

FRANCISCO CESAR DE SOUSA E SILVA

Frequência de *TP53* na modulação do microambiente tumoral e
progressão do câncer da próstata

Ribeirão Preto - SP

2023

FRANCISCO CESAR DE SOUSA E SILVA

Frequência de *TP53* na modulação do microambiente tumoral e
progressão do câncer da próstata

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Jeremy Andrew Squire

Ribeirão Preto - SP

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Silva, Francisco Cesar de Sousa e

Frequência de *TP53* na modulação do microambiente tumoral e progressão do câncer da próstata/ Francisco Cesar de Sousa e Silva; orientador, Jeremy Andrew Squire - 2023.

77 f. il 30cm

Ribeirão Preto, 2023

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Versão original

1. Câncer de próstata; 2. Microambiente tumoral; 3. Progressão; 4. *TP53*.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Francisco Cesar de Sousa e Silva

Frequência de *TP53* na modulação do microambiente tumoral e progressão do câncer da próstata.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire

Parecer: _____, ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico esta dissertação a minha mãe. Sua grande força foi a mola propulsora que permitiu o meu avanço, mesmo durante os momentos mais difíceis. Agradeço do fundo do meu coração.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a **Deus**, sem sua infinita misericórdia não teria conseguido chegar tão longe.

Agradecer a minha mãe **Rosa Félix de Sousa**, por todo apoio e motivação, principalmente nos momentos em que pensei em desistir.

Ao meu orientador **Dr Jeremy Andrew Squire**, por todo conhecimento a mim transmitido, sou muito grato por ter passado esses anos sendo seu aluno.

Aos meus colegas de laboratório **William Lautert**, **Luiz Paulo** e **André Luiz**, por esse período de convivência harmonioso e de muitas trocas.

A minha grande companheira de laboratório **Dr Camila Morais Melo**, por sua enorme paciência para comigo, por seus auxílios e descontrações.

A **Dr Gilmara Ausech Antonucci**, por todo apoio e incentivo para com minha pessoa.

A **Dr Jane Bayani** e a todos os colaboradores do Instituto de Investigação do Câncer de Ontário (OICR) em Toronto, por nossa parceria na realização deste trabalho.

Os autores reconhecem o uso das instalações do Queens Laboratory for Molecular Pathology (QLMP) e a assistência do técnico **Lee Boudreau** na condução dos experimentos.

As técnicas **Daise Lúcia Chesca** do departamento de de Neuropatologia e a **Vani maria Alves** do departamento de Biologia Células e Molecular, pelos auxílios nos experimentos realizados neste trabalho.

Ao **Dr Rodolfo Borges dos Reis** e ao **Dr Fabiano Saggiaro** pela colaboração nesta pesquisa.

Ao **Dr Filipe Avante**, pelo auxílio na atualização de nossa coorte.

Ao **Departamento de Cirurgia e Anatomia** e a **Universidade de São Paulo**, pelas instalações e equipamentos a mim ofertados para realização deste trabalho.

A secretária do departamento de cirurgia e anatomia **Juliana Pischiotin**, pelos auxílios nas partes burocráticas.

À **CAPES** – o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –Brasil (CAPES) - Código do financiamento 001.

RESUMO

SILVA, F. C. S. **Frequência de *TP53* na modulação do microambiente tumoral e progressão do câncer da próstata.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Sabe-se que a perda ou mutação do *TP53* no câncer promove a progressão do tumor. No entanto, o papel do *TP53* mutado nos tumores primários do câncer da próstata (do inglês, *Prostate Cancer*, PCa) continua a ser pouco conhecido. Embora se acreditasse inicialmente que as mutações do *TP53* ocorriam tardiamente na doença e se correlacionavam com metástases e resistência à terapêutica de castração, estudos recentes demonstraram uma inativação inesperadamente frequente do *TP53* no PCa primário. No entanto, existem poucos dados sobre a forma como as alterações na expressão do gene *TP53* de tipo selvagem nas fases iniciais da doença podem influenciar a progressão do tumor e o impacto no microambiente do PCa. Neste estudo, o nosso objetivo foi investigar os efeitos de níveis reduzidos e aumentados de expressão do RNA *TP53* em genes diferencialmente expressos (DEGs) e vias a jusante associadas à progressão tumoral. Utilizamos uma coorte retrospectiva de 51 doentes com PCa de risco intermédio do nosso instituto (FMRP). O RNA extraído de amostras de tumor fixadas em formalina e embebidas em parafina foi analisado utilizando o painel Nanostring PanCancer, que inclui 730 genes de vias relacionadas com a progressão do tumor. Efetuamos análises de expressão diferencial e de enriquecimento de vias, comparando parâmetros clínicos de doentes com DEGs de interesse e classificando a expressão de RNA tumoral em níveis elevados e baixos de *TP53*. Nossos achados revelaram vários DEGs *down* regulados associados à alta expressão de *TP53*, incluindo três genes da via WNT (*WNT10A*, *WNT7A* e *WNT6*) e cinco genes da via FGF (*FGF4*, *FGE21*, *FGF23*, *FGF14* e *FGF22*). Além disso, observamos a *up* regulação de DEGs como *POLB*, *PLA1*, *E2F5*, *IL20RA* e *NOL7* com elevada expressão de *TP53*. A análise de enriquecimento identificou as vias Wnt-beta Catenin, KRAS, sistema imunitário complementar, PI3K/AKT/mTOR e reparação do DNA como estando associadas a níveis de expressão de *TP53* alterados. Para validar os nossos resultados, realizamos análises TCGA, que demonstraram a *down* regulação de genes da família WNT (*WNT6* e *WNT10A*) em tumores de PCa com níveis elevados de expressão de *TP53*, o que é consistente com os nossos resultados Nanostring utilizando a coorte FMRP. A nossa análise destaca vários DEGs associados à expressão de *TP53* que desempenham papéis distintos na progressão do tumor e na resposta imunitária. Muitos destes DEGs foram previamente descritos como potenciais biomarcadores de prognóstico ou foram associados a alterações no microambiente tumoral do PCa. De um modo geral, os nossos resultados sublinham a importância de compreender como as perturbações nos níveis de expressão do *TP53* podem influenciar as vias de progressão no PCa. Este conhecimento poderá contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos e para o desenvolvimento de melhores marcadores de prognóstico para os doentes com PCa.

Palavras-Chave: Câncer de Próstata, Microambiente Tumoral, Progressão, *TP53*.

ABSTRACT

SILVA, F. C. S. ***TP53* frequency in the modulation of tumor microenvironment and progression of prostate cancer.** 2023. Dissertation (Master of Science) Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Loss or mutation of TP53 in cancer is known to promote tumor progression. However, the role of mutated TP53 in primary prostate cancer (PCa) tumors remains poorly understood. Although it was initially believed that TP53 mutations occurred late in the disease and correlated with metastasis and resistance to castration therapy, recent studies have demonstrated an unexpectedly frequent inactivation of TP53 in primary PCa. However, little data exist on how changes in wild-type TP53 gene expression in the early stages of the disease may influence tumor progression and the impact on the PCa microenvironment. In this study, we aimed to investigate the effects of reduced and increased levels of TP53 RNA expression on differentially expressed genes (DEGs) and downstream pathways associated with tumor progression. We used a retrospective cohort of 51 intermediate risk PCa patients from our institute (FMRP). RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples was analyzed using the PanCancer Nanostring panel, which includes 730 genes from pathways related to tumor progression. We performed differential expression and pathway enrichment analyses, comparing clinical parameters of patients with DEGs of interest and classifying tumor RNA expression into high and low TP53 levels. Our findings revealed several down regulated DEGs associated with high TP53 expression, including three WNT pathway genes (WNT10A, WNT7A and WNT6) and five FGF pathway genes (FGF4, FGE21, FGF23, FGF14 and FGF22). In addition, we observed up-regulation of DEGs such as POLB, PLA1, E2F5, IL20RA and NOL7 with high expression of TP53. Enrichment analysis identified the Wnt-beta Catenin, KRAS, complementary immune system, PI3K/AKT/mTOR and DNA repair pathways as being associated with altered TP53 expression levels. To validate our results, we performed TCGA analyses, which demonstrated down regulation of WNT family genes (WNT6 and WNT10A) in PCa tumors with elevated TP53 expression levels, which is consistent with our Nanostring results using the FMRP cohort. Our analysis highlights several DEGs associated with TP53 expression that play distinct roles in tumor progression and immune response. Many of these DEGs have been previously described as potential prognostic biomarkers or have been associated with changes in the tumor microenvironment of PCa. Overall, our results underscore the importance of understanding how perturbations in TP53 expression levels may influence progression pathways in PCa. This knowledge may contribute to the identification of new therapeutic targets and the development of better prognostic markers for patients with PCa.

Key words: Prostate Cancer, Tumor Microenvironment, Progression, *TP53*.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| PCa | Câncer de próstata |
| PSA | Antígeno prostático específico |
| <i>HKLK3</i> | Peptidase 3 Relacionada à Calicreína |
| TME | Microambiente tumoral |
| TILs | Linfócitos Infiltrantes de Tumor |
| <i>PTEN</i> | Fosfatase Homóloga à Tensina |
| MDSCs | Células supressoras derivadas de mieloides |
| FoxP3 | Forkhead Box P3 |
| <i>IDO1</i> | indoleamina 2,3-dioxigenase 1 |
| <i>TP53</i> | Proteína Tumoral P53 |
| BCR | Recorrência Bioquímica |
| HCRP | Hospital da Clinicas de Ribeirão Preto |
| FFPE | Fixados em Parafina Formalina |
| FMRP-USP | Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| µm | Micrómetro |
| OICR | Instituto de Investigação do Câncer de Ontário |
| H&E | Hematoxilina-Eosina |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de seleção e marcação de tumores para a coorte HC-FMRP de PCa. As amostras de adenocarcinoma da próstata com áreas tumorais identificadas (marcações a caneta preta) foram efetuadas pelo patologista do estudo (FPS).....27

Figura 2. Dados do controle de qualidade de RNA utilizando o software nSolver da coorte HC-FMRP. Duas amostras (42, 43) não passaram nas métricas de controle de qualidade (pontos vermelhos) e foram excluídas dos estudos transcriptômicos. Duas amostras apresentadas com pontos cinzas eram de qualidade limítrofe e foram incluídas em estudos subsequentes.....31

Figura 3. Gráfico de vulcão que mostra o padrão de expressão do painel de 730 genes da via PanCancer associado aos níveis de expressão de TP53 na coorte de 53 tumores HC-FMRP. O eixo Y é $-\log_{10}(\text{p-value})$ e o eixo X é $\log_2(\text{FoldChange})$ para a comparação TP53 high vs TP53 low. As linhas vermelhas horizontais e verticais indicam os limiares de FDR e os limiares de valor p. Os genes significativos situam-se na parte superior do gráfico, acima das linhas horizontais, e os DEGs relacionados com níveis de expressão elevados de TP53 situam-se em ambos os lados da região central do gráfico. Os genes são coloridos de forma adequada, com o azul a indicar DEGs *down* regulados e o vermelho a indicar DEGs *up* regulados em relação à expressão elevada de TP53.....33

Figura 4. Heatmap não supervisionado que representa os 50 DEGs principais do painel PanCancer da Nanostring, comparando os níveis de expressão TP53 elevados com os níveis de expressão TP53 baixos. Os DEGs foram classificados de acordo com a pontuação de risco PCARA-S (roxo = elevado, laranja = intermediário e rosa = baixo); recorrência bioquímica (BCR), verde = sem recorrência, mostarda = com ocorrência e TP53, vermelho elevado e azul baixo. Dois grupos distintos de expressão genética identificam DEGs que estão *up* regulados (*Cluster A*) ou *down* regulados (*Cluster B*) em relação ao estado de expressão de TP53.....35

Figura 5. Gráfico de vulcão representando genes diferencialmente expressos na coorte TCGA TP53 high vs TP53 low utilizando 420 amostras de adenocarcinoma

da próstata. Azul = genes regulados para baixo, vermelho = genes regulados para cima. Log2 foldchange > 0,5 Padj <0,05.....37

Figura 6. Heatmap não supervisionado representando os genes diferencialmente expressos na coorte TCGA do grupo TP53 alto vs. TP53 baixo. heatmap não supervisionado representando os genes diferencialmente expressos na coorte TCGA do grupo TP53 alto vs TP53 baixo. vermelho TP53 baixo e azul TP53 alto.....38

Figura 7. Citometria de fluxo utilizando o software CIBERSORTX para comparar a coorte TCGA TP53 alta vs. TP53 baixa. Em vermelho temos TP53 high, em azul TP53 intermediário e em verde temos TP53 Low. *P=0,001 **P=0,005.....40

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Coorte de tumores HC-FMRP derivada de 53 doentes com câncer da próstata de risco intermediário. TNM - Classificação de Tumores Malignos, BCR - Recorrência Bioquímica. CAPRA-S = Cancer of the Prostate Risk Assessment; pontuação da Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) para a classificação de Gleason..... | 24 |
| Tabela 2. Porcentagem de células tumorais por amostra na coorte HC-FMRP. Para amostras de tumores com duas áreas distintas dissecadas, a porcentagem apresentada é a média de ambas as regiões..... | 28 |
| Tabela 3. Dez principais genes <i>down</i> e <i>up</i> regulados com base no Log2FoldChange e nos valores de p ajustados. Os dez genes superiores listados são os DEGs <i>down</i> regulados mais bem classificados (Log2 FoldChange negativo) associados aos níveis de expressão do RNA do <i>TP53</i> . Do mesmo modo, os dez DEGs <i>up</i> regulados com classificação mais elevada (Log2 FoldChange positivo) são apresentados abaixo. Os DEGs também são apresentados graficamente como um gráfico de vulcão na Figura 3 e um Heatmap na Figura 4..... | 34 |
| Tabela 4. Enriquecimento da <i>up</i> regulação dos 50 DEGS na coorte <i>TP53</i> high vs. Low da FMRP..... | 36 |
| Tabela 5. Genes diferencialmente expressos no grupo <i>TP53</i> alto <i>TP53</i> baixo. Coorte TCGA. Top 20 genes diferencialmente expressos, top 10 Down regulated, top 10 UP regulated. Figura 6 Quantificação..... | 37 |
| Tabela 6. Vias diferencialmente expressas na coorte TCGA <i>TP53</i> high vs. <i>TP53</i> low. Vias diferencialmente expressas na coorte TCGA <i>TP53</i> high vs. <i>TP53</i> low. 420 amostras de adenocarcinoma analisadas da coorte TCGA..... | 39 |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Câncer..... | 15 |
| 1.2 Câncer de Próstata..... | 16 |
| 1.3 Microambiente Tumoral do PCa..... | 18 |
| 1.4 Papel do gene <i>TP53</i> no Câncer de Próstata | 19 |
| 1.4.1 <i>TP53</i> | 19 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 22 |
| 3. OBJETIVO..... | 22 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 22 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 22 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 23 |
| 4.1 Coorte | 23 |
| 4.1.2 Critérios de Inclusão | 25 |
| 4.1.3 Critério de Exclusão..... | 26 |
| 4.2 Coleta das Amostras..... | 26 |
| 4.2.1 Marcação de área tumoral | 26 |
| 4.2.2 Nanostring | 27 |
| 4.2.2.1 Isolamento de RNA..... | 27 |
| 4.2.2.2 Análise de Transcrição | 29 |
| 4.3.1 Análise de Citometria Digital | 31 |
| 4.3.2 Análise Estatística..... | 31 |
| 5. RESULTADOS | 32 |
| 5.1 Características do grupo de Pacientes..... | 32 |
| 5.2 Nanostring | 32 |
| 5.2.1 DEGs e vias de progressão associadas à expressão de <i>TP53</i> no PCa de risco intermédio HC-FMRP | 32 |
| 6. DISCUSSÃO | 40 |
| 6.1 Comparação dos grupos <i>TP53</i> high vs <i>TP53</i> low | 40 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 44 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |
| 9. ANEXOS | 51 |
| ANEXO A – Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa..... | 51 |
| ANEXO B – Carta de Aprovação da Unidade de Pesquisa Clínica (UPC)..... | 54 |
| ANEXO C – Resultados Preliminares de Imuno-histoquímica..... | 55 |
| ANEXO D – Desenvolvimento Científico. | 61 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma desordem que ocorre em células no corpo humano. A palavra câncer vem do grego *karkínos*, que significa carangueijo/câncer. A utilização desse termo foi citada pela primeira vez por Hipócrates, também considerado o pai da medicina (ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer/INCA, 2020). O processo de carcinogênese ou oncogênese, se dá quando células normais passam por estresses físicos, químicos e ou biológicos. Essas células, então, adquirem alterações que aumentam sua capacidade proliferativa e, também, para evitar os sistemas de defesa do organismo do hospedeiro (HANAHAN, 2022). A partir deste momento, o organismo não consegue mais controlar a proliferação desta célula. Com a proliferação sem controle, uma massa celular se desenvolve no local da lesão. Essa lesão é chamada de massa tumoral e pode afetar muitos outros sistemas (DE BONO et al., 2020). Além disso, quando nos referimos ao câncer, não estamos falando apenas de um único tipo de lesão, mas, ao contrário, estamos nos referindo a um conjunto com mais de 100 doenças (ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer/INCA, 2020).

O processo neoplásico depende que as células tumorais apresentem algumas características particulares. Basicamente, essas características envolvem mecanismos moleculares relacionados com aumento da capacidade para sustentar a sinalização proliferativa, diminuição da ação de supressores de crescimento, resistência a morte celular, imortalização celular, angiogênese, progressão e metástase, reprogramação do metabolismo celular e evasão da destruição imune. Ainda, o câncer pode ser dividido em dois estágios básicos: (1) a fase localizada, onde o câncer ainda se encontra na região primária e não invadiu tecidos adjacentes, e (2) a fase metastática, onde o câncer, agora mais agressivo, invade tecidos adjacentes ao órgão de origem. Esta, ainda, pode invadir tecidos distantes da área original do tumor primário (ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer/INCA, 2023). Além disso, o microambiente tumoral desempenha papel integral na tumorigênese e progressão maligna (HANAHAN, 2022).

1.2 Câncer de Próstata

O câncer de próstata (do inglês, *Prostate cancer*, PCa) é um dos tipos tumorais mais frequentes em homens. O PCa apresenta incidência mundial de 59% em homens com mais de 70 anos (BELL et al., 2015; RAWLA, 2019; SHAH; IOFFE, 2020). A alta ocorrência de PCa se dá por vários fatores exógenos/ambientais que são fatores externo ao organismo, tais como idade, alimentação, estilo de vida. Também temos a ação de fatores endógenos, que são fatores causados no próprio organismo, tais como, fatores hereditários, mutações somáticas e germinativas, entre outros. (MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2023; ZUNIGA et al., 2020; LEITZMANN; ROHRMANN, 2012). No Brasil, estimam-se que até 2025 cerca 71.730 novos casos de PCa sejam diagnosticados por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2023).

A medição dos níveis de marcadores prostáticos é amplamente utilizada para auxiliar no processo diagnóstico do PCa. Por exemplo, a medição dos níveis do antígeno prostático específico (PSA) é uma forma utilizada na rotina clínica (JUNIOR et al., 2015; OTO et al., 2020; THOMSEN et al, 2020). O PSA é uma glicoproteína codificada pelo gene *HKLK3*, localizado no cromossomo 19, na região q13.2 – q13.4 (REBELLO et al., 2021). Em condições normais da próstata, o PSA é secretado pelas células epiteliais do tecido prostático em direção os ductos secretores, contribuindo assim com o volume do líquido seminal. Durante o desenvolvimento do PCa, a camada de células basais que sustenta os ácinos secretores se rompe e, com isso, ocorre o “extravasamento” do PSA na circulação, levando à um aumento anormal do seu nível (BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2016; CRUMBAKER; KHOJA; JOSHUA, 2017; KUMAR; SINGH, 2020; CARLSSON et al., 2022). Contudo, o PSA é específico do órgão e não da doença. Por exemplo, o PSA pode ser expresso em níveis elevados não somente por causa do PCa, mas também pode ocorrer mediante a outras anomalias não cancerígenas, como a hiperplasia prostática benigna. De maneira geral, embora os níveis de PSA possam ser relacionados a tecidos benignos, a medição dos níveis de PSA ainda é considerado um excelente biomarcador para o diagnóstico do PCa (EISERMANN; FRAIZER, 2017; CRAWFORD et al., 2019; ZHENG et al., 2020; DUFFY, 2020).

