized PC, we retrospectively evaluated 954 patients with clinically localized PC who underwent RP with a curative intention between January 1994 and April 2000; from this population, we randomly selected the patients of our study. All the surgeries were performed by the same surgeon (MS). The cohort consisted of 45 cases with biochemical recurrence after surgery and 67 cases without recurrence. The mean age was 63.6 years, the mean PSA was 10.8 ng/mL and the mean Gleason score was 7.2. The patients were followed for a median of 79 months. Ninety-seven percent of patients were Caucasian, and 2,7% were Asian. Tumor recurrence was defined as a PSA level above 0.4 ng/ml. The tumor-node-metastasis (TNM) staging designations were assigned according to the TNM 2010 classification. For the construction of the second TMA, 19 cases of lymph node metastases were selected from 1,619 patients who underwent radical prostatectomy between March 1997 and July 2006. The mean age was 66 years, the mean PSA was 11.9 ng/mL, and the mean Gleason score was 8.8. The slides containing the metastasis and the primary tumor for each patient were selected by considering the area that best represented the whole tumor. One area from the metastasis and two areas from the primary tumor were selected and marked with permanent ink; these areas correspond to those included in the TMA. The third TMA consisted of twenty-eight patients with a mean age of 67.3 years, a mean PSA of 553 ng/mL and a mean Gleason score was 8.3. This cohort of patients had PC bone metastases (femur = 16, iliac = 2, vertebra = 6, scapula =

2, humerus = 1, and pubis = 1) and had undergone surgery for the treatment of secondary bone events at the Orthopedic Institute of the Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (HCFMUSP). This study conformed to the provisions of the Declaration of Helsinki and was submitted to and approved by the Ethical Board of the HCFMUSP under protocol 1074/04.

Immunohistochemical study

The TMA were constructed on Superfrost slides. The samples underwent a heat antigen retrieval process using citrate buffer (1 mM, pH 6.0). The slides were incubated overnight at 4°C with the monoclonal antibodies specified in Table 1. The LSAB system was used for immunostaining (Dako Cytomation, CA). Color was developed by a reaction with a 3,3'diaminobenzidine substrate-chromogen solution followed by counterstaining with Harris hematoxylin. The slides were dehydrated, coverslipped and observed under a light microscope. Cytokeratin 18 was used to test the preservation of the antigens, and it was strongly positive in all cases.

Computerized analysis of the immunohistochemical reactions

The expression of each marker was evaluated by one pathologist (KRML). The images were captured by an optical microscope with a 40 x objective (Nikon Eclipse E200) coupled to a camera (Nikon DsFi1) using the software NIS-Elements D 3.1. The luminescence images were quantified densitometrically using the ImageJ MacBiophotonics (National Institutes of Health, U.S.) software package "plug-ins" developed by McMaster University

(<http://www.macbiophotonics.ca/> ImageJ). The antibodies that bound to nuclear proteins (C-MYC, SMARCA5) were evaluated by the percentage of stained nuclei, and the antibodies that bound to cytoplasmic proteins (Bub 1, RAS and Lamb3) were evaluated as an arbitrary unit correspondent to the area occupied by stained tumor cells; Ki-67 was used to establish the proliferative index.

MiRNA expression

To compare the miRNA expression with the expression of the associated target proteins, we evaluated the miRNA expression by qRT-PCR using 60 paraffin blocks that were used for the construction of the TMA representative of localized disease as previously described (4). Briefly, small RNA fractions were isolated and enriched using a mirVana miRNA isolation kit (Ambion, Austin, TX), and the cDNA was obtained using a TaqMan[®] miRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Next, 10 ng of miRNA was reverse-transcribed using sequence-specific stem-loop primers to the has-miR-let7c, hsa-miR-100 and hsa-miR-218 genes. The reaction was performed in 9600 Emulation mode with the following parameters: 30 min at 16°C, 5 min at 42°C, 5 min at 85°C and 4°C until analysis. Quantitative RT-PCR was carried out using the ABI 7500 Fast Real-Time PCR System and a Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). The expression of the individual miRNAs mentioned above was analyzed using miRNA sequence-specific primers. These miRNAs were selected for verification based on their predicated target genes listed in the Sanger miRBase database (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>) (10). miRNA expression levels were assessed by relative quantification, and the fold expression changes were

determined by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (11). All RT-PCRs were performed in duplicate, and the small nucleolar RNA RNU43 was used as the endogenous control.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SPSS 19.0 for Windows, and all reported p-values are two sided. Comparisons of the miRNA and protein expression levels were performed using Student's t and Mann-Whitney tests for homogenous and heterogeneous variables, respectively. For comparison among three or more variables, we used an ANOVA test or the Kruskal-Wallis test for homogenous and heterogeneous variables, respectively. A Chi-squared test was used to compare nominal scale values. A p value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

