



**PUC** GOIÁS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA  
NÚCLEO DE PESQUISAS REPLICON

**ALTERAÇÕES GENÔMICAS NO GENE *PTEN* EM PACIENTES COM  
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA EM GOIÂNIA**

**Goiânia, fevereiro de 2014.**



**PUC GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA  
NÚCLEO DE PESQUISAS REPLICON

**ALTERAÇÕES GENÔMICAS NO GENE *PTEN* EM PACIENTES COM  
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA EM GOIÂNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**Mestranda:** Thalita Marra Rosa

**Orientador:** Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD

**Co-orientador:** Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva

**Goiânia, fevereiro de 2014.**

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)  
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

Rosa, Thalita Marra.  
R788a Alterações genômicas no gene PTEN em pacientes com  
adenocarcinoma de próstata em Goiânia [manuscrito] / Thalita  
Marra Rosa. – 2014.  
68 f. ; il. ; graf. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de  
Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2014.  
“Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz”.  
Bibliografia.

1. Próstata – Câncer. I. Título.

CDU 616.65-006.6(043)



**PUC  
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

Av. Universitária, 1069 ● Setor Universitário  
Caixa Postal 86 ● CEP 74605-010  
Goiânia ● Goiás ● Brasil  
Fone: (62) 3946.1021 ● Fax: (62) 3946.1397  
www.pucgoias.edu.br ● prograd@pucgoias.edu.br

**ATA COMPLEMENTAR Nº 80/2014**

**MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**DISCENTE: THALITA MARRA ROSA**

DEFENDIDA EM 19 DE FEVEREIRO DE 2014 E APROVADA COM CONCEITO...A.....

O título foi alterado ( ) não (  ) sim Alterações genômicas do gene pten em pacientes com adenocarcinoma prostático em Goiânia

**BANCA EXAMINADORA**

.....  
*apense*  
Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz  
(presidente-orientador)

.....  
*Daniela de Melo e Silva*  
Profª. Dra. Daniela de Melo e Silva / PUC Goiás  
(membro interno)

.....  
*Adriano Augusto Peclat de Paula*  
Prof. Dr. Adriano Augusto Peclat de Paula / HAJ  
(membro externo)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me propiciado saúde, perseverança e dedicação para realizar objetivos atuais e futuros sonhos e principalmente à minha família que tanto me apoiou nas minhas decisões e no meu cotidiano.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás pela bolsa de Mestrado, que possibilitou a realização desse estudo e ao Professor **Dr. Cláudio Carlos da Silva**, Diretor do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, pelo apoio profissional.

Ao grupo do Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás por propiciar o ambiente e os materiais necessários para desenvolver esse estudo.

Em especial ao meu orientador, **Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz** pela oportunidade de fazer parte do Núcleo de Pesquisa Replicon, por desenvolver o projeto e pela confiança de poder realizá-lo.

Aos funcionários do Hospital Araújo Jorge pelo apoio e disponibilidade de tempo para confeccionar as lâminas, em especial a **Karla Cordeiro Ferreira** e ao **Dr. Adriano Augusto Peclat de Paula** e a **Dr<sup>a</sup> Eliane Duarte Mota**.

Aos biólogos, **Aldaires Vieira de Melo**, **Damiana Mirian da Cruz e Cunha**, **Camila Akemi**, **Juliana Ferreira** e **Cristiano Luiz Ribeiro** pela disposição na elaboração e desenvolvimento deste estudo.

Aos membros da banca avaliadora, **Professora Daniela de Melo Silva**, **Professor Cláudio Carlos da Silva** e **Professor Dr. Adriano Augusto Peclat de Paula** pela participação na banca examinadora e pela avaliação desta dissertação.

A todos os professores e amigos, a todos aqueles que contribuíram na realização e conclusão deste trabalho, eterna gratidão e reconhecimento.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Próstata.....	15
2.2 Adenocarcinoma de próstata (CaP).....	16
2.3 Incidência de Câncer de Próstata.....	19
2.4 Diagnóstico do Câncer de Próstata.....	21
2.5 Fatores de Risco para o CaP.....	25
2.6 Classificação do Câncer de Próstata.....	26
2.7 Gene <i>PTEN</i> .....	28
2.8 FISH - <i>Fluorescence in situ hybridization</i> .....	31
3. OBJETIVOS.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÃO.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
9. APÊNDICE.....	60
10. ANEXO.....	63