Depois de diagnosticado, o tumor é classificado seguindo suas características histológicas através do score de Gleason (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). A avaliação consiste classifica os tumores em uma escala que vai de 1-5. Para ter uma pontuação final, após a realização da biópsia, são coletadas amostras de dois pontos diferentes do tumor, as quais compõe a maior parte do tumor. Ao comparar a aparência do tecido tumoral com o tecido prostático normal, é feita uma descrição das características teciduais do tumor, como, por exemplo: a forma dos ácinos e a disposição das células. Ao final da descrição e pontuação de suas características, a amostra tumoral recebe um score final. Por exemplo, uma amostra com score de Gleason de 8, recebeu duas notas, as quais, quando somadas, geraram o score final (INAMURA et al., 2018). Em um score de Gleason 3, temos uma amostra com glândulas bem diferenciadas e densas. No Gleason 4, temos um padrão glandular cribriforme mau formados e com uma glândula se fundindo a outras. No Gleason 5, ocorre a presença de um padrão conhecido como “ninho de células”, onde a presença de lúmen glandular não pode ser mais identificada (SILVA-RODRÍGUEZ et al., 2020). Tumores com score de Gleason até 6 são considerados como de baixo grau. Entretanto, tumores com pontuação 7 e de 8-10 são classificados como de risco intermediários e alto, respectivamente. Esse tipo de classificação auxilia na classificação e direcionamento correto do paciente para os devidos tratamentos (MEILIANA; WIJAYA, 2014; BULTEN et al., 2020).

O tratamento do PCa é determinado de acordo com o tipo da doença, primário ou metastático, e com o estadiamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; TILKI; EVANS, 2020). Os pacientes com carcinoma localizado da próstata podem ser submetidos à prostatectomia radical. Pacientes com contraindicação à cirurgia podem optar pela radioterapia, que pode ser externa ou intersticial. Além destes dois tratamentos, temos ainda a observação vigilante que é destinada à pacientes acima de 75 anos, com expectativa de vida limitada e tumores de baixo grau histológico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; TILKI; EVANS, 2020). Para os pacientes com câncer de próstata localmente avançado, o tratamento consiste em uma combinação de bloqueio hormonal, através da deprivação androgênica (MORIS et al., 2020), e cirurgia radical e/ou radioterapia externa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; TILKI; EVANS, 2020). Em alguns casos, os pacientes podem apresentar um caso de PCa metastático. Ainda, alguns pacientes podem desenvolver a resistência a tratamentos iniciais, o que contribui para o avanço de tumores avançados resistentes a terapias

convencionais. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; SRINIVAS et al., 2020). Dessa forma, o avanço de doenças agressivas e resistentes acabam sendo um dos principais problemas enfrentados pela população diagnosticada com PCa.

Recentemente, o tratamento com imunoterapia obteve grandes avanços e diversas modalidades de imunoterapia foram descritas (STERNER; STERNER, 2021; ABBOTT; HUGHES-PARRY; JENKINS, 2022). Entre elas, existem: a terapia com anticorpos monoclonais de bloqueio de inibidores do controle imunológico (*inhibitor check-point blockage*, ICB), Terapia de Receptor de Antígeno Quimérico de Células T (Do inglês, *Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cell therapy, CAR-T cell*) e vacinas. De modo geral, essas terapias estimulam o microambiente tumoral do tumor para eliminar as células malignas através da atividade das células imunes. Essas terapias têm encontrado resultados promissores nos tumores imunologicamente quentes, os quais apresentam uma maior abundância de células imunes no seu microambiente tumoral. Entretanto, embora essas terapias tenham promovido ótimos resultados em diversos tipos de câncer, as imunoterapias têm se mostrado muito eficientes em apenas um pequeno grupo de pacientes (STERNER; STERNER, 2021; ABBOTT; HUGHES-PARRY; JENKINS, 2022). Por exemplo, estudos com esse tipo de tratamento no câncer de próstata não têm sido muito promissores, uma vez que este câncer é classificado como imunologicamente frio (FAY; GRAFF, 2020, MCDOWELL, 2019; MELO et al., 2021). Ao contrário dos tumores imunologicamente quentes, os tumores frios apresentam baixa abundância de células imunes no seu microambiente tumoral, o que prejudica a resposta ao tratamento.

1.3 Microambiente Tumoral do PCa

Os tumores de próstata não são constituídos apenas por células tumorais, mas também contêm uma organização de células não tumorais. O microambiente tumoral (Do inglês, *Tumor microenvironment*, TME), inclui células imunitárias, células do estroma, vasos sanguíneos e matriz extracelular (ANDERSON; SIMON, 2020). Inicialmente, não se conhecia quais fatores derivados do TME estavam envolvidos na promoção do processo tumorigênico. Porém, foi demonstrado que algumas células que compõem o TME interagem com o tumor e podem ser responsáveis pela inibição de células efectoras (SIEMANN, 2020).

O câncer de próstata é um tumor heterogêneo e pensa-se que a interação com seu microambiente contribui para a progressão do tumor. Por exemplo, as células T reguladoras (Tregs) ou células T auxiliares podem contribuir para a progressão do PCa, uma vez que estas células inibem a ação das células T efetoras. As células T efetoras são responsáveis pelo ataque direto as células tumorais (FAY; GRAFF, 2020, DE BONO et al., 2020, MELO et al., 2021, IONESCU et al., 2022). Protegendo assim o organismo do paciente do processo de carcinogênese ou quando já iniciado o processo carcinogênico, a ação das células T efetoras é para que a massa tumoral não progrida. As células T CD8 é um grande exemplo de células de células T efetoras. As T CD8 são células citotóxica responsável por atacar as células cancerígenas. Sua ação é auxiliada por outro tipo de células T efetora, conhecida como T CD4 (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2012).

Ao contrário de outros tipos de câncer, como o melanoma ou as neoplasias malignas com instabilidade de microssatélites, o PCa é classificado como imunologicamente frio (WANG et al., 2022). Acredita-se que esta característica influencia negativamente na resposta ao tratamento com imunoterapia com inibidores *check-point* imunitário no PCa (VITKIN et al., 2019), embora os mecanismos moleculares não envolvidos na resistência não sejam atualmente claras. Entretanto, estudos sugerem que o microambiente tumoral do PCa desempenha um papel fundamental na resposta ao tratamento e na resistência ao tratamento (IONESCU et al., 2022, VIDOTTO et al., 2019).

1.4 Papel do gene *TP53* no Câncer de Próstata

1.4.1 *TP53*

Estudos recentes demonstraram que alterações genômicas e em nível transcricional de alguns genes modulam a concentração de células imunes no microambiente tumoral (KAUR et al., 2019). Por exemplo, mutações missensses no gene *TP53* estão associadas a uma maior densidade de células T no PCa (KAUR et al., 2019), o que sugere um envolvimento da função deste gene na modulação do infiltrado imune.

Significativamente, a perda da função do p53 resulta em alterações marcantes na secreção de quimiocinas/citocinas, levando a efeitos importantes no ambiente imunitário do PCa (BEZZI et al., 2018). As mutações somáticas do *TP53* podem comprometer os mecanismos de reparação do DNA, conduzindo à instabilidade genômica e a um aumento da carga mutacional nos tumores (WILLIAMS; SCHUMACHER, 2016). Esta carga mutacional elevada pode gerar neoantígenos, que são potenciais alvos de reconhecimento imunitário. No entanto, a presença de mutações no *TP53* parece perturbar a apresentação adequada destes neoantígenos ou induzir mecanismos que suprimem as respostas imunitárias contra eles, limitando a eficácia da imunoterapia (KAUR et al., 2019). O gene supressor de tumor *TP53* pode também contribuir diretamente para as respostas imunitárias contra o câncer, uma vez que inibe a expressão de *CXCL17*, uma citocina que recruta Células supressoras derivadas de mieloides (do inglês, *Myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) que estão altamente associados à imunossupressão (MELO et al., 2021). As mutações no *TP53* encontram-se em 20-50% dos casos de PCa (ABIDA et al., 2019, LIU et al., 2021). Foi demonstrado que a perda da proteína p53 nos tumores tem impacto na imunossupressão através do aumento da expressão de PD1 e PDL-1 e da ativação da sinalização NF- κ B (GUO; CUI, 2019, MUÑOZ-FONTELA et al., 2016, AGUPITAN et al., 2020). Existem também provas de que a perda de p53 conduz a níveis aumentados de MDSCs imunossupressoras (GUO; CUI, 2019, BLAGIH et al., 2020) e a uma indução de citocinas inflamatórias no microambiente tumoral de vários cânceres.

Nas células tumorais, a inativação do *TP53* por mutação ou deleção conduz geralmente à perda de expressão do RNA e da proteína TP53. A mutação somática do *TP53* em tumores resulta na perda da proteína p53 e no aumento da expressão de genes-alvo regulados em *downstream*, levando à parada do ciclo celular, reparação do DNA, envelhecimento ou apoptose (HASSIN; OREN, 2023). Anteriormente, a análise dos níveis de expressão de RNA do *TP53* utilizando tumores TCGA mostrou que existia uma grande variação intertumoral nos níveis de expressão em tumores de tipo selvagem e com mutação do *TP53* (LAWRENCE et al. 2019). Wang et al (WANG et al., 2017) estudaram DEGs em tumores de PCa PRAD com mutação do *TP53* e de tipo selvagem e verificaram que 12% dos tumores com mutação do *TP53* apresentavam níveis elevados de expressão do RNA do *TP53*. O seu estudo salientou a importância das redes de interação do *TP53* e das alterações da expressão genética

a *downstream*, mas não investigou a forma como os diferentes níveis de expressão do *TP53* a nível do RNA poderiam afetar as vias relacionadas com a progressão do tumor.

Estudos mostram que a perda desse supressor tumoral pode provocar o avanço do PCa. BEZZI et al., 2018, utilizando modelos animais, mostrou que a perda de *TP53* leva a alterações críticas no microambiente tumoral do PCa. Essas alterações levam a evasão imunológica e progressão da doença. Os autores observaram que nos modelos animais nulos de *TP53*, houve uma maior infiltração de células T e Macrófago. Além disso, os autores notaram que os macrófagos se assemelhavam fenotipicamente a M2 e que o aumento de células T refletia ao recrutamento de células Treg. Esses resultados mostram que a deficiência neste gene pode classificar um microambiente potencialmente favorável para a evasão imunológica PCa.

O *TP53-WT* é responsável pelo controle do ciclo celular juntamente com o gene *RB1*. *TP53-WT* também possui papel importante reparo do DNA e na indução a apoptose. Entretanto, os efeitos da diminuição da expressão do *TP53-WT* no ambiente imunitário do TME no PCa são complexos e pouco compreendido. Dessa forma, a investigação dos efeitos da alta ou baixa expressão do *TP53-WT* na modulação das células imunes no TME e, quais os efeitos na progressão do tumor ainda são poucos entendidos. Além disso, o estudo dos efeitos causados pela alta ou baixa expressão do *TP53-WT* pode gerar resultados importantes para entender os mecanismos de evasão imune e progressão tumoral que podem estar associados com a esse tipo tumoral.

Neste estudo, investigamos os efeitos dos níveis reduzidos e aumentados de expressão do RNA de *TP53-WT* nos genes diferencialmente expressos (DEGs) e nas vias a *downstream* da progressão tumoral, utilizando uma coorte retrospectiva de PCa de risco intermédio deste instituto. Utilizamos o painel transcriptômico Nanostring PanCancer para a caracterização da expressão genética utilizando RNA extraído de amostras de tumor fixadas em formalina e incluídas em parafina (FFPE) (VELDMAN-JONES et al., 2015). A análise de enriquecimento baseada nas funções conhecidas dos DEGs associados ao *TP53* sugerem que as vias Wnt-beta Catenin, KRAS, PI3K/AKT/mTOR e Reparação do DNA estão envolvidas na progressão relacionada com o *TP53* no PCa. Além disso, efetuamos uma comparação de validação com os dados do TCGA. Esses resultados indicam o papel das vias de reparação do DNA, de

processamento do mRNA e de modificação das histonas quando o *TP53* apresenta uma expressão alterada. A descoberta de um grande número de genes alvo do p53, que conferem ao p53 a função de supressor de tumores, conduziu a modelos cada vez mais complexos da função do p53 (FISCHER, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos prévios do nosso grupo e descobertas recentes da literatura sugerem que mutações somáticas e mecanismos regulatórios modulam a expressão do gene *TP53*, mas os efeitos da alta ou baixa expressão do *TP53-WT* na evasão imune são pouco conhecidos. Ainda, ainda é pouco elucidado como essas alterações em nível de expressão do gene *TP53-WT* influencia/modula genes imunomodulatórios e vias relacionadas a evasão imune no câncer de próstata. Portanto, investigamos os efeitos dos níveis reduzidos e aumentados de expressão do RNA em uma coorte retrospectiva de PCa de risco intermédio deste instituto. Nós investigamos alterações em nível de genes diferencialmente expressos (DEGs) e nas vias relacionadas.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

- Investigar os efeitos dos níveis reduzidos e aumentados de expressão do RNA do gene *TP53* em genes e vias envolvidas na progressão do tumor, resposta ao tratamento e evasão imunológica em pacientes com câncer de próstata.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos dos níveis reduzidos e aumentados de expressão do RNA do gene *TP53* no transcriptoma de pacientes com câncer de próstata.

- Anotar as vias envolvidas na progressão do tumor, na resposta ao tratamento e nas funções imunológicas dos genes diferencialmente expressos da análise do transcriptoma de pacientes com câncer de próstata classificados com níveis reduzidos e aumentados de expressão do RNA do gene *TP53*.
- Validar os achados de transcriptoma da coorte retrospectiva de PCa de risco intermédio deste instituto com dados públicos do *The Cancer Genome Atlas (TCGA) Prostate Adenocarcinoma*.
- Quantificar a composição de células imunes no microambiente tumoral (*Tumor microenvironment, TME*) de pacientes com câncer de próstata classificados com níveis reduzidos e aumentados de expressão do RNA do gene *TP53* utilizando dados transcriptômicos da coorte do TCGA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coorte

Para este trabalho, utilizamos um total de 53 amostras de câncer de próstata. Os pacientes, que foram submetidos a prostatectomia radical, foram previamente selecionados pelo nosso grupo (VIDOTTO et al., 2019, PICANÇO-ALBUQUERQUE et al., 2019). Todas as amostras incluídas na coorte eram de PCa primário coletado por prostatectomia radical seguindo as diretrizes clínicas da National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (MOHLER et al., 2019) no Departamento de Cirurgia e Anatomia, Divisão de Urologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, BR, entre 2007 e 2015 (Tabela 1). Seguindo essas orientações, as próstatas menores foram submetidas na íntegra para análise anatomopatológica (FPS). Para a coleta parcial de amostras no caso de glândulas maiores, seguimos o protocolo de enviar sempre todo o tumor visível (quando identificado), o tumor e o tecido periprostático associado e suas margens, além de toda a margem apical e do colo vesical e a junção de cada vesícula seminal com a próstata propriamente dita. Se não houvesse um tumor visível, utilizamos uma estratégia de amostragem sistemática que consistia em submeter o aspecto posterior de cada corte transversal, juntamente com um bloco anterior médio de cada lado, bem como a totalidade das margens apicais e do colo vesical e a junção de cada vesícula seminal com a próstata. Os pacientes foram classificados de acordo

com a presença de recidiva bioquímica (Do inglês, *biochemical recurrence*, BCR), definida como PSA>0,2 ng/ml no prazo de seis meses após a prostatectomia radical. O escore de risco CAPRA-S (Do inglês, *Cancer of the Prostate Risk Assessment Score*, CAPRA-S) (COOPERBERG; HILTON; CARROLL, 2011) foi utilizado para estimar o prognóstico da recidiva do câncer de próstata após cirurgia de primeira linha. Este sistema de pontuação incorpora fatores clínicos e patológicos, como o nível de PSA pré-tratamento, a pontuação patológica de Gleason, a margem cirúrgica, a extensão extracapsular, a invasão da vesícula seminal e a invasão dos gânglios linfáticos, para prever o risco relativo de progressão bioquímica e varia entre 1 e 12. Os pacientes foram estratificados com base nas suas pontuações CAPRA-S nas categorias baixa (0-2), intermédia (3-5) e alta (6-12). Os dados de acompanhamento foram recolhidos até à visita mais recente. Este estudo retrospectivo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP) sob o registro CAAE: 40951020.4.0000.5440; também foi submetido ao comitê de ética da Universidade de Toronto, aprovado sob o protocolo 00043323. O projeto regular ao qual este trabalho está inserido também foi submetido ao comitê de ética e aprovado CAAE 60032122.8.0000.5440. Os pacientes foram informados que as amostras coletadas poderiam ser utilizadas voluntariamente na pesquisa e foi preenchido o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo comitê de ética do HC-FMRP-USP.

Tabela 1. Coorte de tumores HC-FMRP derivada de 53 doentes com câncer da próstata de risco intermediário.

| Sample_ID | ISUP | Age at Surgery | Perineural Inv. | TNM | Gland Weight (g) | Extraprostatic Inv. | Capra_S | BCR |
|------------|------|----------------|-----------------|------|------------------|---------------------|--------------|-----|
| Brazil-001 | 2 | 68 | 0 | pT3a | 44 | 1 | low | no |
| Brazil-002 | 2 | 63 | 1 | pT2c | 39 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-003 | 3 | 59 | 1 | pT2c | 45 | 0 | low | no |
| Brazil-004 | 2 | 64 | 0 | pT2c | 413 | 0 | low | yes |
| Brazil-005 | 2 | 61 | 1 | pT3b | 50 | 1 | intermediate | yes |
| Brazil-006 | 4 | 70 | 1 | pT3b | 50 | 1 | high | yes |
| Brazil-007 | 2 | 69 | 1 | pT2c | 34 | 0 | low | no |
| Brazil-008 | 3 | 69 | 1 | pT2c | 30 | 0 | high | yes |
| Brazil-009 | 3 | 58 | 1 | pT3b | 90 | 1 | high | no |
| Brazil-010 | 5 | 66 | 1 | pT3b | 29 | 1 | high | no |
| Brazil-011 | 5 | 55 | 1 | pT3a | 41 | 1 | high | yes |
| Brazil-012 | 2 | 73 | 1 | pT2c | 98 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-013 | 2 | 62 | 1 | pT3a | 51 | 0 | intermediate | no |

| | | | | | | | | |
|------------|---|----|---|------|-----|---|--------------|-----|
| Brazil-014 | 2 | 52 | 1 | pT3a | 32 | 1 | high | no |
| Brazil-015 | 2 | 70 | 0 | pT2c | 51 | 0 | low | no |
| Brazil-016 | 2 | 73 | 0 | pT2c | 41 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-017 | 4 | 70 | 0 | pT3b | 45 | 1 | high | yes |
| Brazil-018 | 5 | 74 | 1 | pT2c | 40 | 0 | intermediate | yes |
| Brazil-019 | 2 | 67 | 1 | pT3a | 47 | 1 | intermediate | yes |
| Brazil-020 | 3 | 68 | 1 | pT3a | 47 | 1 | high | yes |
| Brazil-021 | 2 | 73 | 1 | pT2c | 77 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-022 | 5 | 48 | 1 | pT2c | 55 | 0 | high | yes |
| Brazil-023 | 3 | 64 | 1 | pT3b | 30 | 1 | high | no |
| Brazil-024 | 2 | 61 | 1 | pT2c | 34 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-025 | 2 | 67 | 1 | pT2c | 45 | 0 | low | no |
| Brazil-026 | 2 | 77 | 1 | pT2 | 35 | 0 | low | no |
| Brazil-027 | 2 | 58 | 0 | pT2c | 35 | 0 | low | yes |
| Brazil-028 | 2 | 65 | 0 | pT2c | 43 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-029 | 2 | 70 | 0 | pT2c | 29 | 0 | low | no |
| Brazil-030 | 1 | 72 | 1 | pT2c | 72 | 0 | low | no |
| Brazil-031 | 1 | 68 | 0 | pT2c | 38 | 0 | low | no |
| Brazil-032 | 3 | 65 | 1 | pT2a | 30 | 0 | low | no |
| Brazil-033 | 3 | 60 | 0 | NA | 114 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-034 | 3 | 73 | 0 | pT2c | 42 | 0 | intermediate | yes |
| Brazil-035 | 3 | 73 | 1 | pT2c | 40 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-036 | 1 | 74 | 1 | pT2c | 60 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-037 | 2 | 49 | 1 | pT2c | 35 | 0 | intermediate | yes |
| Brazil-038 | 2 | 59 | 1 | pT2c | 46 | 0 | intermediate | yes |
| Brazil-039 | 1 | 56 | 0 | pT2a | 40 | 0 | low | no |
| Brazil-040 | 1 | 67 | 1 | pT2c | 50 | 0 | low | yes |
| Brazil-041 | 2 | 66 | 1 | pT3b | 31 | 1 | intermediate | yes |
| Brazil-044 | 2 | 60 | 0 | pT2c | 41 | 0 | low | no |
| Brazil-045 | 2 | 73 | 0 | pT2c | 63 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-046 | 3 | 63 | 1 | pT2b | 40 | 0 | low | yes |
| Brazil-047 | 3 | 64 | 0 | pT2b | 39 | 0 | low | no |
| Brazil-049 | 3 | 62 | 1 | pT2c | 27 | 0 | intermediate | yes |
| Brazil-050 | 2 | 56 | 1 | pT2b | 40 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-051 | 1 | 52 | 1 | pT2c | 36 | 0 | low | no |
| Brazil-053 | 3 | 73 | 1 | pT2 | 85 | 0 | intermediate | no |
| Brazil-054 | 1 | 67 | 1 | pT2c | 45 | 0 | low | yes |
| Brazil-055 | 1 | 58 | 0 | pT2c | 33 | 0 | low | no |

TNM - Classificação de Tumores Malignos, BCR - Recorrência Bioquímica. CAPRA-S = *Cancer of the Prostate Risk Assessment*; pontuação da Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) para a classificação de Gleason.