The results are shown in table 2 and Figure 1. Statistical analysis showed that RAS expression was significantly increased in localized PC (124.93) compared to the lymph nodes (17.64) and that there was an increase in expression when the PC metastasized to the bones (104.04) ($p=0.017$). RB showed an increase in expression from localized PC (12.5%) to lymph node and bone metastases (25.7% and 20.2%, respectively; $p=0.036$). LAMB3 was highly expressed in localized PC (127.3) and lymph node metastases (132.5), but the expression was low in the bone metastases (9.2) ($p<0.001$). Cell proliferation increased from localized PC (11.2%) to the lymph node metastasis (22.3%) and bone metastasis (42.5%) ($p<0.001$). C-MYC, Smarca-5 and Bub-1 expression did not show differences during PC progression ($p=0.253$, $p=0.315$ and $p=0.649$, respectively).

We confirmed the overexpression of miR-let7c, 100 and 218 by qRT-PCR. The results are expressed in figure 2. MiR-100 and 218 were overexpressed in 98.4% of the cases, and miR-let7c was overexpressed in 91.8% of the cases. The IHC expression levels of the proteins were compared to the mean expression of miRNAs, and no statistical relationship was detected for the results that are shown in table 3.

Discussion

Carcinoma of the prostate can vary greatly in biological behavior, ranging from slowly progressive to highly aggressive metastasizing tumors. The introduction of PSA into clinical practice allowed PC to be diagnosed in its early stages, increasing the chances of cure with appropriate treatment. However, 20 to 30% of patients still suffer recurrence after surgery and commonly receive a salvage therapy, such as radiotherapy; however, the disease-free survival rate decreases considerably at this time (2). Therefore, understanding which factors contribute to the prognosis of PC is of paramount importance.

The establishment of biomarkers that reflect crucial biological functions in oncogenesis, such as cell cycling, proliferation and chromosomal instability, would enable better prognostication. We hypothesized that changes in RAS, RB, LAMB3 and Ki-67 expression would be related to these events.

In this study, we found that the expression of RAS, RB, LAMB3 and Ki-67 changed in different stages of PC. There was an increase in proliferation during tumor progression reflected by the higher percentage of Ki-67 expression in bone metastases, followed by lymph node metastases and finally the primary tumors. Ki-67 is a nuclear antigen present throughout the whole cell cycle (G1, S, G2 and M phases) except during the rest phase (G0 phase) or in the early G1 phase (12). Ki-67 nuclear staining has been related to biological aggressiveness and prognosis in several cancers, and a greater proliferative index indicates more aggressive behavior of the neoplasia (13). Ki-67 is a reliable marker of cellular proliferation that correlates well with the uptake of bromodeoxyuridine and thymidine labeling (14). Statistically significant

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

differences in the mean Ki-67 indices of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer have been uniformly reported (15, 16). Previous studies of Ki-67 staining in prostate cancer have shown a variable relationship with tumor stage and grade; however, significant associations have been found between Ki-67 expression and the time to progression, metastatic status and tumor volume (17, 18, 19).

We were unable to show a correlation between the expression of proteins related to the control of cell proliferation and Ki-67 expression. RAS was highly expressed in localized PC; however, an significant decrease in the expression was observed in the lymph node metastases that was regained in the bone metastases. The family of RAS oncogenes has been extensively studied for their involvement in the multistep process of carcinogenesis (20). Overexpression of RAS oncogenes has also been detected in several human cancers, including breast, colon, bladder and lung, and has been associated with the development of the disease (21). RAS activation is implicated in human carcinogenesis mainly by inhibiting apoptosis and promoting cellular proliferation. However, there is considerable evidence that the activated RAS oncogene can also have the opposite action by promoting apoptosis and inhibiting cellular proliferation. Furthermore, this oncogene may have an oncosuppressive role under many circumstances. Therefore, we argue that RAS is important for local tumor growth, but it is not essential for tumor progression, as it is secondary during invasion and metastasization processes.

RB responds in part to the presence of mitogenic signals and controls the cell cycle mainly during the transition from G0 to S by binding and inactivating

transcription factors. Comparing the RB expression between normal prostate tissue and PC, we could see an enormous loss of staining; however, the PC progression from local tissue to the metastases was accompanied by an increase in RB expression. We believe that this increase is a reactive process associated with the increase in cell proliferation. Ambrosch et al. (22) have also shown a loss in the expression of RB in head and neck carcinomas, but this loss was independent of tumor progression. Maddison et al. (23) showed in an in vivo model that the loss of RB induces cell proliferation in the prostate without a transformation; this finding reinforces the fact that RB is important for the control of cell proliferation but may not be related to tumor progression and metastasization.