## RESUMO

O uso de marcadores moleculares tem contribuído para a identificação de genes e alterações cromossômicas em diferentes estágios de uma dada doença podendo resultar em um enorme avanço na determinação de sua fisiopatologia. A presente proposta de estudo centra sua atenção em tornar mais acessíveis e compreensíveis para os médicos e para os pacientes as ferramentas laboratoriais de diagnóstico do câncer de próstata e socializá-las na promoção da saúde. O objetivo do presente estudo foi compreender como perda/ganho genômico de *PTEN* se associa com o câncer de próstata. As alterações do gene *PTEN* foram avaliadas em 38 casos de pacientes com câncer de próstata e os sinais fluorescentes para cada sonda foram contados em 100 núcleos interfásicos por lâmina, não sobrepostos e intactos. A ocorrência das alterações genômicas de *PTEN* foram examinadas e classificadas em homozigose, hemizigose, monossomia, ganho e perda de regiões do cromossomo 10. O estudo demonstrou um alto índice de alterações do tipo monossômica, 76,3% dos casos, e deleções do tipo hemizigose para 21,1% sendo que a porcentagem de ganho do cromossomo 10 foi de 2,6%. No grupo de pacientes avaliados, 5,2% eram do tipo hereditário, 36,8% familiares e 57,9% esporádicos e para todas essas classificações foi possível encontrar alterações no gene *PTEN*. Os resultados do presente estudo indicam que alterações do gene *PTEN* do tipo homozigose, hemizigose, monossomia e ganho podem ser observadas em pacientes com carcinoma prostático esporádico, familiar ou hereditário. Ao avaliar e comparar a variável tabagismo e as alterações no gene *PTEN* pode-se observar um alto índice de alterações nos pacientes fumantes, sendo que quem fuma tem 5,7 vezes mais chances de sofrer alterações do tipo monossômicas ( $p= 0,0495$ ), evidenciando uma associação significativamente entre fumantes e alterações monossômicas. Não houve associação estatisticamente significativa quando se comparou os pacientes etilistas com alterações no *PTEN* ( $p= 0,52$ ), níveis de PSA x *PTEN* ( $p= 0,58$ ) e PSA x idade ( $p= 0,68$ ). A técnica de FISH possibilitou a análise das alterações de forma clara e eficaz, evidenciando a confiabilidade desta técnica quanto à leitura dos sinais de fluorescência em cada célula.

**Palavras-chave:** *PTEN*, FISH, próstata e adenocarcinoma.

## ABSTRACT

The use of molecular markers has contributed to the identification of genes and chromosomal alterations in different stages of a given disease can result in a huge breakthrough in determining its pathophysiology. The proposed study focuses his attention on becoming more accessible and understandable for doctors and patients to laboratory diagnostic tools for prostate cancer and socialize them in health promotion. The aim of this study was to understand how loss / gain genomic *PTEN* is associated with prostate cancer. Changes of the *PTEN* gene were evaluated in 38 cases of patients with prostate cancer and the fluorescent signals for each probe were counted in 100 interphase nuclei per slide, no overlapping and intact. The occurrence of genomic alterations in *PTEN* were examined and classified as homozygous , hemizigose , monosomy, gain and loss regions of chromosome 10. The study demonstrated a high rate of monosomic alterations, 76.3% of cases, and hemizigose deletions represented 21.1%, while the gain of chromosome 10 was 2.6%. In the group of patients, 5.2% were hereditary, 36.8% were sporadic and 57.9% family and for all these groups we found alterations in the *PTEN* gene. The results of this study indicate that homozygous, hemizigose, monosomy and gain of *PTEN* gene can be observed in patients with sporadic, familial or hereditary prostate carcinoma. To evaluate and compare the variable smoking and changes in the *PTEN* gene, we observed a high rate of change in smokers , and who smoke have up to 5.7 times to acquire monosomic alterations (  $p = 0.0495$  ) , showing a significant association between smoking and monosomic alterations. There was no statistically significant association when comparing drinkers patients with alterations in *PTEN* ( $p = 0.52$  ) , PSA levels x *PTEN* (  $p = 0.58$  ) and PSA x age (  $p = 0.68$  ). The FISH tool allowed the analysis clearly and effectively of the alterations, demonstrating the reliability of this technique for reading the fluorescent signs in each cell.