Fonte: O Autor

4.1.2 Critérios de Inclusão

Para ser incluso neste estudo, os pacientes teriam que ser maiores de 18 (dezoito) anos de idade, não ter recebido tratamentos com anti-andrógenos, estar no estágio clínico T \geq pT2a, um escore de Gleason \geq 6, ou um PSA $>$ 20 ng/mL.

4.1.3 Critério de Exclusão

Não foram incluídas amostras que tivessem doença autoimune ativa ou não controlada que possa requerer terapia com corticosteroides. Além disso, quaisquer pacientes imunocomprometidos ou que tivessem doenças graves ou incontroladas coexistentes não malignas. Os pacientes não deveriam ter uma malignidade adicional conhecida que tenha tido progressão ou que tenha exigido tratamento ativo. Pacientes que receberam quimioterapia sistêmica ou radioterapia (exceto por razões paliativas) também foram excluídos.

4.2 Coleta das Amostras

No estudo, utilizamos massa tumoral que foi retirada anteriormente durante a prostatectomia radical ou parcial e que se encontrava armazenada em parafina, as amostras selecionadas fizeram parte dos estudos de VIDOTTO et al., 2019 e PIKANÇO-ALBUQUERQUE et al., 2016. Estes fragmentos foram colhidos após o procedimento cirúrgico de rotina, onde foram previamente realizadas biópsias para detectar a presença de câncer da próstata, tal como descrito anteriormente. As amostras se encontravam armazenadas no arquivo do Serviço de Patologia (SERPAT) da Faculdade de Medicina FMRP-USP. Foram preparadas lâminas de hematoxilina e eosina para todos os tecidos FFPE. Os dados clínicos dos pacientes foram atualizados pelo médico residente Dr. Felipe Avante.

4.2.1 Marcação de área tumoral

As amostras foram previamente marcadas por um patologista (FPS). Em resumo, as lâminas de hematoxilina e eosina foram preparadas para todos os tecidos fixados em Parafina Formalina (FFPE). A análise histológica de todas as lâminas foi efetuada no departamento de patologia (por FPS), e todas as áreas tumorais para estudo foram cuidadosamente circunscritas (Figura 1). As áreas marcadas nas

lâminas tinham um intervalo de 70 - 95% (Tabela 2) de células tumorais, compreendendo áreas ricas em tumor, que representavam o padrão de Gleason mais elevado. Foram preparadas lâminas adjacentes para cada tumor, e as mesmas áreas de interesse foram microdissecadas para extração de RNA no *Ontario Institute for Cancer Research (OICR)*, Toronto, Canadá (COOPERBERG; HILTON; CARROLL, 2011).

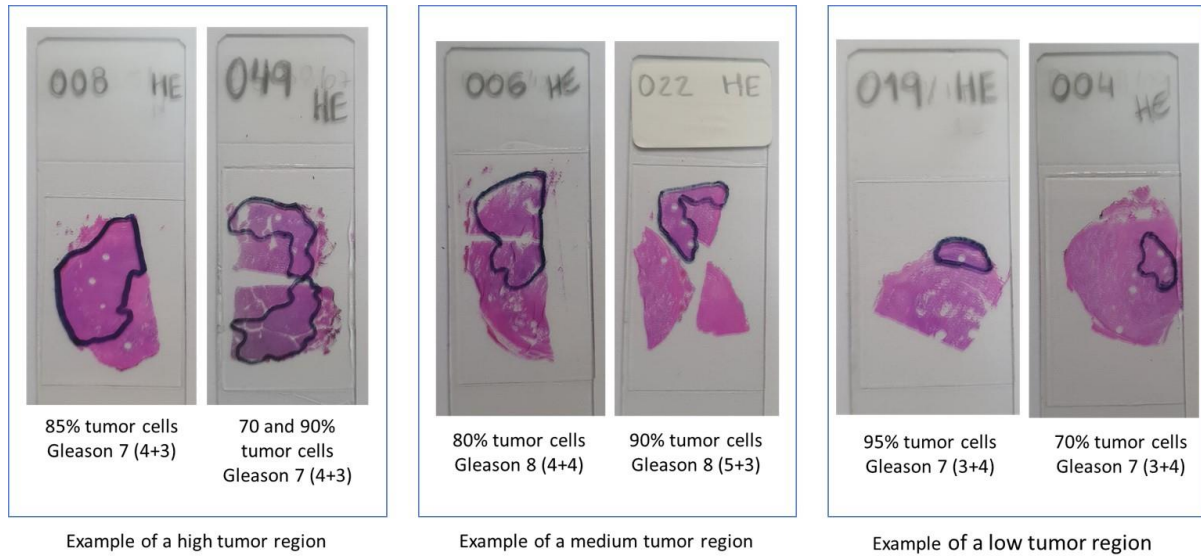
4.2.2 Nanostring

Os blocos de parafina foram cortados pela técnica Vani Maria Alves, responsável pelo Laboratório Multiusuário de Histotécnica (LMH) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto FMRP- USP. As lâminas foram montadas com os cortes de 10µm, embaladas e enviadas para o *Ontario Institute for Cancer Research (OICR)* em Toronto, onde ficaram sob a responsabilidade de nossa Colaboradora Dra Jane Bayani.

4.2.2.1 Isolamento de RNA

O RNA foi isolado de tecidos com áreas ricas em tumores. As seções das amostras foram enviadas ao *Ontario Institute for Cancer Research (OICR)*, Toronto Canadá, para extração do RNA, como descrito anteriormente (BAYANI et al., 2017). e as mesmas áreas de interesse foram microdissecadas para extração de RNA. O RNA total foi extraído do tecido microdissecado usando um kit de isolamento de RNA FFPE puro (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Figura 1. Exemplos de seleção e marcação de tumores para a coorte HC-FMRP de CaP.



As amostras de adenocarcinoma da próstata com áreas tumorais identificadas (marcações a caneta preta) foram efetuadas pelo patologista do estudo (FPS).

Fonte: O Autor

Tabela 2. Porcentagem de células tumorais por amostra na coorte HC-FMRP. Continua.

| Sample ID | % tumor | comments |
|-----------|---------|---|
| 1 | 90 | One medium area with stromal intermingled |
| 2 | 85 | One big area with with stromal intermingled |
| 3 | 95 | One big area with immune infiltration |
| 4 | 70 | One small area with stromal intermingled |
| 5 | 80 | Two different areas, and with stromal intermingled |
| 6 | 80 | One big area with with stromal intermingled |
| 7 | 95 | Four areas with low stromal intermingled |
| 8 | 85 | Stroma on the periphery of the selected area |
| 9 | 95 | One big area with low stromal intermingled |
| 10 | 98 | One medium area with low stromal intermingled |
| 11 | 98 | One small area with low stromal intermingled |
| 12 | 95 | Three areas with low stromal intermingled |
| 13 | 85 | One medium area with stromal intermingled |
| 14 | 90 | One medium area with stromal intermingled |
| 15 | 98 | One small area with low stromal intermingled |
| 16 | 98 | One small area with low stromal intermingled |
| 17 | 95 | One small area with low stromal intermingled |
| 18 | 85 | Stroma on the periphery of the selected area |
| 19 | 95 | One small area |
| 20 | 95 | Two big areas with low stromal intermingled |
| 21 | 90 | One big area with stromal intermingled and immune infiltration |
| 22 | 90 | One medium area with stromal intermingled and immune infiltration |
| 23 | 90 | One big area with stromal intermingled and immune infiltration |

| | | |
|----|----|---|
| 24 | 95 | One medium area with low stromal intermingled |
| 25 | 95 | One medium area with low stromal intermingled |
| 26 | 85 | One medium area with stromal intermingled |
| 27 | 90 | Two different areas, and with stromal intermingled |
| 28 | 70 | One small area and with stromal intermingled |
| 29 | 90 | One small area with stromal intermingled and immune infiltration |
| 30 | 90 | One small area with stromal intermingled |
| 31 | 90 | Two areas with stromal intermingled |
| 32 | 95 | One small area with low stromal intermingled |
| 33 | 98 | One small area with low stromal intermingled |
| 34 | 90 | One medium area with stromal intermingled |
| 35 | 95 | Two small areas with low stromal intermingled |
| 36 | 95 | Two small areas with low stromal intermingled |
| 37 | 85 | One small area with stromal intermingled |
| 38 | 95 | One small area with low stromal intermingled |
| 39 | 95 | One small area with low stromal intermingled |
| 40 | 95 | Two small areas with low stromal intermingled |
| 41 | 90 | One big area with stromal intermingled |
| 44 | 95 | One medium area with low stromal intermingled and immune infiltration |
| 45 | 95 | Three small areas with low stromal intermingled |
| 46 | 95 | One medium area with low stromal intermingled and immune infiltration |
| 47 | 95 | Three medium areas with low stromal intermingled |
| 49 | 80 | Two different areas, and with stromal intermingled |
| 50 | 95 | One medium area with low stromal intermingled |
| 51 | 90 | Two small areas with stromal intermingled |
| 53 | 98 | One medium area with low stromal intermingled and immune infiltration |
| 54 | 95 | One medium area with low stromal intermingled |
| 55 | 95 | One medium area with low stromal intermingled |

Para amostras de tumores com duas áreas distintas dissecadas, a porcentagem apresentada é a média de ambas as regiões.

Fonte: O Autor

4.2.2.2 Análise de Transcrição

Para este estudo, utilizamos o painel de expressão NanoString PanCancer Pathways (número de catálogo XT-CSO-PATH1-1) NanoString Technologies Inc., Seattle, WA, EUA) (BOUTELLE; ATTARDI, 2021). Trata-se de um painel de 770 genes concebido para medir a expressão genética com 730 genes relacionados com o câncer e 40 controles de referência internos. O painel representa todas as principais vias do câncer, incluindo: Wnt, Hedgehog, apoptose, ciclo celular, RAS, PI3K, STAT, MAPK, Notch, TGF- β , modificação da cromatina, regulação transcricional e controle

de danos no DNA (Disponível em: link <https://nanosting.com/products/ncounter-assays-panels/oncology/ncounter-pancancer-pathways-panel/>).

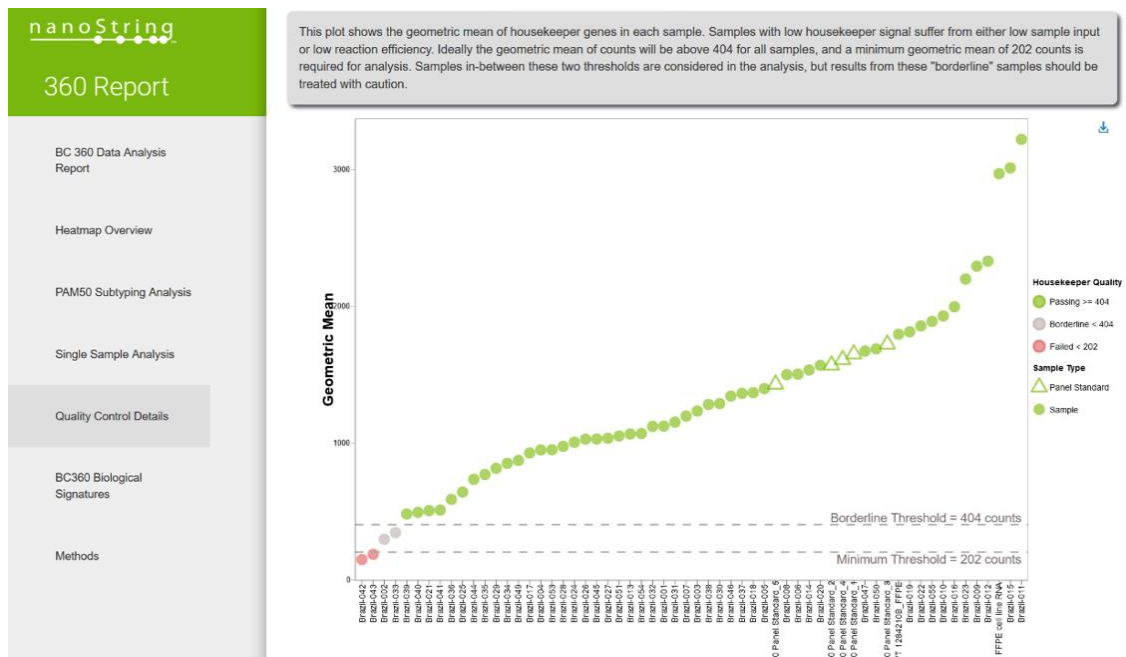
Os dados de expressão brutos foram carregados no software nSolver v4.0 para efetuar o controle de qualidade (análise QC) e para construir a matriz de transcritos para downstream. Em seguida, utilizamos o estado de classificação dicotomizado do *TP53* como fator de comparação para a análise do transcriptoma e a identificação de DEGs associados a níveis de expressão elevados e baixos do *TP53*. Nesta classificação, "*TP53* low" incluiu toda a expressão abaixo do quartil superior (Q3) e "*TP53* high" foi atribuído aos 25% de expressão observados no Q4.

Para a expressão diferencial, utilizamos o DESeq2 v1.34.0 com BCR e fator de risco como fatores de corte. Efetuamos uma análise de enriquecimento de over-representação (ORA) e uma análise de enriquecimento do conjunto de genes (GSEA) com base nos DEGs utilizando o clusterprofiler v4.0 com as vias da Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas (KEGG).

Comparamos os resultados transcriptômicos da nossa coorte com os dados de RNA-seq da coorte de adenocarcinoma da próstata do The Cancer Genome Atlas (adenocarcinoma de próstata, PRAD-TCGA, n = 420, <https://gdc.cancer.gov/about-data/publications/panimmune>) e utilizamos níveis de expressão dicotomizados de *TP53* classificados de forma semelhante por quartis de expressão.

O controle de qualidade proprietário do nSolver revelou duas amostras (42 e 43) com contagens de genes housekeeping ligeiramente inferiores à qualidade mínima necessária para uma análise viável, pelo que ambas as amostras foram retiradas dos estudos subsequentes. Duas amostras (02 e 33) foram classificadas como limítrofes com base em métricas de qualidade, pelo que estes tumores foram incluídos em análises posteriores (Figura 2).

Figura 2. Dados do controle de qualidade de RNA utilizando o software nSolver da coorte HC-FMRP.



Duas amostras (42, 43) não passaram nas métricas de controle de qualidade (pontos vermelhos) e foram excluídas dos estudos transcriptômicos. Duas amostras apresentadas com pontos cinzas eram de qualidade limítrofe e foram incluídas em estudos subsequentes.

Fonte: O Autor

4.3.1 Análise de Citometria Digital

O CIBERSORTx é uma ferramenta analítica para estimar da abundância de tipos de células membros em uma população de células mistas, usando dados de expressão gênica (CHEN et al., 2018). A análise exploratória utilizando os resultados do CIBERSORTx no coorte TCGA-PRAD de THORSSON, 2018 foi utilizada para prever a infiltração de células imunitárias no microambiente tumoral dos tumores. Avaliamos a infiltração relativa de células imunitárias com base nas classificações *TP53* (como descrito anteriormente). Os dados foram analisados utilizando o RStudio R v4.1.2.

4.3.2 Análise Estatística

O processamento de dados e a análise a jusante dos dados do transcriptoma foram efetuados no software RStudio (R Foundation for Statistical Computing, R v4.1.2 "Bird Hippie"). Os testes t múltiplos não pareados foram avaliados para calcular a significância estatística utilizando o software GraphPad Prism 9.3.0 para os dados Cibersort. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando o \log_2 foldchange $> 0,5$ e um limiar mais rigoroso de $> 0,58$ foi utilizado para o TCGA-PRAD, com p ajustado (FDR) $< 0,05$. Para a análise de enriquecimento, usamos um valor de corte de 0,05 para considerar a ORA do MSigDB Hallmarks.

5. RESULTADOS

5.1 Características do grupo de Pacientes

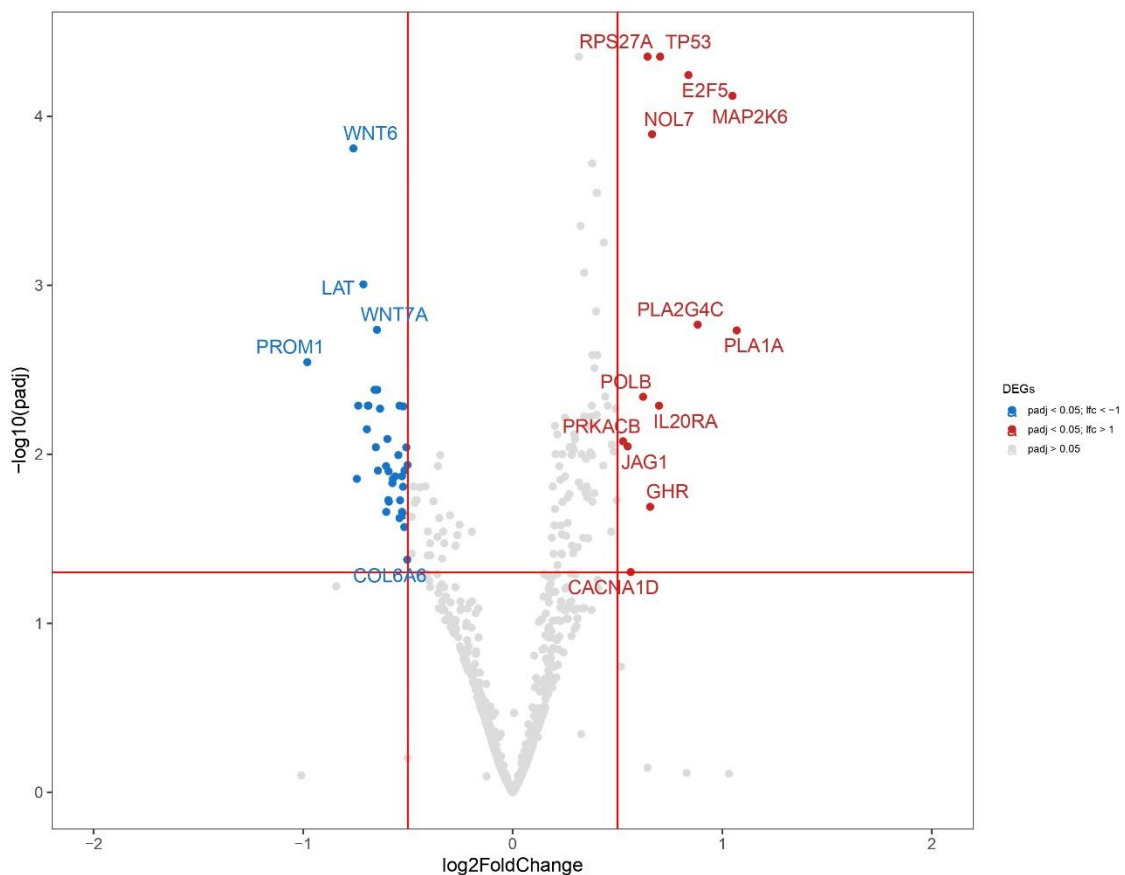
Um total de 53 casos do HC-FMRP recolhidos entre 2007 e 2015 foram incluídos nesta coorte de câncer da próstata (Tabela 1). A mediana da idade dos pacientes no ato da cirurgia foi de 66 anos (intervalo: 48-77 anos) e 64% das amostras (34 amostras) apresentavam invasão perineural. A mediana do grau ISUP para as amostras é 2. A mediana da classificação TMN dos tumores é pT2c, com um intervalo de pT2a - pT3b. As glândulas prostáticas apresentaram um peso mediana de 41g com um intervalo de 27g - 413g. Das 53 amostras, 37% (20/53) tinham CAPRA-S baixo, 40% eram intermediário (21/53), e 19% tinham CAPRA-S alto (09/53). 36% (19/53) das amostras tinham recidiva bioquímica e 60% (31/53) não tinham recidiva. O tempo médio de acompanhamento dos 53 pacientes foi de 89 meses (intervalo: 4-163). Em resumo, os dados clínicos são consistentes com o fato de a coorte FMRP ser derivada de pacientes com câncer de próstata de risco intermédio.