LAMB3 was maintained in localized and lymph node metastases but was almost completely absent in the bone metastases. Hao et al. (24) have previously shown the same phenomenon in prostate cancer. LAMB3 is a glycoprotein abundant in the basal membrane with important biological activities involved in cell adhesion, migration, angiogenesis and metastasization (25). In the prostate, LAMB3 is expressed in normal and tumoral tissues but as different isoforms. LM332 is predominant in normal prostate tissue (26), and its expression levels decrease during tumor progression. The authors believe that the loss of this specific isoform promotes a crucial change in the extra-cellular matrix that turns it into a weaker environment conducive to metastatic dissemination.

We confirmed the overexpression of the miRNAs let7c, 100 and 218 in localized PC but failed to show the control of protein expression by the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

supposed controller miRNAs. We believe that the regulation of these miRNAs is subtle and not detectable by IHC. Protein expression control is not a binary system, and no evidence of a loss of protein expression related to miRNA expression was detected even with computerized image analysis. Therefore, western blot analysis may be more suitable for the evaluation of the control of proteins by miRNAs.

For Review Only

References

1. Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 62(4):220-41, 2012.
2. Whitmore WJ Jr. Natural history and staging of prostate cancer. *Urol Clin North Am.* 11:209–20, 1984
3. Leite KR, Sousa-Canavez JM, Reis ST, Tomiyama AH, Camara-Lopes LH, Sañudo A, Antunes AA, Srougi M. Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis. *Urol Oncol.* 29(3):265-9, 2011
4. Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with C-MYC. *Science.* 251(4998):1211-7, 1991
5. Stopka T, Skoultchi AI. The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *PNAS.* 100(24):14097-102, 2003.
6. BaRBacid M: RAS genes. *Annu Rev Biochem* 56:779-827, 1987.
7. Adams PD, Kaelin WG Jr. Negative control elements of the cell cycle in human tumors. *Curr Opin Cell Biol.* 10(6):791-7, 1998.
8. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol.* (3):624-35, 2006.
9. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, RASsenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(24):15524-9, 2002
10. Adams BD, Furneaux H, White BA. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERα) and represses ERα messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol Endocrinol* 21:1132–47, 2007
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25:402–8, 2001
12. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 133:1710, 1984.
13. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology.* 17:489, 1990.
14. Cher ML, Chew K, Rosenau W, Carroll PR. Cellular proliferation in prostatic adenocarcinoma as assessed by bromodeoxyuridine uptake and Ki-67 and PCNA expression. *Prostate.* 26:87, 1995.
15. Gallee MPW, Visser-de Jong E, ten Kate FWJ, Schroeder FH, van der Kwast TH. Monoclonal antibody Ki-67 DEFINED Growth fraction in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *J Urol.* 142:1342, 1989.
16. Raymond WA, Leong ASY, Bolt JW, Milios J, Jose JS. Growth fractions in human prostatic carcinoma determined by the Ki-67 immunostaining. *J Pathol.* 146:161, 1988.
17. McLoughlin J, Foster CS, Price P, Williams G, Abel PD. Evaluation of Ki-67 monoclonal antibody as prognostic indicator for prostatic carcinoma. *Brit J Urol* 72:92, 1993.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

18. Sadi MV, Barrack ER. Determination of growth fraction in advanced prostate cancer by Ki-67 immunostaining and its relationship to the time to tumor progression after hormonal therapy. *Cancer*. 67:3065, 1991.

19. Van Weerden WM, Moerings EP, van Kreuning A, de Jong FH, van Steenbrugge GJ, Schröder FH. Ki-67 expression and BrdUrd incorporation as markers of proliferative activity in human prostate tumour models. *Cell Prolif*. 26:67, 1993

20. BaRBacid M: RAS genes. *Annu Rev Biochem* 56:779-827, 1987.

21. Zachos G, Spandidos DA. Expression of RASproto-oncogenes: regulation and implications in the development of human tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 26: 65-75, 1997.

22. Ambrosch P, Schlott T, Hilmes D, Ruschenburg I. p16 alterations and retinoblastoma protein expression in squamous cell carcinoma and neighboring dysplasia from the upper aerodigestive tract. *Virchows Arch* 438(4):343-9, 2001

23. Maddison LA, Sutherland BW, Barrios RJ, Greenberg NM. Conditional deletion of RB causes early stage prostate cancer. *Cancer Res*. 64(17):6018-25, 2004

24. Hao J, Yang Y, McDaniel KM, Dalkin BL, Cress AE, Nagle RB. Differential expression of laminin 5 (alpha 3 beta 3 gamma 2) by human malignant and normal prostate. *Am J Pathol*. 149(4):1341-9, 1996

25. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 200(4):423-8, 2003

26. Nagle RB. Role of the extracellular matrix in prostate carcinogenesis. *J Cell Biochem*. 91(1):36-40, 2004

Legends of figures

Figure 1. 1) Cytoplasmic and nuclear immunoexpression of BUB1 in localized prostate cancer (A and B), in lymph node metastases (C), and in bone metastases (D). 2) Nuclear immunoexpression of c-C-MYC in localized prostate cancer (A and B), in lymph node metastases (C), and in bone metastases (D). 3) Nuclear (A) and cytoplasmic (B) immunoexpression of RAS in localized prostate cancer, in lymph node metastases (C), and in bone metastases (D). 4) Nuclear immunoexpression of RB in normal prostate glands (A), in localized prostate cancer (B), in lymph node metastases (C), and in bone metastases (D). 5) Nuclear immunoexpression of SMARCA5 in localized prostate cancer (A and B), in lymph node metastases (C), and in bone metastases (D). 6) Immunoexpression of LAMB3 in the basal membrane (A) and cytoplasmic staining in localized prostate cancer (B), in lymph node metastases (C), and in bone metastases (D). 7) Nuclear Ki-67 immunoexpression in localized prostate cancer (A), in the lymph node (B), and in bone metastasis (C).

Figure 2. Expression of miR-let7c, miR-100 and miR-218 in 60 cases of localized prostate cancer as part of a TMA to evaluate the protein immunoexpression of their supposed target genes.

Table 1. Antibodies used in TMAs representatives of localized and metastatic prostate cancer to lymph nodes and bones.

Antibody	Clone	Brand
PanRas	F132	Santa Cruz
c-Myc	0.N.222	Santa Cruz
Bub1	Polyclonal	Abcam
Ki-67	Polyclonal	Millipore
Laminin	4C7	Dako
pRb	IF8	Chemicon
SMARCA5 (hSNF2H)	H-300	Santa Cruz

Table 2. Immunohistochemical analyses of proteins that are target of miR-let7c, miR-100 and miR-218. The nuclear staining was evaluated as percentage of positive nuclei whereas cytoplasmic expression was evaluated as an arbitrary unit correspondent to the area occupied by tumor cells.

Antibody	Localized prostate cancer	Lymph node metastasis	Bone metastasis	P=
PanRas	124.9	17.6	104.0	0.017
Myc*	40.2%	57.3%	51.7%	0.253
Bub1	164.65	144.2	152.6	0.649
Laminin	127.3	132.5	9.2	<0.001
Smarca5	68.0%	48.4%	80.5%	0.315
Retinoblastoma*	12.5%	25.7%	20.2%	0.036
Ki-67*	11.2%	22.3%	42.5%	<0.001

*percentage of stained nuclei

Table 3. Correlation between the IHC expression of proteins and the expression of their respective controllers miRNAs analyzed by qRT-PCR

miRNA	Protein	Mean	P=
Let7c	c-myc	Positive – 17.09	0.489
		Negative – 9.01	
	Bub1	Positive – 8.19	0.421
		Negative – 17.57	
	PanRas	Positive – 10.09	0.412
		Negative – 19.4	
100	Smarca5	≤99% - 19.96	0.213
		=100% - 66.14	
	Retinoblastoma	≤9 – 68.04	0.356
		>9 – 33.15	
218	Laminin	Positive – 136.55	0.140
		Negative – 45.90

248x189mm (96 x 96 DPI)

232x118mm (96 x 96 DPI)

Running headline: MicroRNAs and its targets in prostate cancer

The relationship between the expression of the micro RNAs let7c, 100 and 218 and their target RAS, c-MYC, BUB1, SMARCA5 and LAMB3 in prostate cancer

Sabrina T. Reis, Luciana S. Timoszczuk, José Pontes, Jr., Nayara Viana, Iran A. Silva, Nelson Dip, Miguel Srougi, Katia R. M. Leite

Laboratory of Medical Research, Urology Department – LIM55, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

Corresponding author:

Katia R. M. Leite, MD, PhD
Av. Dr. Arnaldo 455, Room 2145
01246-903, Sao Paulo, SP, Brazil
Tel 55 11 30617183
katiaramos@uol.com.br

Grant sponsors: This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo) under protocol number 2009/52158-1

conception and design: Katia R.M. Leite, Sabrina T. Reis, Luciana S. Timoszczuk;
acquisition of data: Luciana S. Timoszczuk José Pontes, Jr., Nelson Dip; **Drafting of the manuscript:** Sabrina Thalita dos Reis, Katia R M Leite; **Administration support:** Nayara Izabel Viana, Iran Amorim Silva; **critical revision and important intellectual content:** Katia Ramos M. Leite; **supervision:** Miguel Srougi