**Keywords:** *PTEN*, FISH, prostate and adenocarcinoma.



**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**CaP:** Câncer de Próstata

**EG:** Escore de Gleason

**FISH:** do ingles *Fluorescence in situ hybridization*

**HAJ:** Hospital Araújo Jorge

**HPB:** Hiperplasia Prostática Benigna

**HPC:** Câncer de próstata hereditário

**INCA:** Instituto Nacional do Câncer

**MVI:** Invasão Microvascular

**PIN:** Neoplasia Intraepiteliais Prostáticas

**PSA:** Antígeno Específico da Próstata

**PSADT:** *PSA doubling-time*

**PTEN:** *Phosphatase tensin homologue*

**PR:** Prostatectomia Radical

**TNM:** Sistema de Classificação dos Tumores Malignos

**TCLE:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Corte transversal da próstata. Coloração em HE. 180x Fonte: Adaptada ATLAS DE HISTOLOGIA DI FIORE.....	05
<b>Figura 2.</b>	Desenho esquemático do processo de desenvolvimento do câncer. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER.....	07
<b>Figura 3.</b>	Incidência de câncer de próstata nas regiões brasileiras. Fonte: Adaptada de INCA 2014. ....	10
<b>Figura 4.</b>	Gene <i>PTEN</i> localizado no cromossomo 10 Fonte: Adaptado de SONG <i>et al.</i> , 2012.....	18
<b>Figura 5.</b>	Representação esquemática de mutações germinativas no gene <i>PTEN</i> . Fonte: Adaptada de VIROLLE <i>et al.</i> , 2001; STAMBOLIC <i>et al.</i> , 2001; ZHOU <i>et al.</i> , 2003; PEZZOLESI <i>et al.</i> , 2007.....	19
<b>Figura 6.</b>	Esquema da técnica FISH. Fonte: Adaptada de O'CONNOR, C. 2008.....	21
<b>Figura 7.</b>	Ensaio de quatro cores para avaliação citogenética do gene <i>PTEN</i> (Del-TECT CymoGenDx). Fonte: Adaptada do catálogo Del-TECT CymoGenDx, 2012.....	25
<b>Figura 8.</b>	Esquema representativo dos quatro sinais observados nas células glandulares diploides hemizigota e homozigota microscópio para contagem dos sinais.....	26
<b>Figura 9.</b>	Esquema representativo dos quatro sinais observados nas células glandulares com ganho e perda do cromossomo 10 microscópio para contagem dos sinais.....	27
<b>Figura 10.</b>	Análise por FISH para detectar alterações no gene <i>PTEN</i> de amostras de câncer de próstata.....	28
<b>Figura 11.</b>	Alterações citogenético-moleculares em núcleos interfásicos de pacientes com adenocarcinoma prostático. Fonte: Núcleo de Pesquisas epicon/PUCGO.....	30
<b>Figura 12.</b>	Quantidade de casos (total de 38 pacientes) com CaP Hereditário, Familiar e Esporádico.....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária.....	09
<b>Tabela 2.</b>	Valor do Antígeno Prostático Específico (PSA) e risco de câncer de próstata, em pacientes com toque prostático suspeito.....	11
<b>Tabela 3.</b>	História familiar e o risco de desenvolver o CaP.....	15
<b>Tabela 4.</b>	Hábitos de vida e dados clínico-patológicos dos casos participantes da análise de alterações no gene <i>PTEN</i> , subdivididos de acordo com a classificação do câncer de próstata em esporádico, familiar e hereditário de Goiânia.....	27
<b>Tabela 5.</b>	Frequência relativa de alterações no gene <i>PTEN</i> dos pacientes analisados por FISH em adenocarcinoma de próstata.....	28
<b>Tabela 6.</b>	Informações anatopatológicas contidas no prontuário de cada paciente .....	29

## 1. INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula exócrina do sistema reprodutor masculino, localizada anteriormente ao reto e inferiormente à bexiga, circundando parte da uretra. Ela produz e secreta o líquido prostático, uma secreção de pH alcalino que facilita a locomoção dos espermatozoides e que, ao se juntar com a secreção das vesículas seminais e com os espermatozoides na uretra, forma o sêmen. A próstata nos humanos consiste de ácinos e ductos compostos por uma única camada de células epiteliais secretoras cercadas por uma camada contínua de células basais sobre uma membrana basal. Ao redor da glândula há um estroma formado por fibroblastos, músculo liso, nervos e vasos linfáticos. O estroma produz fatores de crescimento importantes para o desenvolvimento da próstata normal como também do câncer de próstata (CHUNG, 1995; WARE, 1993).