5.2 Nanostring

5.2.1 DEGs e vias de progressão associadas à expressão de *TP53* no PCa de risco intermédio HC-FMRP

Os dados transcriptômicos NanoString de 770 genes-alvo no PanCancer Pathways Panel foram divididos em níveis de expressão elevada e baixa do gene *TP53* e este fator dicotomizado foi utilizado para investigações de DEGs. Dos 47 genes DEGs de 730 sinais-alvo, verificou-se que 34 genes estavam *downregulated* e 13 genes estavam *upregulated* (Log2 foldchange > 0,5 e valor ajustado a $p < 0,05$) nas amostras. A Figura 3 mostra um gráfico de vulcão utilizado para identificar DEGs associados à expressão de *TP53* ao nível do RNA. Como esperado, o gene *TP53* é detectado como um DEG *up* regulado, de acordo com o desenho experimental desta análise comparativa. Outros DEGs *up* regulados associados à elevada expressão de *TP53* incluem *E2F5*, *IL20RA* e *NOL7*. Ao contrário, *PROM1*, *WNT6* e *GATA3* apresentaram uma *down* regulação nos pacientes com alta expressão de *TP53*. A Tabela 3 apresenta uma lista com os dez DEGs com maior e menor expressão associados aos níveis de expressão de RNA do *TP53*.

Figura 3. Gráfico de vulcão que mostra o padrão de expressão do painel de 730 genes da via PanCancer associado aos níveis de expressão de *TP53* na coorte de 53 tumores HC-FMRP.



O eixo Y é $-\log_{10}(\text{p-value})$ e o eixo X é $\log_2(\text{FoldChange})$ para a comparação *TP53* high vs *TP53* low. As linhas vermelhas horizontais e verticais indicam os limiares de FDR e os limiares de valor p. Os

genes significativos situam-se na parte superior do gráfico, acima das linhas horizontais, e os DEGs relacionados com níveis de expressão elevados de *TP53* situam-se em ambos os lados da região central do gráfico. Os genes são coloridos de forma adequada, com o azul a indicar DEGs *down* regulados e o vermelho a indicar DEGs *up* regulados em relação à expressão elevada de *TP53*. Adjusted p-value < 0.05; Log2 fold change >0.5.

Fonte: O Autor

Tabela 3. Dez principais genes *down* e *up* regulados com base no Log2FoldChange e nos valores de p ajustados.

| Gene | Log2FoldChange | p _{adj} |
|---------|----------------|------------------|
| PROM1 | -9.80 | 2.85E-03 |
| WNT6 | -7.60 | 1.55E-04 |
| GATA3 | -7.44 | 1.40E-02 |
| HSPA1A | -7.37 | 5.15E-03 |
| LAT | -7.12 | 9.86E-04 |
| FGF4 | -6.96 | 7.11E-03 |
| LEFTY1 | -6.91 | 5.15E-03 |
| HMGA2 | -6.88 | 5.15E-03 |
| GRIN2A | -6.59 | 4.15E-03 |
| FGF21 | -6.53 | 9.08E-03 |
| PRKACB | 5.27 | 8.37E-03 |
| JAG1 | 5.49 | 8.98E-03 |
| CACNA1D | 5.63 | 4.97E-02 |
| POLB | 6.22 | 4.57E-03 |
| RPS27A | 6.44 | 4.43E-05 |
| GHR | 6.56 | 2.04E-02 |
| NOL7 | 6.65 | 1.28E-04 |
| IL20RA | 6.98 | 5.15E-03 |
| TP53 | 7.04 | 4.43E-05 |
| E2F5 | 8.39 | 5.70E-05 |

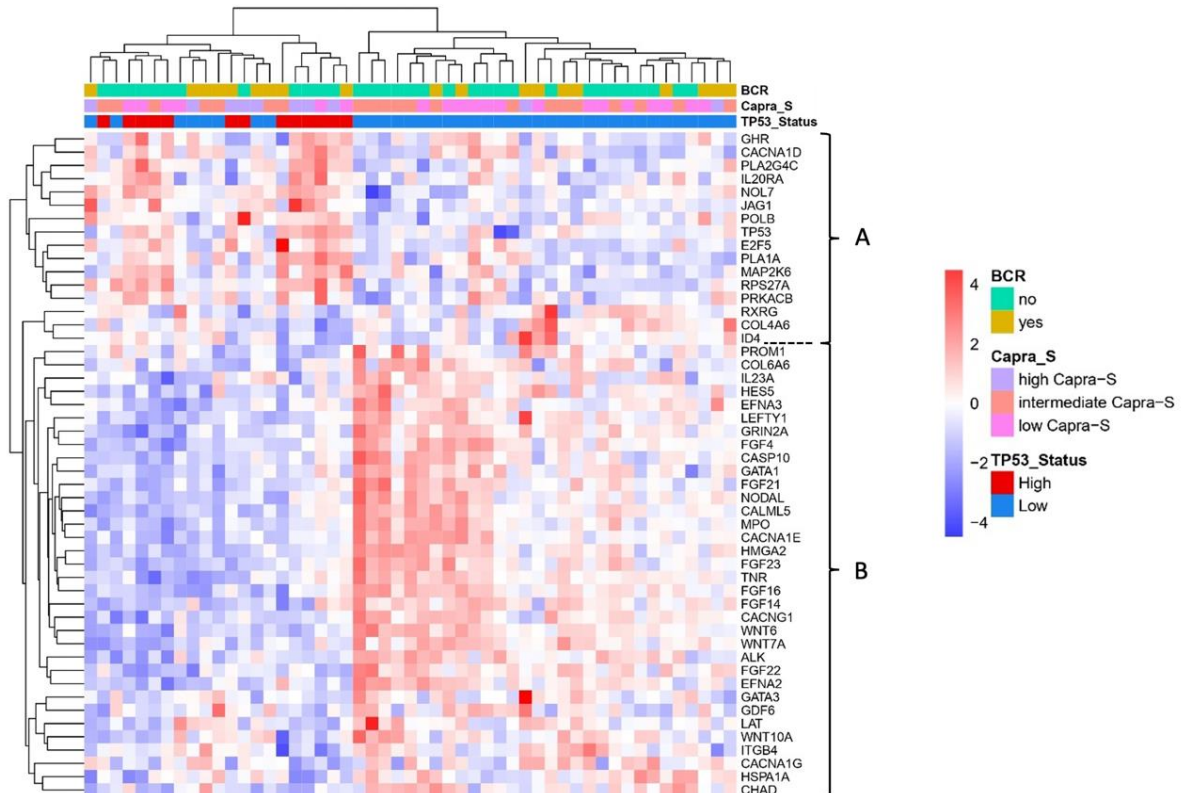
Os dez genes superiores listados são os DEGs *down* regulados mais bem classificados (Log2 FoldChange negativo) associados aos níveis de expressão do RNA do *TP53*. Do mesmo modo, os dez DEGs *up* regulados com classificação mais elevada (Log2 FoldChange positivo) são apresentados abaixo. Adjusted p-value <0.05; Log2 fold change >0.5.

Fonte: O Autor

O agrupamento hierárquico não supervisionado dos 50 principais DEGs *up* regulados e *down* regulados do painel PanCancer foi utilizado para comparar os DEGs associados ao estado alto e baixo do *TP53* com o CAPRA-S e o BCR, como se mostra no heatmap (Figura 4). Pode observar-se que o agrupamento por estado de expressão do *TP53* não foi especificamente associado às pontuações de risco CAPRA-S ou BCR. No entanto, dois grandes *clusters* de expressão genética (*cluster group A* e *B*) foram fortemente associados a uma expressão elevada e baixa de *TP53*. No *cluster*

B, os DEGs *down* regulados incluem três dos genes da via WNT (*WNT10A*, *WNT7A* e *WNT6*) e cinco DEGs da via FGF (*FGF4*, *FGE21*, *FGF23*, *FGF14* e *FGF22*). No *cluster A*, DEGs como *POLB*, *PLA1*, *E2F5*, *IL20RA* e *NOL7* foram *up* regulados com elevada expressão de *TP53*.

Figura 4. Heatmap não supervisionado que representa os 50 DEGs principais do painel PanCancer da Nanostring, comparando os níveis de expressão *TP53* elevados com os níveis de expressão *TP53* baixos.



Os DEGs foram classificados de acordo com a pontuação de risco CAPRA-S, (púrpura = elevado, laranja = intermédio e rosa = baixo); recorrência bioquímica (BCR), verde = sem recorrência, mostarda = com ocorrência e *TP53*, vermelho elevado e azul baixo. Dois *clusters* distintos de expressão genética identificam DEGs que estão *up* regulados (*cluster group A*) ou *down* regulados (*cluster group B*) em relação ao estado de expressão de *TP53*.

Fonte: O Autor.

Para investigar as vias envolvidas nos DEGs relacionados com o *TP53*, efetuamos uma análise de enriquecimento de *up* regulação dos DEGS nos dados de expressão elevada vs. baixa do *TP53* da coorte HC-FMRP (Tabela 4). Esta análise sugere que as vias Wnt-beta Catenina, KRAS, PI3K/AKT/mTOR e Reparação do DNA estão envolvidas na progressão relacionada com o *TP53* no PCa.

Tabela 4. Enriquecimento de *up* regulação dos DEGS no *TP53* alto vs. baixo da coorte HC-FMRP.

| Term | Adjusted P-value | Genes |
|---------------------------------|------------------|----------------------------------|
| Wnt-beta Catenin Signaling | 0,003 | <i>WNT6;JAG1;TP53</i> |
| KRAS Signaling Dn | 0,017 | <i>FGF16;CALML5;CACNG1;FGF22</i> |
| Complement | 0,104 | <i>CASP10;GATA3;HSPA1A</i> |
| PI3K/AKT/mTOR Signaling | 0,163 | <i>FGF22;MAP2K6</i> |
| DNA Repair | 0,205 | <i>POLB;TP53</i> |
| Notch Signaling | 0,205 | <i>JAG1</i> |
| Angiogenesis | 0,205 | <i>JAG1</i> |
| TNF-alpha Signaling via NF-kB | 0,205 | <i>JAG1;IL23A</i> |
| p53 Pathway | 0,205 | <i>ITGB4;TP53</i> |
| Myogenesis | 0,205 | <i>ITGB4;CACNG1</i> |
| Apical Surface | 0,218 | <i>GATA3</i> |
| Reactive Oxygen Species Pathway | 0,221 | <i>MPO</i> |
| Cholesterol Homeostasis | 0,299 | <i>JAG1</i> |
| Pperoxisome | 0,375 | <i>RXRG</i> |
| Bile Acid Metabolism | 0,375 | <i>RXRG</i> |
| UV Response Up | 0,395 | <i>E2F5</i> |
| IL-2/STAT5 Signaling | 0,395 | <i>GATA1</i> |
| Hypoxia | 0,395 | <i>EFNA3</i> |
| Glycolysis | 0,395 | <i>EFNA3</i> |
| heme Metabolism | 0,395 | <i>GATA1</i> |
| KRAS Signaling Up | 0,395 | <i>WNT7A</i> |
| Apical Junction | 0,395 | <i>ITGB4</i> |
| E2F Targets | 0,395 | <i>TP53</i> |

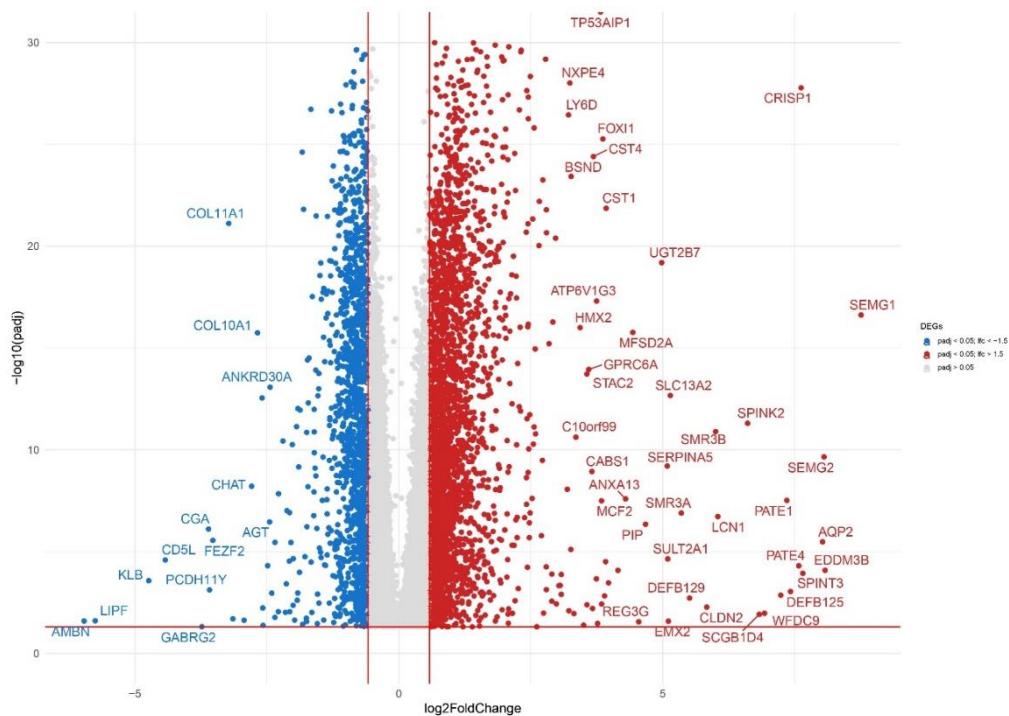
Fonte: O Autor

5.3 Genes e vias diferencialmente expressos relacionados com a expressão de *TP53* no TCGA PRAD

Para determinar se os resultados transcriptômicos da coorte FMRP poderiam ser reproduzidos utilizando outra fonte de amostras de PCa, analisámos a coorte de adenocarcinoma da próstata TCGA, que contém dados de RNA-seq de 420 amostras de tumores (Figuras 5, Tabela 5). Foi utilizado um agrupamento hierárquico não supervisionado dos 50 principais DEGs *up* regulados e *down* regulados do painel PanCancer para determinar quais os DEGs que estavam associados a *TP53* alto e

baixo na coorte TCGA, como se mostra no heatmap (Figura 6). Pode observar-se que o agrupamento por estado de expressão do *TP53* incluía uma região central de DEGs *down* regulados associados ao *TP53* baixo. Os tumores com estado *TP53* elevado incluía dois *clusters* distintos: um com forte expressão de DEG no lado direito do heatmap; o grupo do lado esquerdo apresentava uma expressão de DEG nitidamente mais fraca.

Figura 5. Gráfico de vulcão representando genes diferencialmente expressos na coorte TCGA *TP53* high vs *TP53* low utilizando 420 amostras de adenocarcinoma da próstata.



Azul = genes regulados para baixo, vermelho = genes regulados para cima. Log2 foldchange > 0,5 Padj < 0,05.

Fonte: O Autor

Tabela 5. Genes diferencialmente expressos no grupo *TP53* high *TP53* low coorte TCGA.

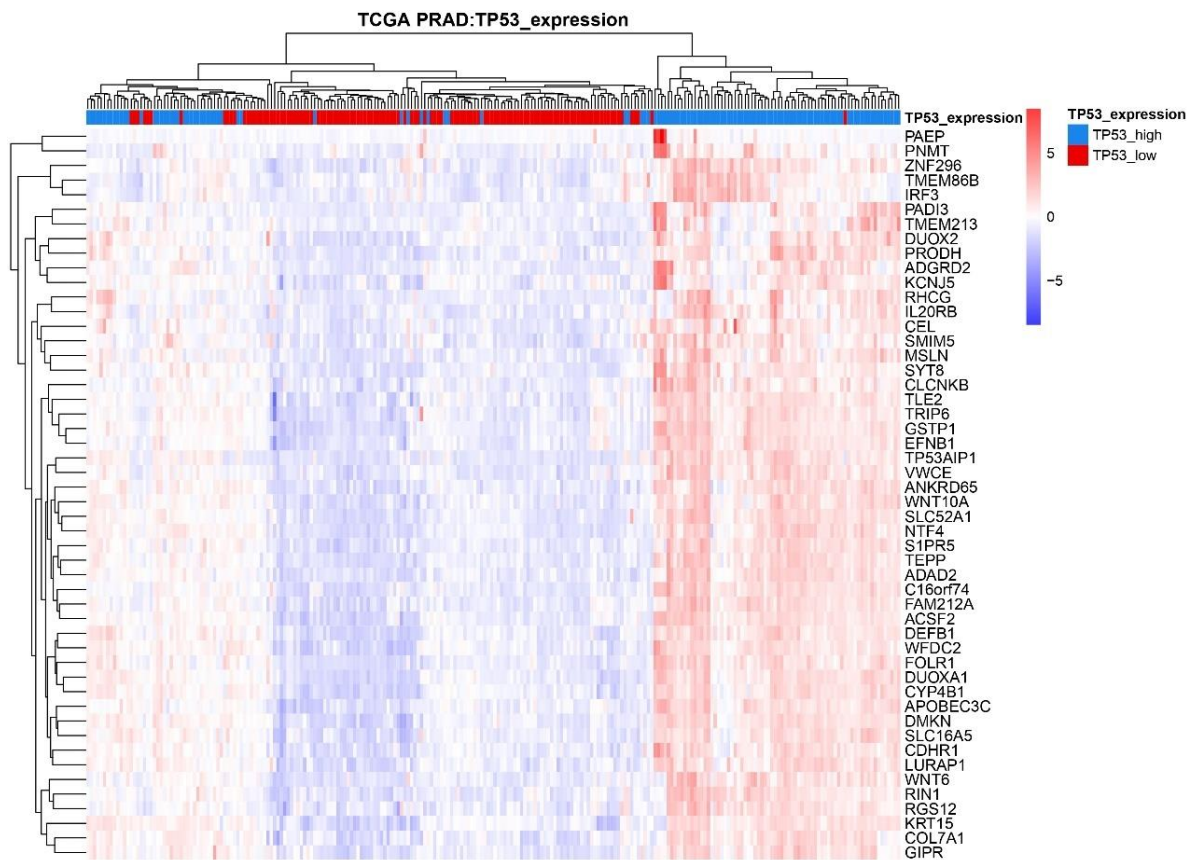
| Gene | log2FoldChange | padj |
|----------|----------------|----------|
| ANKRD30A | -2.44 | 8.45E-14 |
| CHAT | -2.79 | 6.17E-09 |
| COL10A1 | -2.68 | 1.80E-16 |
| COL11A1 | -3.22 | 7.62E-22 |
| COL27A1 | 1.03 | 7.62E-14 |
| DKK1 | 1.18 | 1.16E-03 |

| | | |
|----------|-------|----------|
| FEZF2 | -3.52 | 2.82E-06 |
| FHAD1 | 1.18 | 1.55E-17 |
| GABRG2 | -3.73 | 4.90E-02 |
| IBSP | -2.49 | 4.96E-05 |
| KRT81 | 1.26 | 2.15E-08 |
| LPA | 1.14 | 5.32E-12 |
| LY6L | -2.45 | 3.50E-07 |
| MROH6 | 1.02 | 1.07E-14 |
| NMUR1 | 1.06 | 1.76E-15 |
| SERPINA1 | 1.03 | 1.54E-09 |
| SLCO1B7 | -2.93 | 2.37E-02 |
| SYCE2 | 1.17 | 3.27E-16 |
| TMEM256 | 1.09 | 1.41E-14 |
| ZPLD1 | -2.57 | 4.20E-02 |

Top 20 genes diferencialmente expressos, top 10 Down regulated, top 10 UP regulated. Quantificação figura 5.

Fonte: O Autor.

Figura 6. Heatmap não supervisionado representando os genes diferencialmente expressos na coorte TCGA do grupo *TP53* alto vs. *TP53* baixo.



heatmap não supervisionado representando os genes diferencialmente expressos na coorte TCGA do grupo *TP53* alto vs *TP53* baixo. vermelho *TP53* baixo e azul *TP53* alto.

Fonte: O Autor

Para investigar as vias envolvidas nos DEGs relacionados com o *TP53*, efetuamos uma análise de enriquecimento de *up* regulação dos 50 DEGS principais nos dados de expressão elevada vs. baixa do *TP53* da coorte TCGA (Tabela 6). Esta análise sugere que as vias de reparação do DNA, de processamento do mRNA e de modificação das histonas estão associadas a uma expressão alterada do *TP53*.

Tabela 6. Vias diferencialmente expressas na coorte TCGA *TP53* high vs. *TP53* low.

| Description | p.adjust |
|---|----------|
| DNA repair | 3.30E-10 |
| mRNA processing | 4.06E-08 |
| histone modification | 1.36E-06 |
| regulation of translation | 1.89E-06 |
| cell cycle phase transition | 1.42E-04 |
| cytokinesis | 3.06E-04 |
| RNA localization | 1.76E-03 |
| chromosome segregation | 2.28E-03 |
| vesicle localization | 2.76E-03 |
| cell cycle checkpoint signaling | 3.17E-03 |
| regulation of cell cycle phase transition | 4.75E-03 |
| DNA duplex unwinding | 5.57E-03 |
| nuclear chromosome segregation | 5.62E-03 |
| response to endoplasmic reticulum stress | 8.66E-03 |
| regulation of protein catabolic process | 1.67E-02 |
| protein export from nucleus | 2.14E-02 |
| translational initiation | 2.56E-02 |
| DNA replication | 2.74E-02 |
| RNA transport | 3.08E-02 |
| nucleus organization | 3.77E-02 |

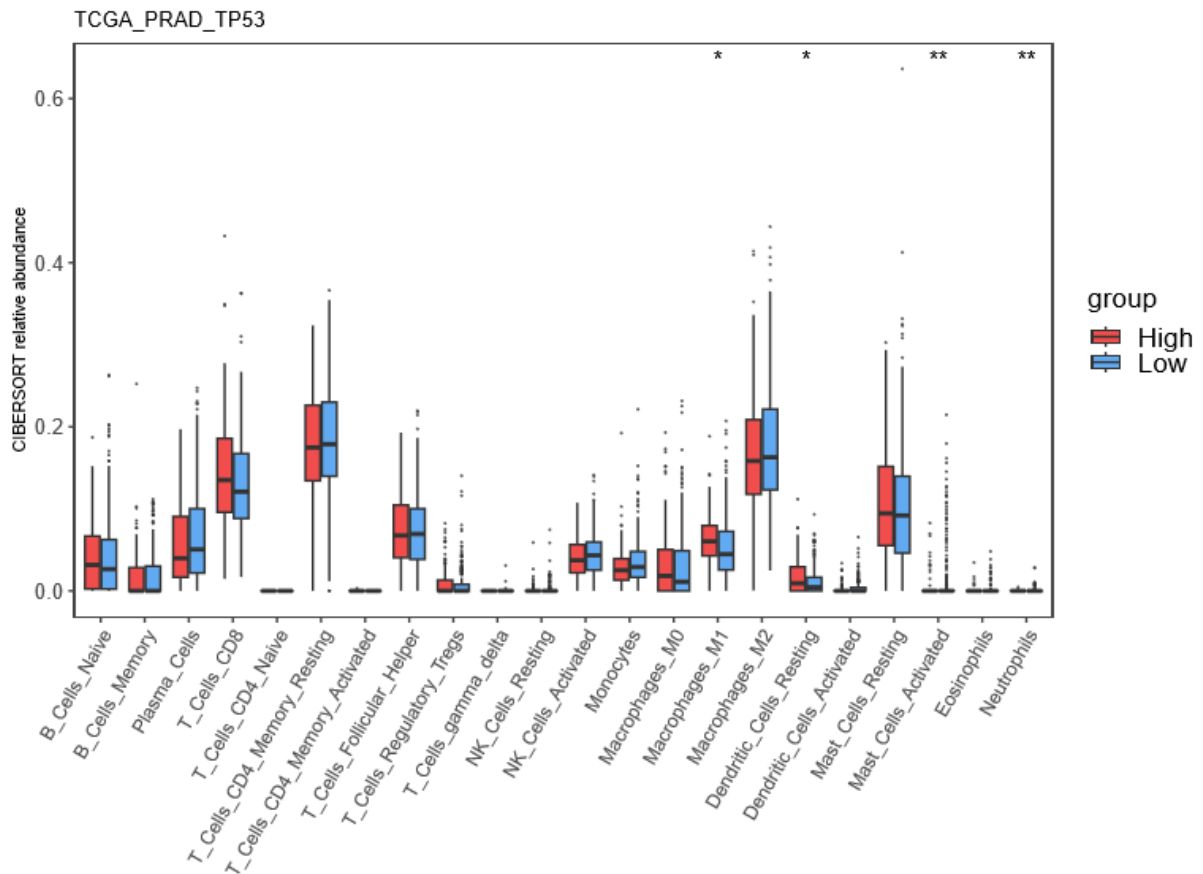
Vias diferencialmente expressas na coorte TCGA *TP53* high vs. *TP53* low. 420 amostras de adenocarcinoma analisadas da coorte TCGA.

Fonte: O Autor

Para a última análise dos dados transcriptômicos do TCGA, realizámos citometria digital utilizando a ferramenta CIBERSORTx, que nos dá a quantidade de células imunitárias presentes em cada amostra. Verificou-se um maior número de macrófagos M1 nas amostras com *TP53* alto, o mesmo aumento também ocorreu com as células

dendríticas em repouso. Os mastócitos ativados estavam presentes em maior número nas amostras com *TP53* baixo (Figura 7).

Figura 7. Citometria de fluxo utilizando o software CIBERSORTX para comparar a coorte TCGA *TP53* alta vs. *TP53* baixa.



Em vermelho temos *TP53* high, em azul *TP53* intermediário e em verde temos *TP53* Low. *P=0,001
 **P=0,005.

Fonte: O Autor.

6. DISCUSSÃO

6.1 Comparação dos grupos *TP53* high vs *TP53* low

A mutação e perda de função do *TP53* ocorre em mais de metade de todos os casos de câncer humano (WANG; SUN, 2017). No PCa, o papel do *TP53* mutante permanece incompletamente compreendido. As mutações somáticas no *TP53* foram inicialmente consideradas eventos tardios que ocorreram durante a progressão

maligna e levaram à disseminação metastática e à resistência à castração. No entanto, estudos recentes relatam uma frequência inesperadamente elevada de mutações do *TP53* no PCa primário, bem como no PCa avançado e na doença metastática (BAYANI et al., 2017). Por conseguinte, as perturbações do *TP53* e as alterações no nível de expressão genética no PCa de risco intermédio têm um forte potencial como biomarcador para identificar genes e vias envolvidos na progressão do tumor e na resposta ao tratamento.

Ao comparar os grupos de expressão elevada e baixa de *TP53*, obtivemos resultados como genes *down* regulados relacionados com a proliferação e apoptose, oncogênese, desenvolvimento de células T, sobrevivência celular, reparação de tecidos, crescimento tumoral, invasão e regulação de genes. A nossa análise dos DEGs afetados pelos níveis de RNA de *TP53* destaca vários genes com papéis distintos em vias relacionadas com a progressão tumoral e resposta imune.

O gene *PROM1* produz uma proteína (CD133) que funciona como um receptor de membrana para células estaminais da próstata e células estaminais tumorais (TEROERDE et al., 2021). Este gene está envolvido na diferenciação celular e apoptose. A literatura mostra que a presença destas células estaminais cancerígenas é essencial para o desenvolvimento de resistência a terapias (TEROERDE et al., 2021). Nos nossos resultados, verificamos que este gene se encontrava *down* regulado em tumores com níveis elevados de *TP53*. Uma análise anterior da expressão do gene *PROM1* no PCa, utilizando dados do TCGA, mostrou que níveis reduzidos deste gene estavam associados a uma sobrevivência global fraca (SAHA et al., 2020). Este gene ainda é pouco estudado no câncer da próstata, mas no câncer da mama também conduz à progressão da doença (GLUMAC et al., 2020), o que sugere que pode ser um biomarcador de resposta útil.

Outro gene *down* regulado é o *WNT6*, envolvido na oncogênese. A família de genes WNT é constituída por genes estruturalmente relacionados que codificam proteínas de sinalização segregadas que desempenham um papel na modulação do microambiente tumoral (GOLDSBERRY et al., 2019). Significativamente, no *cluster group B* (Figura 4) dos nossos resultados de Nanostring, mostramos que três genes da via WNT (*WNT10A*, *WNT7A* e *WNT6*) estavam *down* regulados em tumores com níveis elevados de *TP53*. Recentemente, a literatura demonstrou que o *TP53* é capaz de limitar a ação do *WNT6* no câncer da mama, além disso, na ausência de *TP53*, a

família WNT é capaz de guiar a invasão das células epiteliais no carcinoma colorretal (BRUGNOLI et al., 2019). No câncer da próstata, a sinalização da família WNT é frequentemente ativada em fases avançadas do PCa e contribui para o desenvolvimento de resistência à terapêutica (Yeh et al., 2019).

O *cluster group B* também contém cinco genes da via do Fator de Crescimento de fibroblastos (FGF) (*FGF4*, *FGF21*, *FGF23*, *FGF14* e *FGF22*) que foram *down* regulados em tumores com níveis de expressão elevados de *TP53*. Estes genes e os seus produtos estão envolvidos no crescimento e sobrevivência das células, na reparação de tecidos, no crescimento e invasão de tumores. Os FGFs e os receptores de FGF também desempenham um papel importante na manutenção da homeostase dos tecidos e no desenvolvimento e diferenciação do tecido prostático através de interações epiteliais-estromais (TEISHIMA et al., 2019). Parece provável que a expressão alterada dos genes FGF também possa influenciar o microambiente tumoral.

O *GATA3* é outro gene que está *down* regulado em tumores com níveis elevados de *TP53*. O gene faz parte da família GATA e é um fator de transcrição, cuja principal função é a regulação do desenvolvimento das células T. Tanto o *GATA1* como o *GATA3* são genes *down* regulados em tumores com *TP53* elevado no grupo B. O *GATA3* está envolvido na regulação dos genes do antígeno específico da próstata (PSA) (BOUTELLE; ATTARDI, 2021). A perda da expressão funcional do *GATA3* está associada à progressão do tumor no PCa de camundongos e no PCa humano (NGUYEN et al., 2013). Em outros tumores, como o câncer do pâncreas (IZZO; NAPONELLI; BETTUZZI, 2020) e o câncer urotelial (HODGES et al., 2022), a diminuição deste gene também está associada à progressão da doença.

No grupo A, genes como o *E2F5*, *IL20RA* e *NOL7* foram *up* regulados em tumores com elevada expressão de *TP53*. Anteriormente, foi demonstrado que a expressão aumentada de *E2F5* tem como alvo e modula as vias de invasão e migração em células de PCa (KARMAKAR et al., 2020). Existem poucos estudos sobre o papel do *IL20RA* no PCa. No entanto, foi demonstrado que a sinalização *IL20RA* aumenta promove a formação de um microambiente imunossupressor no câncer da mama (GAO et al., 2021), o que sugere que pode desempenhar um papel semelhante no PCa. Embora não existam atualmente relatos de que o *NOL7* esteja diretamente envolvido na progressão do PCa, um estudo recente do gene no

Pancancer salienta o seu papel emergente como biomarcador de prognóstico em muitos tipos diferentes de câncer (LIU; XIE; LI, 2022).

De acordo com os nossos resultados da Nanostring na coorte HC-FMRP, a nossa análise dos dados TCGA mostra que os genes da família WNT (*WNT6* e *WNT10A*) também estão *down* regulados em tumores de PCa com níveis de expressão elevados de *TP53*. Três genes do colágeno (*COL1A1*, *COL10A1* e *COL27A1*) estão diferencialmente expressos em relação a níveis alterados de RNA do *TP53*. As proteínas do colágeno contribuem para a matriz extracelular, que são os principais componentes estruturais da TME, e as alterações na expressão dos genes do colágeno têm sido associadas à progressão do PCa (TREACY et al., 2023). Nos dados do TCGA, encontramos uma *down* regulação de *LY6L*, um gene envolvido na diferenciação de células B e T em tumores. O gene *ANKRD30A* demonstrou estar *down* regulado nos tumores da coorte TCGA com níveis elevados de expressão de *TP53*. Este gene está envolvido na transcrição do DNA e, quando se encontra desregulado, está associado à progressão do câncer. Outro gene *down* regulado é o *FEZF2*, que também está associado à regulação da transcrição.

Também observámos vias alteradas na coorte TCGA associadas aos níveis de expressão do *TP53*. À semelhança dos nossos resultados com a coorte HC-FMRP, as vias de reparação do ciclo celular, citocinas e regulação são também identificadas por DEGs associados ao *TP53* na coorte TCGA.

Limitações do estudo

Este estudo foi realizado em um período de muitas incertezas, o trabalho iniciou-se no período pandêmico, com os laboratórios fechados, porém com muito esforço, conseguimos finalizá-lo. O trabalho em andamento relacionado às análises mutacionais de *TP53* (ver Apêndices) e imuno-histoquímica fornecerá um estudo mais abrangente do papel de *TP53* no PCa. A principal limitação deste trabalho foi a falta de material biológico suficiente para realização de todos os procedimentos programados, isso se deve por se tratar de um estudo retrospectivo, impossibilitando assim a coleta de novas amostras.

7. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que a alteração dos níveis de expressão do gene supressor de tumor *TP53* influencia genes e vias associados à progressão tumoral e ao microambiente tumoral do PCa. Nesta análise, destacamos a influência dos níveis de expressão do gene *TP53* em genes envolvidos com o desenvolvimento, diferenciação e proliferação do PCa e DEGs e vias que alteram as células do sistema imunitário do TME que têm a função de proteger o organismo hospedeiro, formando barreiras protetoras e combate as células cancerígenas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, R. C.; HUGHES-PARRY, H. E.; JENKINS, M. R. To go or not to go? Biological logic gating engineered T cells. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 10, n. 4, p. 1–10, 2022.
- ABIDA, W. et al. Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 166, n. 23, p. 11428–11436, 2019.
- AGUPITAN, A. D. et al. P53: A guardian of immunity becomes its saboteur through mutation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 1–27, 2020.
- ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. **The tumor microenvironment** **Current Biology**. [s.l: s.n.].
- BAYANI, J. et al. Molecular stratification of early breast cancer identifies drug targets to drive stratified medicine. **npj Breast Cancer**, v. 3, n. 1, 1 dez. 2017.
- BELL, K. J. L. et al. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 7, p. 1749–1757, 2015.
- BERTOLI, G.; CAVA, C.; CASTIGLIONI, I. MicroRNAs as biomarkers for diagnosis, Prognosis and theranostics in prostate cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, 2016.
- BEZZI, M. et al. Diverse genetic-driven immune landscapes dictate tumor progression through distinct mechanisms. **Nature Medicine**, v. 24, n. 2, p. 165–175, 2018.
- BLAGIH, J. et al. Cancer-Specific Loss of p53 Leads to a Modulation of Myeloid and T Cell Responses. **Cell Reports**, v. 30, n. 2, p. 481- 496.e6, 2020.
- BOUTELLE, A. M.; ATTARDI, L. D. p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. **Trends in Cell Biology**, v. 31, n. 4, p. 298–310, 2021.
- BRENNEN, W. N. et al. Resistance to androgen receptor signaling inhibition does not necessitate development of neuroendocrine prostate cancer. 2021.
- BRUGNOLI, F. et al. CD133 in Breast Cancer Cells: More than a Stem Cell Marker. **Journal of Oncology**, v. 2019, 2019.
- BULTEN, W. et al. Automated deep-learning system for Gleason grading of prostate cancer using biopsies: a diagnostic study. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 2, p. 233–241, 1 fev. 2020.
- CARLSSON, S. V. et al. PSA: role in screening and monitoring patients with prostate cancer. In: **Cancer Biomarkers: Clinical Aspects and Laboratory Determination**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 131–172.
- CHEN, B. et al. Profiling tumor infiltrating immune cells with CIBERSORT. **Methods Mol Biol.**, v. 176, n. 3, p. 243–259, 2018.
- COOPERBERG, M. R.; HILTON, J. F.; CARROLL, P. R. The CAPRA-S score: a straightforward tool for improved prediction of outcomes after radical prostatectomy. **Cancer**, v. 22, n. 117, p. 5039–5046, 2011.

- CRAWFORD, E. D. et al. Androgen-targeted therapy in men with prostate cancer: evolving practice and future considerations. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 22, n. 1, p. 24–38, 2019.
- CRUMBAKER, M.; KHOJA, L.; JOSHUA, A. M. AR signaling and the PI3K pathway in prostate cancer. **Cancers**, v. 9, n. 4, p. 1–15, 2017.
- DAVIES, A. et al. **Biological Evolution of Castration-resistant Prostate Cancer. European Urology Focus** Elsevier B.V., , 1 mar. 2019.
- DE BONO, J. S. et al. **Prostate carcinogenesis: inflammatory storms. Nature Reviews Cancer** Nature Research, , 1 ago. 2020.
- DUFFY, M. J. **Biomarkers for prostate cancer: Prostate-specific antigen and beyond. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine** De Gruyter, , 1 mar. 2020.
- EISERMANN, K.; FRAIZER, G. The androgen receptor and VEGF: Mechanisms of androgen-regulated angiogenesis in prostate cancer. **Cancers**, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2017.
- FAY, E. K.; GRAFF, J. N. **Immunotherapy in prostate cancer. Cancers** MDPI AG, , 1 jul. 2020.
- FISCHER, M. Census and evaluation of p53 target genes. **Oncogene**, v. 36, n. 28, p. 3943–3956, 2017.
- GAO, W. et al. IL20RA signaling enhances stemness and promotes the formation of an immunosuppressive microenvironment in breast cancer. **Theranostics**, v. 11, n. 6, p. 2564–2580, 2021.
- GE, S. et al. Identification of a Costimulatory Molecule-Related Signature for Predicting Prognostic Risk in Prostate Cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 16 ago. 2021.
- GLUMAC, P. M. et al. Exploitation of CD133 for the targeted imaging of lethal prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 5, p. 1054–1064, 2020.
- GOLDSBERRY, W. N. et al. A review of the role of wnt in cancer immunomodulation. **Cancers**, v. 11, n. 6, p. 1–19, 2019.
- GUO, F. F.; CUI, J. W. The role of tumor-infiltrating B cells in tumor immunity. **Journal of Oncology**, v. 2019, 2019.
- HAMID, A. A. et al. Compound Genomic Alterations of TP53, PTEN, and RB1 Tumor Suppressors in Localized and Metastatic Prostate Cancer. **European Urology**, v. 76, n. 1, p. 89–97, 2019.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022a.
- HANAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery** American Association for Cancer Research Inc., , 1 jan. 2022b.
- HASSIN, O.; OREN, M. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 22, n. 2, p. 127–144, 2023.
- HODGES, V. et al. The Relationship Among Ki-67 , ERBB2 , GATA3 , STAG2 , P53 ,

and YAP1 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. v. 10, n. 3, p. 61–69, 2022.