Algumas alterações da próstata podem acometer indivíduos adultos, gerando doenças clinicamente importantes como a prostatite, à hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP). A prostatite caracteriza-se pela inflamação da glândula geralmente causada por agentes infecciosos. Esta condição é frequentemente acompanhada de desconforto, dor ao urinar e, às vezes, febre. A HPB corresponde ao aumento do volume da próstata, que pode causar transtornos urinários aos pacientes. A HPB possui uma taxa de incidência elevada em homens a partir dos 50 anos e corresponde a uma das principais patologias urológicas. HPB não é considerada uma lesão pré-maligna (LEE *et al.*, 1995). O CaP, por sua vez, corresponde a alterações malignas nas células prostáticas e sua evolução pode levar à morte, no entanto, a doença pode ser curável se for detectada precocemente ( NELSON *et al.*, 2003).

Assim como em outros tumores, a patogênese do CaP reflete tanto a participação de fatores genéticos, incluindo um componente hereditário, quanto ambientais. Entre os fatores que estão associados a um maior risco de desenvolvimento do CaP estão a idade avançada, o histórico da doença na família, fatores ambientais, etnia e dieta (DEUTSCH *et al.*, 2004).

As estimativas para o ano de 2014 apontam para cerca de 217 mil casos nos Estados Unidos e mais de 68 mil pacientes no Brasil podem ser diagnosticados com CaP. Para o Estado de Goiás foram estimadas mais de 1.300 casos novos de CaP, sendo que cerca de 350 destes casos estão previstos para ocorrer na capital. De um modo geral, o risco relativo de um homem desenvolver um CaP durante a vida é de 1/6 (Brasil, INCA, 2014).

Apesar da sua alta incidência, a mortalidade por CaP é relativamente baixa. Estão previstos cerca de 32 mil óbitos nos Estados Unidos e de 13.129 óbitos no Brasil, em 2014. A justificativa para a baixa mortalidade é decorrente da alta taxa de cura dos casos iniciais e, também, um comportamento relativamente pouco agressivo da grande maioria dos CaP. Embora exista uma grande variedade de CaP, com uma pequena parcela responsável por lesões de rápida progressão e elevado risco de óbito pela doença (ABDO *et al.*, 2006).

O principal fator de risco para o desenvolvimento do CaP é, indiscutivelmente, a idade, que se relaciona positivamente com a ocorrência da doença. Estimativas mundiais indicam que aos cinquenta anos de idade cerca de 30% dos homens são acometidos pelo CaP. Após os 80 anos, cerca de 85% dos homens desenvolvem o CaP. Um outro fator importante de risco para o CaP refere-se à etnia, sendo mais frequente em negros. Os afro-descendentes têm um risco até 10 vezes maior que outras etnias. Outros fatores de risco relevantes para o CaP incluem o histórico familiar, a dieta pobre em fibras e rica em gordura e o tabagismo (GOMES *et al.*, 2008).

O CaP hereditário representa cerca de 2% dos tumores malignos da próstata. Entretanto, o histórico familiar aumenta em 80% o risco de desenvolver CaP, que em geral tem ocorrência precoce. A biologia do tumor e os eventos genéticos subjacentes ao desenvolvimento do CaP familiar ainda requerem investigação. O CaP pode passar despercebido, sem que um paciente note qualquer alteração ou sintoma associado a doença (COSTA, 1997; CORRÊA *et al.*, 2003; GARÓFOLO *et al.*, 2004; INCA, 2008). Por outro lado, um paciente pode ter dificuldade, dor, miccional ou notar uma alta frequência urinária noturna

(noctúria). Em casos avançados, a doença pode metastatizar para os ossos provocando dor e emagrecimento, podendo levar à morte.

Em relação à conduta preventiva, existem dois exames que devem ser realizados anualmente em todos os homens após os 50 anos de idade: a dosagem do PSA – Antígeno Específico da Próstata, avaliado bioquimicamente no soro, e o exame do toque retal. Os homens negros e/ou os com histórico familiar devem seguir esse protocolo de procedimentos a partir dos 45 anos de idade.

A confirmação do diagnóstico de CaP é feita mediante o resultado histopatológico do tecido prostático, obtido por biópsia da glândula. Somente são submetidos à biópsia, homens que apresentarem alterações no exame de PSA e ou no toque retal (GERBER *et al.*, 1995). O prognóstico do CaP depende de três fatores: diferenciação tumoral - definido pelo Score de Gleason; estágio clínico - definido pelo TNM; e nível de PSA ao diagnóstico.

Considera-se um paciente com bom prognóstico quando o Score de Gleason <7, PSA <10ng/mL e de tumores até T2c (tumor confinado à próstata). No polo oposto encontra-se Gleason >8, PSA > 20 ng/mL e T4. Mesmo os casos metastáticos podem cursar com sobrevida prolongada mediante tratamento hormonal com bloqueio androgênico (CORRÊA *et al.*, 2003).