INAMURA, S. et al. Prostatic stromal inflammation is associated with bladder outlet obstruction in patients with benign prostatic hyperplasia. **European Urology Supplements**, v. 17, n. 2, p. e1593, 2018.

IONESCU, C. A. et al. Characterization of the Tumor Microenvironment and the Biological Processes with a Role in Prostatic Tumorigenesis. **Biomedicines**, v. 10, n. 7, 1 jul. 2022.

IZZO, S.; NAPONELLI, V.; BETTUZZI, S. Flavonoids as epigenetic modulators for prostate cancer prevention. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1–24, 2020.

KARMAKAR, D. et al. E2F5 promotes prostate cancer cell migration and invasion through regulation of TFPI2, MMP-2 and MMP-9. **Carcinogenesis**, v. 41, n. 12, p. 1767–1780, 2020.

KAUR, H. B. et al. TP53 missense mutation is associated with increased tumor-infiltrating T cells in primary prostate cancer. **Human Pathology**, v. 87, p. 95–102, 2019a.

KAUR, H. B. et al. TP53 missense mutation is associated with increased tumor-infiltrating T cells in primary prostate cancer. **Human Pathology**, v. 87, p. 95–102, 1 maio 2019b.

KUMAR, N.; SINGH, N. K. “**Emerging role of Novel Seminal Plasma Bio-markers in Male Infertility: A Review**”. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology** Elsevier Ireland Ltd, , 1 out. 2020.

LAUDATO, S.; APARICIO, A.; GIANCOTTI, F. G. **Clonal Evolution and Epithelial Plasticity in the Emergence of AR-Independent Prostate Carcinoma**. **Trends in Cancer** Cell Press, , 1 jul. 2019.

LAWRENCE A. DONEHOWER, THIERRY SOUSSIS, ANIL KORKUT, YUEXIN LIU, ANDRE SCHULTZ, MARIA CARDENAS, XUBIN LI, OZGUN BABUR, TENG-KUEI HSU, OLIVIER LICHTARGE, JOHN WEINSTEIN, REHAN AKBANI, THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, D. A. W. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. **Cell Reports**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2019.

LEITZMANN, M. F.; ROHRMANN, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates. **Clinical Epidemiology**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2012.

LIU, Q.; XIE, R.; LI, Y. Pancancer Analysis of the Oncogenic and Prognostic Role of NOL7: A Potential Target for Carcinogenesis and Survival. **International Journal of Molecular Sciences Article**, 2022.

LIU, Z. et al. TP53 alterations of hormone-naïve prostate cancer in the Chinese population. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 24, n. 2, p. 482–491, 1 jun. 2021.

MCDOWELL, S. Immunotherapy How Immunotherapy Is Used to Treat. **Cancer**, p. 1–26, 2019.

MELO, C. M. et al. **The role of somatic mutations on the immune response of**

the tumor microenvironment in prostate cancer. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 set. 2021.

Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer. . [s.l: s.n.].

MIRIAM TEROERDE, CATHLEEN NIENTIEDT, ANETTE DUENSING, MARKUS HOHENFELLNER, ALBRECHT STENZINGER, S. D. **Prostate Cancer**. Brisbane, Australia: [s.n.].

MOHLER, J. L. et al. Prostate cancer, version 2.2019. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 17, n. 5, p. 479–505, 2019.

MORIS, L. et al. Benefits and Risks of Primary Treatments for High-risk Localized and Locally Advanced Prostate Cancer: An International Multidisciplinary Systematic Review[Formula presented]. **European Urology**, v. 77, n. 5, p. 614–627, 2020.

MUÑOZ-FONTELA, C. et al. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 12, p. 741–750, 2016.

NGUYEN, A. H. T. et al. Gata3 antagonizes cancer progression in pten-deficient prostates. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 12, p. 2400–2410, 2013.

NOWAK, D. G. et al. The PHLPP2 phosphatase is a druggable driver of prostate cancer progression. **Journal of Cell Biology**, v. 218, n. 6, p. 1943–1957, 3 jun. 2019.

OTO, J. et al. A predictive model for prostate cancer incorporating PSA molecular forms and age. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

PICANÇO-ALBUQUERQUE, C. G. et al. In prostate cancer needle biopsies, detections of PTEN loss by fluorescence in situ hybridization (FISH) and by immunohistochemistry (IHC) are concordant and show consistent association with upgrading. **Virchows Archiv**, v. 468, n. 5, p. 607–617, 2016.

PICANÇO-ALBUQUERQUE, C. G. et al. PTEN loss in Gleason grade 7 prostate tumors exhibits intratumoral heterogeneity and is associated with unfavorable pathological features. **Applied Cancer Research**, v. 39, n. 1, p. 1–6, 2019.

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. **World Journal Oncology**, v. 32, n. 1, p. 2–4, 2019.

REBELLO, R. J. et al. Prostate cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, 2021.

RODRIGO SIQUEIRA-BATISTA, ANDRÉIA PATRÍCIA GOMES, SARAH FUMIAN MILWARD, RODRIGO ROGER, EDUARDO GOMES MENDONÇA, FLÁVIO OLIVEIRA, ALCIONE PAIVA OLIVEIRA, FÁBIO RIBEIRO CERQUEIRA, SÉRGIO OLIVEIRA, M. G. DE A. CD4+CD25+ T lymphocytes and regulation of the immune system: perspectives for a pathophysiological understanding of sepsis. v. 24, n. 3, p. 294–301, 2012.

SAHA, S. K. et al. PROM1 and PROM2 expression differentially modulates clinical prognosis of cancer: a multiomics analysis. **Cancer Gene Therapy**, v. 27, n. 3–4, p. 147–167, 2020.

SHAH, N.; IOFFE, V. **A Trend Toward Aggressive Prostate Cancer**. [s.l.: s.n.].

SIEMANN, D. W. **Tumor Microenvironment**. [s.l.: s.n.].

SILVA-RODRÍGUEZ, J. et al. Going deeper through the Gleason scoring scale: An automatic end-to-end system for histology prostate grading and cribriform pattern detection. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 195, 1 out. 2020.

SRINIVAS, S. et al. Patient and caregiver benefit-risk preferences for nonmetastatic castration-resistant prostate cancer treatment. **Cancer Medicine**, v. 9, n. 18, p. 6586–6596, 1 set. 2020.

STERNER, R. C.; STERNER, R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. **Blood Cancer Journal**, v. 11, n. 4, 2021.

SUN, J. et al. Identification of critical pathways and hub genes in TP53 mutation prostate cancer by bioinformatics analysis. **Biomarkers in Medicine**, v. 13, n. 10, p. 831–840, 2019.

TEISHIMA, J. et al. Fibroblast growth factor family in the progression of prostate cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 2, p. 1–9, 2019.

THOMSEN, F. B.; MARCUS WESTERBERG, HANS GARMO, DAVID ROBINSON, LARS HOLMBERG, HANS DAVID ULMERT, P. S. Prediction of metastatic prostate cancer by prostate-specific antigen in combination with T stage and Gleason Grade: Nationwide, population-based register study. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, 1 jan. 2020.

THORSSON V, ET AL. The Immune Landscape of Cancer HHS Public Access. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 812–830, 2018.

TILKI, D.; EVANS, C. P. Management of Localized and Locally Advanced Prostate Cancer. **Urologic Principles and Practice**, p. 579–590, 2020.

TREACY, P. J. et al. Association between Expression of Connective Tissue Genes and Prostate Cancer Growth and Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, 2023.

VELDMAN-JONES, M. H. et al. Evaluating robustness and sensitivity of the nanostring technologies ncounter platform to enable multiplexed gene expression analysis of clinical samples. **Cancer Research**, v. 75, n. 13, p. 2587–2593, 2015.

VIDOTTO, T. et al. PTEN-deficient prostate cancer is associated with an immunosuppressive tumor microenvironment mediated by increased expression of IDO1 and infiltrating FoxP3+ T regulatory cells. **Prostate**, v. 79, n. 9, p. 969–979, 2019a.

VIDOTTO, T. et al. PTEN-deficient prostate cancer is associated with an immunosuppressive tumor microenvironment mediated by increased expression of IDO1 and infiltrating FoxP3+ T regulatory cells. **Prostate**, v. 79, n. 9, p. 969–979, 15 jun. 2019b.

VITKIN, N. et al. The tumor immune contexture of prostate cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAR, p. 1–10, 2019.

WANG, B. D. et al. Alternative splicing promotes tumour aggressiveness and drug resistance in African American prostate cancer. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 1–14, 2017.

WANG, I. et al. Prostate cancer immunotherapy: a review of recent advancements with novel treatment methods and efficacy. **American journal of clinical and experimental urology**, v. 10, n. 4, p. 210–233, 2022.

WANG, X.; SUN, Q. Oncotarget 624 www.impactjournals.com/oncotarget TP53 mutations, expression and interaction networks in human cancers. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 624–643, 2017.

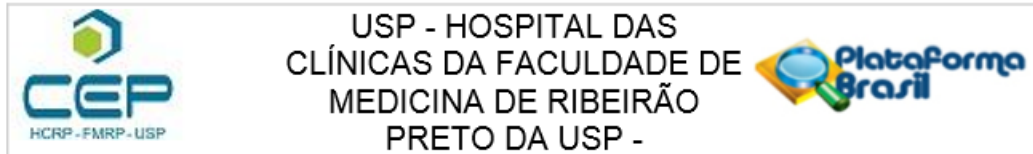
WILLIAMS, A. B.; SCHUMACHER, B. p53 in the DNA-damage-repair process. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 5, p. 1–16, 2016.

ZHENG, Z. et al. Tumor characteristics, treatments, and survival outcomes in prostate cancer patients with a PSA level < 4 ng/ml: A population-based study. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 2020.

ZUNIGA, K. B. et al. **Diet and lifestyle considerations for patients with prostate cancer. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations** Elsevier Inc., , 1 mar. 2020.

9. ANEXOS

ANEXO A – Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INTERAÇÕES ENTRE PTEN, P53, CDK12 E TMRSS2 GENES DE FUSÃO NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DA PRÓSTATA

Pesquisador: Francisco Cesar de Sousa e Silva

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 40951020.4.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.471.408

Apresentação do Projeto:

O câncer nos dias atuais é uma das doenças que mais causa óbitos em seus acometidos, entre os homens temos o câncer de próstata como sendo o maior causador desses óbitos. O câncer é causado por uma desordem celular, onde as células passam a proliferar de forma descontrolada por perderem alguns sinais de regulação. No processo de carcinogênese as células passam a evitar os supressores de crescimento. O PTEN é um

supressor tumoral e tem ação de antagonista da atividade da classe I PI3K, essas enzimas são responsáveis por transformar PIP2 em PIP3, finalizando na ativação da serina RAC γ - com regulação negativa treonina - proteína quinase (AKT). Quando ocorre a perda ou a inativação do PTEN, temos como resultado a atividade contrária da PI3K e um acúmulo de PIP2.

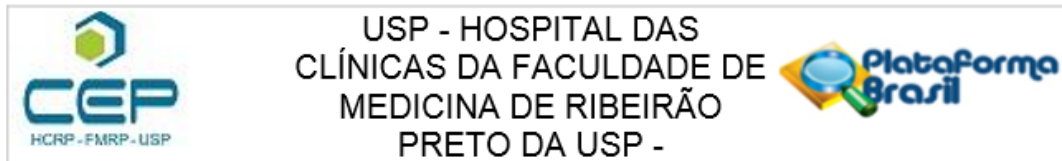
Objetivo da Pesquisa:

Investigar mutações gênicas presente no câncer de próstata e associa-las ao micro ambiente tumoral e a progressão do câncer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: No estudo utilizaremos massa tumoral retirada durante a cirurgia de prostatectomia radical

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.471.408

ou parcial. Estes fragmentos foram coletados após o procedimento cirúrgico de rotina, onde ocorreu anteriormente a realização de biópsias com finalidade de detectar a presença do câncer de próstata. Estes pacientes foram operados devido à presença de tumores na próstata, portanto, os riscos inerentes a este projeto estão

relacionados ao procedimento cirúrgico onde poderia ocorrer complicações ligadas à cirurgia, no entanto o paciente estava sob a responsabilidade da equipe médica do HC-FMRP. No procedimento de imunoistoquímica pode ocorrer a contaminação da amostra, como por exemplo a dosagem incorreta dos reagentes e soluções, assim como também o controle incorreto de estufas.

Benefícios: Esclarecemos que não haverá nenhum benefício imediato aos participantes do estudo, a não ser que deveremos passar a conhecer melhor como funcionam as alterações dos genes contidos no presentes estudo e suas possíveis relações com a alteração imune no microambiente tumoral e tardiamente poder colaborar para um melhor desempenho de terapias como a imunoterapia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa será um estudo experimental quantitativo, onde iremos usar o procedimento de imunoistoquímica para avaliar as perdas proteicas de PTEN, p53, CDK12, TMRSS2 e genes de fusão e associa-las ao grau clínico e de avanço do câncer de próstata.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados. Solicita a dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido como justificativa para a presente solicitação colocamos que, os pacientes participantes deste projeto de pesquisa já assinaram um TCLE no ato de suas cirurgias autorizando o uso de seus materiais biológicos em pesquisas com fins acadêmicos. Sendo este projeto retrospectivo, usaremos esses materiais que se encontram em parafina. Garantimos total sigilo e confidencialidade dos dados de todos os pacientes participantes deste projeto.

Recomendações:

não se aplica

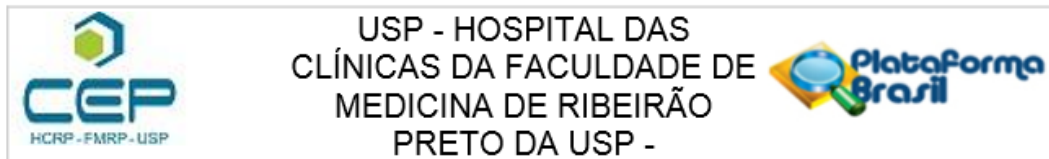
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.471.408

parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|----------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1659007.pdf | 14/12/2020 13:54:53 | | Aceito |
| Declaração de concordância | carta_de_concordancia.pdf | 14/12/2020 13:54:09 | Francisco Cesar de Sousa e Silva | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_detalhado.docx | 14/12/2020 12:13:22 | Francisco Cesar de Sousa e Silva | Aceito |
| Cronograma | Cronograma.docx | 14/12/2020 12:12:41 | Francisco Cesar de Sousa e Silva | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.pdf | 14/12/2020 12:11:44 | Francisco Cesar de Sousa e Silva | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto.pdf | 10/12/2020 12:04:18 | Francisco Cesar de Sousa e Silva | Aceito |
| Outros | UPC.pdf | 10/12/2020 12:03:33 | Francisco Cesar de Sousa e Silva | Aceito |
| Orçamento | Orcamento_Financeiro.docx | 09/12/2020 17:20:57 | Francisco Cesar de Sousa e Silva | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 17 de Dezembro de 2020

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

ANEXO B – Carta de Aprovação da Unidade de Pesquisa Clínica (UPC).



PROJETO DE PESQUISA



Ribeirão Preto, 20 de JULHO de 2020.

Ilustríssima Senhora
 Prof.ª Dr.ª Márcia Guimarães Villanova
 MD. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 Do HCFMRP e da FMRP-USP

Senhora Coordenadora,

Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado INTERAÇÕES ENTRE PTEN, P53, CDK12 E TMRSS2 GENES DE FUSÃO NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DA PRÓSTATA., juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.

O projeto de pesquisa acima mencionado será desenvolvido no departamento de CIRURGIA E ANATOMIA.

Informo também que o pesquisador responsável e orientador possuem currículo Lattes.

O orçamento do presente projeto foi analisado pela equipe técnica da UPC antes da submissão ao Comitê e foi APROVADO.

Atenciosamente,

JEREMY ANDREW SQUIRE

Prof. Dr. Francisco Cesar de Sousa e Silva
 Professor Associado
 Chefe do Departamento de
 Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP

 CIRURGIA E ANATOMIA
 Carimbar e Assinar

FRANCISCO CESAR DE SOUSA E SILVA

Chefe do Ambulatório/Laboratório

 Carimbar e Assinar



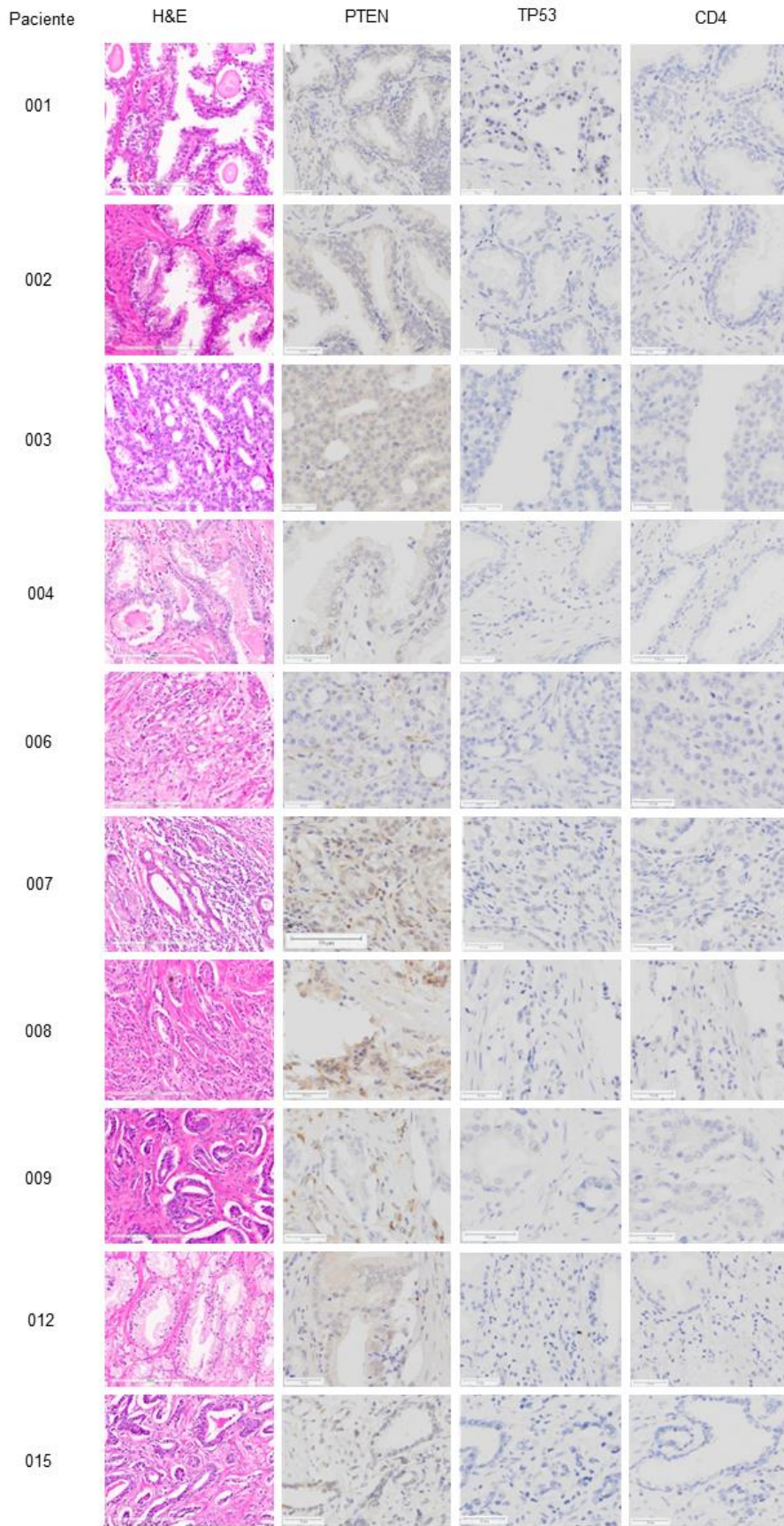
Obs.: Caso algum chefe possua vínculo com a pesquisa, deverá ser solicitada assinatura do suplente.
 Após assinatura em todos os campos, digitalizar toda a documentação do check list e encaminhar ao CEP via Plataforma Brasil.

HC - Campus Universitário
 Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

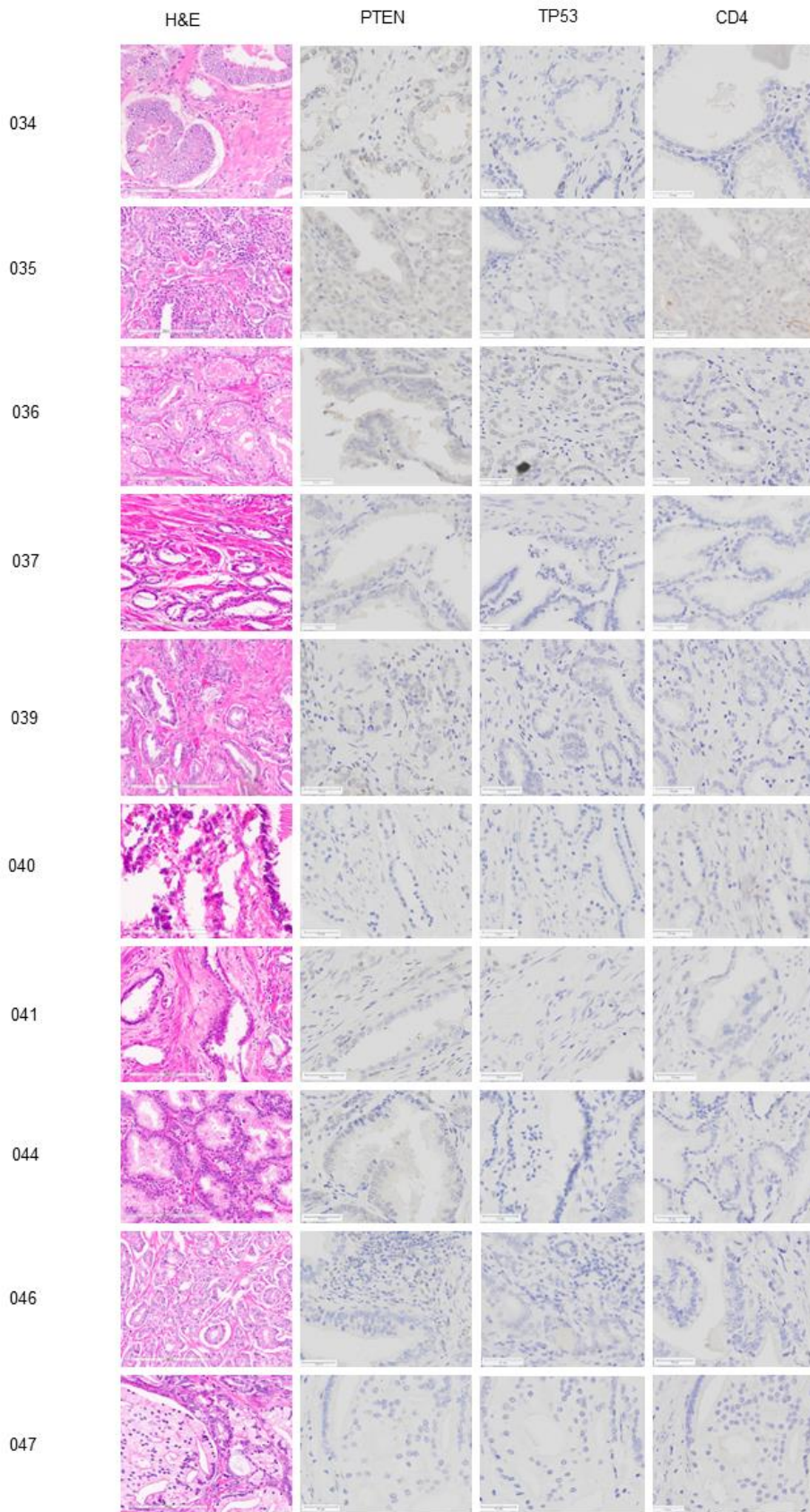
UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA
 Fone (16) 3602-2632 FAX: 3602-2962

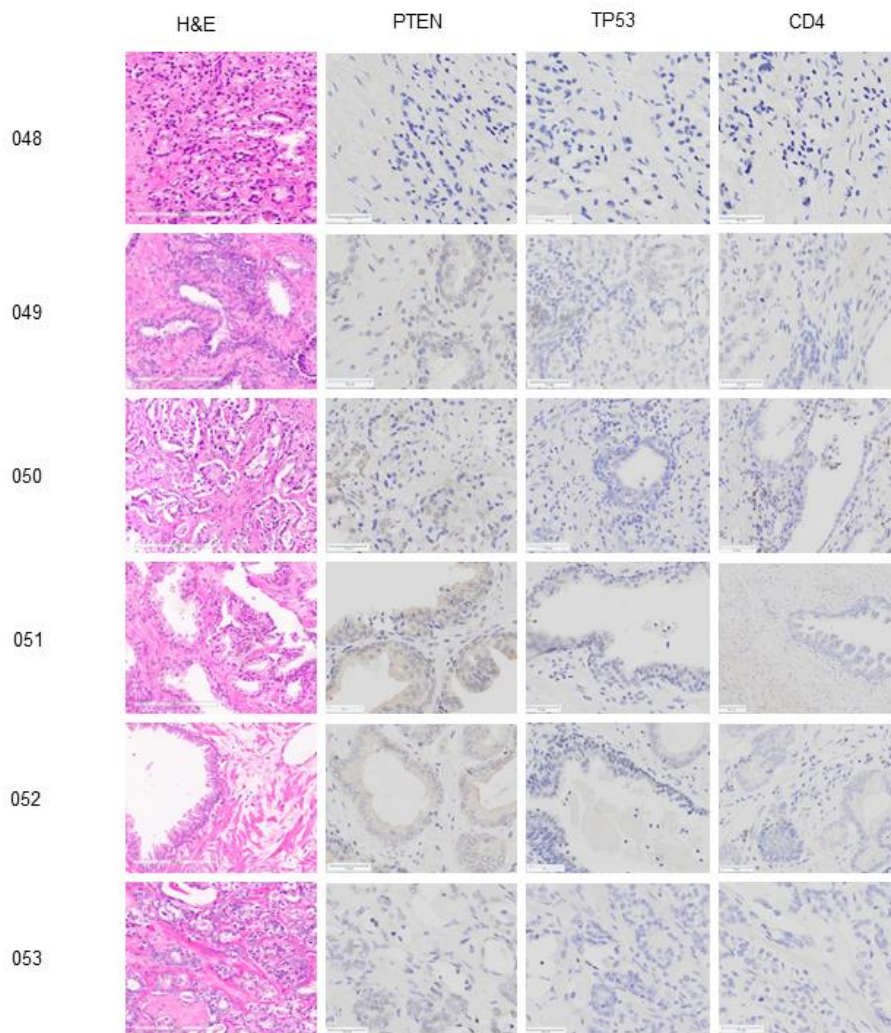
ANEXO C – Resultados Preliminares de Imuno-histoquímica.

A realização de imuno-histoquímica (IHC) das amostras ocorreu com a ajuda do técnico Lee Boudreau do Queens Laboratory for Molecular Pathology (QLMP). Em algumas amostras não foi possível realizar o procedimento de IHC, as amostras passaram por diversos procedimentos laboratoriais, tais como, H&E, nanostring, controle de qualidade, com isso o material biológico foi se esvaindo, por isso, das 53 amostras disponíveis na coorte, 37 passaram por imuno-histoquímica. Abaixo temos os resultados das imuno-histoquímicas realizadas para observar as proteínas PTEN, TP53 e a abundância de células CD4. Além disso, temos nossa colaboração contínua com o Dr. Jane Bayani, que fornecerá dados de mutação somática de *TP53* usando DNA de tumores nesta coorte.



| Paciente | H&E | PTEN | TP53 | CD4 |
|----------|-----|------|------|-----|
| 017 | | | | |
| 018 | | | | |
| 019 | | | | |
| 020 | | | | |
| 021 | | | | |
| 022 | | | | |
| 025 | | | | |
| 026 | | | | |
| 027 | | | | |
| 029 | | | | |
| 031 | | | | |





Além dos ensaios de IHC para PTEN, TP53 e CD4, estão sendo realizados ensaios para CD8 e CD68. Pegamos os 11 casos mais críticos (lâminas 04, 06, 17, 18, 22, 34, 37, 40, 41, 46, 48), todos os pacientes deste grupo tinham recorrência bioquímica (PSA>0,2 após a cirurgia). Foi possível notar que 54% (lâminas 04, 06, 40, 41, 46, 48) deste grupo possui baixa expressão de *PTEN* e *TP53* (figura 7). A imunohistoquímica mostrou a ausência das proteínas PTEN e TP53 neste grupo. Outro detalhe é o score de gleason, todos os 11 casos possuem escore de gleason que vai de 7 à 9. A literatura vai mostrar que a perda combinada destes dois supressores de tumor é responsável pelo aparecimento de adenocarcinoma da próstata e também pela progressão do câncer de próstata (LAUDATO; APARICIO; GIANCOTTI, 2019). Nowak e colaboradores mostraram em um ensaio utilizando camundongos que 4 de 5 animais duplamente mutante para Pten/Tp53 apresentaram sinais fortes da doença durante 10 meses, também apresentaram progressão para metástase (NOWAK et al.,

2019). Brennen e colaboradores mostrou também em seu trabalho que um paciente que passou por diversos procedimentos como prostatectomia radical para doença localmente avançada, radioterapia, terapia de deprivação andrógena veio a óbito, feita a autópsia notou-se a baixa expressão de *PTEN* e *TP53* em todas as amostras metastática coletada (BRENNEN et al., 2021). A perda destes supressores tumorais está associada a recorrência bioquímica (HAMID et al., 2019; DAVIES et al., 2019).

Isolamos também um grupo com onze amostras (Lâminas 02, 03, 07, 09, 12, 15, 21, 25, 26, 29, 31) consideradas menos grave uma vez que não apresentaram recorrência bioquímica. Neste grupo 72,72% das amostras (Lâminas 02, 03, 07, 12, 21, 26, 29, 31) possuíam a proteína *PTEN* intacta, sugerindo que o gene *PTEN* está intacto (figura 7). Quanto ao score de gleason, não obtivemos diferenças quanto ao grupo com o câncer de próstata mais agressivo, quando temos o grupo com câncer de próstata menos agressivo com *PTEN* intacto temos um escore de gleason que vai de igual a 7 à 9. Este fenômeno é explicado por Sun e seus colaboradores, eles mostram em seu trabalho que a baixa frequência de *TP53* está fortemente correlacionada com o alto score de gleason, em nossos resultados todas as 11 amostras apresentaram imuno-histoquímica negativa para a proteína *TP53* (SUN et al., 2019).

Das 35 amostras que passaram pelo procedimento de imuno-histoquímica, somente uma (Lâmina 22) apresentou infiltração de células CD4, essa amostra possui *PTEN* intacto e *TP53* baixo, é um paciente com recorrência bioquímica e seu score de gleason é de 5+4=9. Segundo a literatura, a mutação de *TP53* está associada a níveis mais alto na frequência de células T infiltrantes no tumor (KAUR et al., 2019a; GE et al., 2021).

ANEXO D – Desenvolvimento Científico.

Além de participar de diversos congressos nacionais e internacionais como primeiro autor e também como colaborador, o aluno participou semanalmente de encontros para discussão de artigos científicos, esses encontros intitulava-se “*journal club*”. O grupo de debate reunia docentes e discentes de vários grupos de pesquisas diferentes. O aluno também participava quinzenalmente de encontros laboratoriais “*lab meeting*” onde eram feitas atualizações dos projetos do grupo.

- *VIII international symposium on translational oncology*

Title: Reduced TP53 expression is associated with immune signaling and an inflammatory tumor microenvironment in prostate cancer.

Francisco Cesar de Sousa e Silva¹; Camila Morais Melo²; Luiz Paulo Chaves de Souza²; Fabiano Pinto Saggioro³; Rodolfo Borges dos Reis¹; Jane Bayani⁴; Jeremy Andrew Squire^{1, 2, 5}

* ¹Department of Surgery And Anatomy, Division Of Urology, Medicine School Of Ribeirão Preto, University Of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. ²Department of Genetics, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. ³Department of Pathology and Forensic Medicine, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. ⁴Ontario Institute for Cancer Research, Ontario, Canada. ⁵Department of Pathology and Molecular Medicine, Queen's University, Kingston, Canada.

*Correspondence author: squirej@fmrp.usp.br

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer in men. TP53, a tumor suppressor gene, is mutated in 20-30% of all PCa cases. Our aim is to show how TP53 expression levels may impact the tumor microenvironment by regulating immune signaling pathways in PCa. The 51 primary PCa samples, collected retrospectively by radical prostatectomy and obtained from the pathology archive of Medical School of Ribeirão Preto. We used the nSolver software to analyze NanoString RNA expression data. We classified TP53 expression levels base on quartiles of expression and compared the effects of high (last quartile), intermediate (middle two quartiles), and low (first quartile) expression on downstream gene changes and implicated pathway activities. TP53 high group showed PARP1, GATA, RAD51 and TGFβ genes down-regulated. These genes are involved in proliferation and tumor transformation, T cell development, and DNA repair. Heatmap analysis showed that TP53 low expression is associated with increased activity of chemokine and cytokine signaling and activation of epigenetic regulatory pathways. In contrast, these same pathways appeared to be downexpressed in TP53 high-expressing tumors. We also found inflammatory pathways downexpressed in TP53 high group when compared to TP53 low group. We

conclude that reduced expression of the TP53 gene is associated with more infiltration of inflammatory cells into the tumor microenvironment, possibly leading to an immune evasion state with more aggressive tumor behavior. The lower expression of TP53 may also lead to downregulation of genes involved in important pathways in PCa progression.

Key words: TP53, prostate cancer, differential gene expression, pathway analysis, tumor progression



- *67 th Brazilian Congress of Genetics*

Title: In-silico comparison of differentially expressed genes and immune evasion pathways in prostate cancer tumors with *PTEN*, *TP53*, and *TMPRSS2-ERG* alterations

Francisco Cesar de Sousa e Silva^{1,*}, William Lautert-Dutra²; Camila Morais Melo²; Jeremy Andrew Squire^{1,2,3}

¹Department Of Surgery And Anatomy, Division Of Urology, Medicine School Of Ribeirão Preto, University Of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

²Department of Genetics, Medicine School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

³Department of Pathology and Molecular Medicine, Queen's University, Kingston, Canada.

*Correspondence author: franciscoceasar@usp.br

Prostate cancer (PCa) remains the most common cancer affecting men worldwide. Tumor suppressor genes such as *PTEN* and *TP53* are important in PCa progression. *PTEN* appears mutated in 15-20% of primary PCa, and *TP53* in 20%-50% of cases. *TMPRSS2-ERG* fusion is present in more than 50% of PCa. Recent findings suggest that somatic mutations in *PTEN* and *TP53* or specific activation of regulatory pathways such as ETS may in combination facilitate an immune evasion against cancer. Our aim is to understand how immune and oncogenic pathways behave when these genes are mutated (individually or in combination) in PCa tumors. For this analysis, we downloaded the TCGA cohort and aligned RNA-seq reads using recont2 (v1.18.0). We then performed differential gene expression (DGE) analyses using DESeq2 (v1.32.0), Gene set enrichment analyses (GSEA) using clusterProfiler (v4.0.2) in the R environment (R v4.1.2), and digital flow cytometry using the CIBERSORT algorithm. When comparing patients with *TP53* mutated vs. *wild-type*, the DGE results showed 859 genes upregulated and 1193 downregulated. There was also a low expression of genes such as *PAEP*, involved in the deregulation of the WNT pathway. GSEA and overrepresentation analysis showed in *TP53* mutated a high expression of important pathways such as nuclear division, DNA recombination, double-strand break repair, and low expression of chemical stimulus sensing, oxygen transport, and detoxification pathways. High expression in the nuclear division pathways may mean increased cell proliferation. In the comparison of *TMPRSS2-ERG* fusion-positive vs. negative, the DGE results showed 2997 genes upregulated and 5418 downregulated. We observed a high expression of *FEZF2*, a gene related to malignant cancer progression by regulating the NF- κ B signaling pathway. The presence of the *TMPRSS2-ERG* fusion causes a high expression of the positive regulation pathways of lyase activity and cyclase process. We also observed the abundance of immune cell infiltration in our comparisons. In *PTEN* intact and *TMPRSS2-ERG* fusion-positive samples, we found a higher expression of CD8 T cells, resting memory CD4 T cells, resting dendritic cells, and a lower expression of B cells, regulatory T cells, and M2 macrophages. In *PTEN* Loss and *TMPRSS2-ERG* fusion-positive samples, we found the highest expression of plasma cells, M1 macrophages, resting dendritic cells, and a decreased expression of monocytes, and M2 macrophages. When *PTEN* is intact and *TP53* mutated, there is the lowest expression of monocytes. In our analyses, we saw those alterations in the *PTEN* gene expression already led to a worse prognosis in PCa, but when this alteration is combined with mutations in *TP53* or *TMPRSS2-ERG* fusion there were changes in the expression of relevant genes, especially related to immune response. PCa is considered an immunologically excluded tumor, and our in-silico flow cytometry showed how the relative abundance of the immune infiltrate in patients with mutations affecting these genes affects the tumor microenvironment of PCa. Collectively, our results suggest that the combined mutations of both tumor suppressor genes lead to

an increased immune evasion phenotype together with deregulation of pathways important for cell homeostasis.

Keywords: *tumor suppressor genes, ETS, tumor microenvironment, immunotherapy*

Financial support: CAPES, FAPESP, FAEPA, CNPq



67th Brazilian Congress of Genetics
GENÉTICA²²
 12 a 15 | setembro | 2022
 Praiamar Natal Hotel & Convention | Natal-RN

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **In-silico comparison of differentially expressed genes and immune evasion pathways in prostate cancer tumors with pten, tp53, and tmprss2-erg alterations.**, de autoria de *Francisco Cesar de Sousa e Silva; William Lautert-Dutra; Camila Morais Melo; Jeremy Andrew Squire* foi apresentado durante o GENÉTICA 2022, evento técnico-científico promovido pela Sociedade Brasileira de Genética na cidade de Natal - RN durante o período de 12 a 15 de setembro de 2022.

 **SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA**


 Ana Maria Benko Iseppon
 Presidente da SBG


 Andrea Kely Ribeiro dos Santos
 Primeira Secretária da SBG



Title: IN SILICO ANALYSIS OF EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL MARKERS IN PROSTATE CANCER IDENTIFIES PATHWAYS ASSOCIATED WITH IMMUNE EVASION ACTIVITY

Luiz Paulo Chaves de Souza¹; Francisco Cesar de Sousa e Silva¹; Camila Morais Melo¹; Fabiano Pinto Saggioro³; Rodolfo Borges dos Reis⁴; André Luiz Caliarí¹; William Lautert-dutra¹; Jeremy Andrew Squire^{2,5}

¹ Av. Bandeirantes, 3900 Monte Alegre - Ribeirão Preto - SP - Brasil. Department of genetics, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo; ² Av. Bandeirantes, 3900 Monte Alegre - Ribeirão Preto - SP - Brasil. Department of genetics, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo; ³ Av. Bandeirantes, 3900 Monte Alegre - Ribeirão Preto - SP - Brasil. Department of pathology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo; ⁴ Av. Bandeirantes, 3900 Monte Alegre - Ribeirão Preto - SP - Brasil. Department of surgery and anatomy, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo; ⁵ 88 Stuart Street, Queen's University Kingston - ON - Canada. Department of Pathology and Molecular Medicine, Queens University

Abstract: Prostate cancer (PCa) is considered an immunological cold or excluded tumor with an impaired response to immunotherapy. PCa reactivates a latent embryonic program called epithelial-mesenchymal transition (EMT) during disease progression. EMT has been associated with invasion, metastasis and immune evasion in various types of cancer. In this study, we used transcriptomic analysis of the TCGA public data for prostate adenocarcinoma to investigate the role of the EMT markers

ZEB1 and SNAI1 in immune response-related genes and pathways. To characterize the downstream effects of ZEB1 and SNAI1 expression we dichotomized the cohort based on quartiles of expression of both markers comparing the 25% of tumors with higher expression to the 75% of tumors with lower expression levels. Analysis of the differentially expressed genes showed that the higher expression of both ZEB1 and SNAI1 was associated with upregulation of several immune evasion related markers such as CTLA-4, PD-L1, TIM-3, DCR3 and IL10. Pathway enrichment analysis of the differentially expressed gene associated with high SNAI1 and ZEB1 expression showed there was upregulation of TGF- β signaling, IL-6 JAK-STAT3 signaling and TNF signaling via NF κ B pathways in both EMT markers. Digital flow cytometry analysis using the CIBERSORT algorithm showed that both ZEB1 and SNAI1 overexpression was related to enrichment of quiescent cells in tumors such as naive B-cells. Elevated ZEB1 expression was also associated with M2 polarization of macrophages and depletion of effector immune cells in the tumor microenvironment such as CD8 T cells. Collectively, our data suggest that high expression of both EMT markers is associated with overexpression of proinflammatory pathways. These data are consistent with the literature showing that the concomitant expression of immunomodulatory markers may promote immune evasion via induction of T Cell exhaustion.

Keywords: non-immunogenic tumors; tumor infiltrating lymphocytes (TILs); E-box; inflammation; castrate resistant prostate cancer

Support / Acknowledgment Financial support: FAPESP (2019/22912-8 and 2020/12816-9) and CNPq.

- Ministrante no XXVII Curso de Verão de Genética



- *American Association For Cancer Research 2022*

Title: Analysis of the impact of ZEB1 expression on pathway enrichment and immune cell abundance in prostate cancer

Luiz Paulo Chaves; André Luiz Caliari; William Lautert-Dutra; Francisco Cesar Souza Silva; Camila Morais Melo; Fabiano Pinto Saggioro; Rodolfo Borges dos Reis; Jeremy Andrew Squire

Cancer Res (2022) 82 (12_Supplement): 6098.

<https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-6098>

Abstract

Prostate cancer (PCa) reactivates a latent embryonic program called epithelial-mesenchymal transition during disease progression. The mesenchymal phenotype contributes to invasion, metastasis and therapy response variation. In this study, we characterize the downstream effects of ZEB1 expression based on cohort dichotomization of quartiles of expression comparing the 25% of tumors with high ZEB1 expression to the 75% of tumors with lower ZEB1 expression. Differential gene

expression (DGE), gene set enrichment analysis (GSEA) and immune cell abundance prediction were accessed using PCa expression data from TCGA (n=488). ZEB1 high status based on gene expression was stratified based on ZEB1 expression values higher than the 3rd expression quartile value (n=122). Contingency analysis showed that PTEN loss is more frequent in the ZEB1 high group (Chi-square, p=0.0005) which supports previously presented data from our group that showed an inverse correlation between ZEB1 and PTEN protein expression but showed no difference between the groups regarding presence of the TMPRSS2-ERG fusion. DGE showed that more than 13,000 genes are differentially expressed in the ZEB1 high group while GSEA showed that signaling pathways such as HALLMARK TGF BETA, HALLMARK IL2 STAT5, HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE and HALLMARK NOTCH were upregulated in the ZEB1 high group compared to the low group. Yet inflammatory response related pathways were observed enriched in the ZEB1 high group, CIBERSORT analysis showed that effector immune cells such as CD8+ T cells and T helper cells (Holm-Sidak, p=0.000003 and p=0.000613, respectively) were enriched in the ZEB1 low group in comparison to the ZEB1 high group, which supports previous studies that suggest that ZEB1 cooperates with PTEN loss and TMPRSS2-ERG fusion to promote an immune evasive phenotype in PCa. Collectively, these findings demonstrate that gene expression changes associated with increased ZEB1 expression may involve clinically relevant pathways such as modulation of the tumor immune microenvironment and NOTCH-dependent tumor progression.

- *American Association For Cancer Research 2022*

Title: Differential gene expression related to TMPRSS2-ERG fusion, CDK12, RB1, TP53, AR and ZEB1 based on transcriptomic analysis of the TCGA PRAD cohort

William Lautert-Dutra; Camila Morais Melo; Luiz Paulo Chaves; André Luiz Caliani; Francisco Cesar Souza Silva; Jeremy Andrew Squire

Cancer Res (2022) 82 (12_Supplement): 6099.

<https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-6099>

Abstract

Prostate Cancer (PCa) is considered an immunologically excluded tumor, unable to generate an effective T-cell response against cancer cells. Inactivating mutations of the PTEN tumor suppressor are one of the most common events in human malignancies that contribute to tumorigenesis by affecting many cancer Hallmark pathways. The CDK12, RB1, TP53, AR and ZEB1 genes have been variously implicated in pathways of PCa progression and immune evasion. Here, we present a comprehensive analysis of The Cancer Genome Atlas derived PCa cohort (n=488, 96 homozygous and 64 hemizygous PTEN loss). Differential gene expression (DGE) and pathway enrichment analysis were performed for all five genes using the DESeq2 tool from the Bioconductor package for R. All comparisons were designed to compensate for gene expression changes caused by PTEN loss.

Functional pathway analysis showed that fusion positive samples presented several downregulated pathways, including leukocyte mediated cytotoxicity, IFN type I response and IFN- γ production. AR high presented upregulation of pathways such as DNA replication and chromatin remodeling, while AR low presented upregulation of pathways such as T cell activation and lymphocyte proliferation. ZEB1 high presented a wide range of enriched pathways, including upregulation of mesenchymal cell differentiation and T cell activation. CDK12-Hom group exhibited upregulation of T cell activation, T cell differentiation and IFN- γ production. TP53 mutation revealed upregulation of various pathways including DNA replication and cell division. RB1 loss showed enrichment of pathways such as T cell activation and lymphocyte activation. Our analysis showed that variation in these five genes can promote gene expression changes associated with clinically relevant pathways independently of PTEN and that AR, CDK12, TMPRSS2-ERG fusion, ZEB1 and RB1 status are potential biomarkers for immunotherapy response.

- *66 th Brazilian Congress of Genetics*

Title: *Interactions between PTEN, TP53, RB1 and TMPRSS2-ERG genes in prostate cancer progression*

Francisco Cesar de Sousa e Silva ¹; Camila Morais Melo ²; Jeremy Andrew Squire ^{3,1}

¹Department of Surgery and Anatomy, Division of Urology, Medicine School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.; ² Department of Genetics, Medicine School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.; ³Department of Pathology and Molecular Medicine, Queens University, Kingston, Canada.

BACKGROUND: Prostate cancer is a significant cause of cancer morbidity and mortality in men. Recent findings suggest that somatic mutations in PTEN, TP53 and RB1 or specific activation of regulatory pathways such as ETS may facilitate immune evasion of the host response against cancer. **METHODS:** We analyzed RNAseq data from 494 prostate cancers from the TCGA public domain dataset and estimated the immune cell abundances in each tumor with the CIBERSORT algorithm. **RESULTS:** Patient tumors with PTEN loss (homozygous and hemizygous deletion) compared to PTEN intact tumors showed a high density of M0 and M1 macrophages and dendritic resting cells and low density of NK, plasma and mast resting cells. When we compared patients with PTEN intact and the presence of TMPRSS2-ERG fusion, we observed a high density of T CD8 cells, T CD4 memory resting cells, dendritic resting cells, and lower density of B cells memory and M2 macrophages. In patients with PTEN loss and the presence of TMPRSS2-ERG fusion, we observed a high density of plasma cells, M1 macrophages and dendritic resting cells and a lower density of monocytes and M2 macrophages. However, patients with loss of PTEN expression and concomitant TP53 mutation had no statistically significant changes in the number of immune cells present

in the tumor microenvironment. Similarly, the loss of PTEN and mutations in RB1 had no differences in the patient tumor microenvironment related to the inflammatory infiltrate. **CONCLUSION:** Our findings suggest that loss of PTEN and the presence of TMPRSS2-ERG fusion may cooperate in prostate cancer to lead to changes in the prostate cancer microenvironment. Future immunohistochemistry studies designed to evaluate the numbers and types of infiltrating immune cells in prostate tumors that are fusion-positive PTEN deleted will be used to validate these *in silico* predictions using patient tumors.

KEYWORDS: tumor microenvironment; immune evasion; immune cell abundance software

ACKNOWLEDGMENTS: Financial support: CAPES



Certificamos que **FRANCISCO CESAR DE SOUSA E SILVA** apresentou o trabalho intitulado **Interactions between PTEN, TP53, RB1 and TMPRSS2-ERG genes in prostate cancer progression**, de autoria de *Francisco Cesar de Sousa e Silva; Camila Moraes Melo; Jeremy Andrew Squire*, no GENÉTICA 2021 - Brazilian Congress of Genetics, de **13 a 16 de setembro de 2021**, em formato online.


Ana Maria Benko Iseppon
Presidente da SBG

 SOCIEDADE
BRASILEIRA
DE GENÉTICA


Ândrea Kely Ribeiro dos Santos
Primeira Secretária da SBG



Certificamos que **FRANCISCO CESAR DE SOUSA E SILVA** participou do **Congresso Brasileiro de Genética 2021**, evento científico realizado de **13 a 16 de setembro de 2021**, em formato online. O evento em questão ocorreu de forma integrada com os eventos **GENÉTICA 2021 - Brazilian Congress of Genetics, XIX SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, II Congresso Latino-Americano de Genética para Conservação (II CLaGeneC) e 32ª Reunião de Genética de Microrganismos (REGEM-32)** com carga horária total de **32 horas**.


Ana Maria Benko Iseppon
Presidente da SBG

 SOCIEDADE
BRASILEIRA
DE GENÉTICA


Andrea Kely Ribeiro dos Santos
Primeira Secretária da SBG

- VIII Workshop da Pós-Graduação em Genética 2022



Certificamos que **Francisco Cesar de Sousa e Silva** participou do evento comemorativo **“50 anos do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP”** e do **VIII Workshop da Pós-graduação em Genética 2022**, na cidade de Ribeirão Preto-SP durante o período de 03 a 05 de novembro de 2022.

Ribeirão Preto, 08 de dezembro de 2022


Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

- I Congresso Brasileiro On-line de Atualização em Genética

INTERAÇÕES ENTRE OS GENES PTEN, TP53, RB1 E A FUSÃO TMPRSS2-ERG NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

SILVA, Francisco Cesar De Sousa E; MELO, Camila Moraes; SQUIRE, Jeremy Andrew

Introdução: O câncer da próstata é uma causa significativa de morbidade e mortalidade de câncer nos homens. Descobertas recentes sugerem que as mutações somáticas em PTEN, TP53 e RB1 ou a ativação específica de vias regulamentares, tais como o ETS, podem facilitar a evasão imunológica da resposta do hospedeiro contra o câncer. **Objetivo:** Investigar mutações gênicas presentes no câncer de próstata e associá-las ao microambiente tumoral e à progressão do câncer. **Materiais e métodos:** Analisamos dados RNAseq de 494 adenocarcinoma do conjunto de dados do TCGA e estimamos a abundância de células imunitárias em cada tumor com o algoritmo CIBERSORT, utilizamos o programa estatístico R. **Resultados:** Os tumores de pacientes com perda de PTEN (deleção homozigotos e hemizigotos) comparados com tumores de PTEN intactos mostraram uma alta densidade de macrófagos M0 e M1 e células dendríticas em repouso e baixa densidade de células NK em repouso, plasmócito e mastócitos. Pacientes com PTEN intacto e a presença de fusão TMPRSS2-ERG possui uma alta densidade de células T CD8, células em repouso de T CD4 memória, células dendríticas em repouso, e uma densidade mais baixa de células B de memória e macrófagos M2. Em doentes com perda de PTEN e a presença da fusão TMPRSS2-ERG, observamos uma alta densidade de células plasmática, macrófagos M1 e células dendrítica em repouso, e uma densidade mais baixa de monócitos e macrófagos M2. Contudo, pacientes com perda de expressão de PTEN e mutação TP53 concomitante não tiveram alterações estatisticamente significativas no número de células imunitárias presentes no microambiente tumoral. Do mesmo modo, a perda de PTEN e mutações em RB1 não teve diferenças no microambiente tumoral de paciente relacionadas com o infiltrado inflamatório. **Conclusão:** Os nossos resultados sugerem que a perda de PTEN e a presença da fusão TMPRSS2-ERG podem cooperar no câncer da próstata para levar a alterações no microambiente. Futuros estudos imuno-histoquímica serão realizados para avaliar os números e tipos de células imunitárias infiltrantes em tumores da próstata que tenha deficiência no PTEN e presença da fusão, o ensaio de imuno-histoquímica será utilizado para validar os dados obtidos in sílico utilizando tumores de pacientes.

Palavras-chave: Microambiente Tumoral, Evasão Imunitária, Software De Abundância De Células Imunitárias, Prostate Cancer.

ISBN: 978-65-88884-14-0




Certificado

Certificamos para os devidos fins que **FRANCISCO CESAR DE SOUSA E SILVA**, participou do **I CONGRESSO BRASILEIRO ON-LINE DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA**, realizado no período de 14 a 17 de fevereiro de 2022, com carga horária total de 20 horas.

Lavras/MG, 28 de junho de 2023.


 Prof. Jocilene dos Santos Pereira
 Coordenadora do evento


 Dr. Vandergue Santos Pereira
 Coordenador do Instituto Multiprofissional de Ensino



CÓDIGO DO CERTIFICADO: 6FU13-UE2DK-HQ5AB-CFG57

VERIFIQUE AUTENTICIDADE EM: <https://ime.events/certificado/validar/6FU13-UE2DK-HQ5AB-CFG57>




Certificado

Certificamos para os devidos fins que o trabalho intitulado "**INTERAÇÕES ENTRE OS GENES PTEN, TP53, RB1 E A FUSÃO TMRSS2-ERG NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**" de autoria de **FRANCISCO CESAR DE SOUSA E SILVA, CAMILA MORAIS MELO E JEREMY ANDREW SQUIRE** foi apresentado na modalidade "**APRESENTAÇÃO ORAL**" durante o **I CONGRESSO BRASILEIRO ON-LINE DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA**, realizado no período de 14 a 17 de fevereiro de 2022.

Lavras/MG, 28 de junho de 2023.


 Prof. Jocilene dos Santos Pereira
 Coordenadora do evento


 Dr. Vandergue Santos Pereira
 Coordenador do Instituto Multiprofissional de Ensino



CÓDIGO DO CERTIFICADO: XPPUP-E7UGY-3XNFH-RWK95

VERIFIQUE AUTENTICIDADE EM: <https://ime.events/certificado/validar/XPPUP-E7UGY-3XNFH-RWK95>





Certificado

Certificamos que o resumo intitulado **INTERAÇÕES ENTRE OS GENES PTEN, TP53, RB1 E A FUSÃO TMPRSS2-ERG NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE PRÓSTATA** de autoria de **FRANCISCO CESAR DE SOUSA E SILVA, CAMILA MORAIS MELO E JEREMY ANDREW SQUIRE** foi aprovado para compor os anais do I Congresso Brasileiro On-line de Atualização em Genética, realizado no período de 14 a 17 de fevereiro de 2022. Os anais estão registrado com ISBN 978-65-88884-14-0.

Lavras/MG, 28 de junho de 2023.

Prof. Jocilene dos Santos Pereira
Coordenadora do evento

Dr. Vandergue Santos Pereira
Coordenador do Instituto Multiprofissional de Ensino

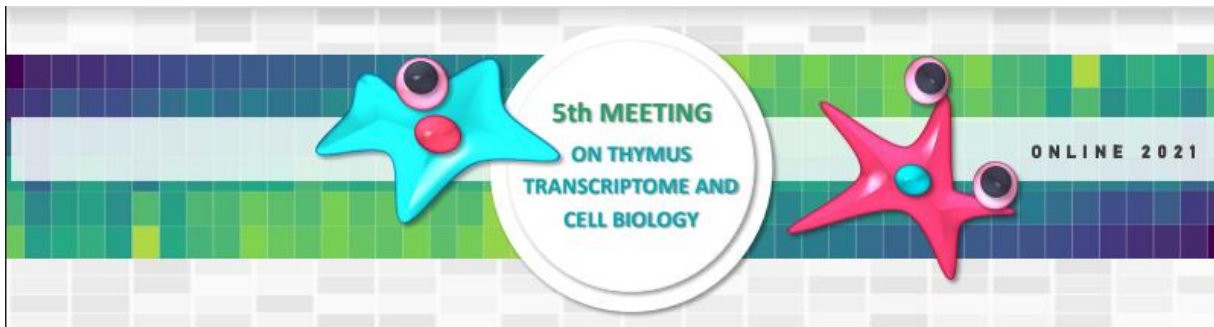


CÓDIGO DO CERTIFICADO: XGU4P-FGXX6-1WWED-EP373

VERIFIQUE AUTENTICIDADE EM: <https://ime.events/certificado/validar/XGU4P-FGXX6-1WWED-EP373>



- *5th Meeting on Thymus Transcriptome and Cell Biology*



Certificate

I Certify hereby **Francisco César de Sousa e Silva** that attended to the Online the **Fifth Meeting on Thymus Transcriptome and Cell Biology** a joint initiative of the Molecular Immunogenetics Group, University of São Paulo at Ribeirão Preto, SP, and the Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, on September 20, 2021. Participation 6/9 hours.

Geraldo Aleixo Passos

Geraldo Aleixo Passos



- *Virtual Annual Meeting I*



615 Chestnut Street | 17th Floor
Philadelphia, PA 19106-4404
215-440-9300 | 215-440-9313 Fax
www.AACR.org | @AACR | facebook.com/AACR.org

**2020 Virtual Annual Meeting: Selected Presentations
Monday April 27, 2020 through Tuesday April 28, 2020**

Certificate of Participation

Registrant Details:

Sir Francisco de souza e silva
Graduado
Ribeirão Preto, São Paulo 1405673
Brazil

Dear Sir Francisco de souza e silva,

It was our pleasure to have you participate in the AACR Virtual Annual Meeting I 2020, which was held online on April 27–April 28, 2020. We hope that you found the conference sessions to be valuable to your future research efforts. We appreciate your participation in this first ever virtual meeting. We hope you will join us again in the future.

We look forward to your participation in Virtual Meeting II scheduled for June 22–24 and to seeing you in Washington DC in 2021!

Sincerely,

Margaret Foti, Ph. D., M.D. (h.c.)
Chief Executive Officer

- *Virtual Annual Meeting II*



615 Chestnut Street | 17th Floor
Philadelphia, PA 19106-4404
215-440-9300 | 215-440-9313 Fax
www.AACR.org | @AACR | facebook.com/AACR.org

2020 Virtual Annual Meeting II
Monday June 22, 2020 through Wednesday June 24, 2020

Certificate of Participation

Registrant Details:

Sir Francisco de Sousa e Silva
Graduado
rua antonio teixeira de azevedo, 900
Ribeirão Preto 14056-723
Brazil

Dear Sir Francisco de Sousa e Silva,

It was our pleasure to have you participate in the AACR Virtual Annual Meeting II 2020, which was held online on June 22 - 24, 2020. We hope that you found the conference sessions to be valuable to your future research efforts. We appreciate your participation in the AACR's second virtual meeting. We hope you will join us again in the future.

We look forward to seeing you in Washington DC in 2021!

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Margaret Foti', is written in a cursive style.

Margaret Foti, Ph. D., M.D. (h.c.)
Chief Executive Officer