A chance de cura para os casos diagnosticados precocemente é boa, ultrapassando 90% de sucesso. Segundo dados do CAPSURE (*Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor*), existem diferentes modalidades utilizadas para o tratamento do CaP, prostatectomia radical, braquiterapia, radioterapia externa e observação, além de outros.

Uma alternativa ao tratamento é a vigilância ativa, que consiste em monitorar os pacientes em intervalos de tempo menores usando-se exames bioquímicos, histológicos e avaliação clínica. Nesta opção, o tratamento seria iniciado apenas após a identificação de alguma progressão da doença e a qualidade de vida do paciente não seria prejudicada por tratamentos desnecessários. O grande desafio neste cenário é justamente identificar os pacientes com pior prognóstico, que apresentariam uma progressão

precocemente da doença, os quais precisariam de tratamento desde o início, ou o quanto antes (CORRÊA *et al.*, 2003; REGGIO, 2005).

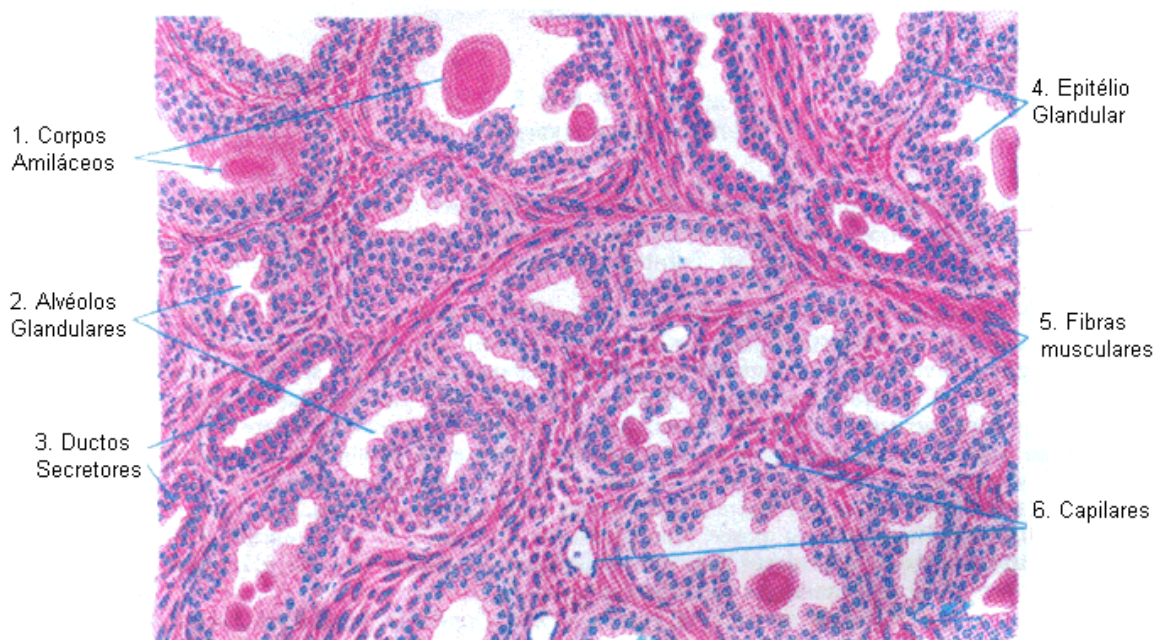
Os marcadores genéticos podem fornecer informações importantes, que não podem ser identificadas pelos exames tradicionais utilizados atualmente. Dentre os marcadores genéticos, um em especial foi observado no câncer de próstata na década passada, sendo confirmado em diversos estudos recentes. Trata-se da perda de um gene cuja função como supressor tumoral é amplamente conhecida como o *PTEN*, do inglês *Phosphatase tensin homologue*.

A perda do gene *PTEN* causa alterações no controle da divisão, sobrevivência e metabolismo celular. Desta forma, a célula tumoral apresenta maior índice de proliferação e de sobrevivência do que as células normais (MAKRIDAKIS, 2001). Pacientes com câncer de próstata e deleção de *PTEN* (uma ou as duas cópias perdidas) apresentam pior prognóstico. Além disso, a alteração genética do tumor está estreitamente relacionada à recorrência bioquímica em curto prazo, identificada pelo PSA.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Próstata

A próstata é um órgão glandular e fibromuscular, no interior da cavidade pélvica, localizada na parte inferior do abdômen e exclusivamente masculina e que se localiza na parte inferior do abdômen. Sob o ponto de vista anatômico, a próstata é formada por três zonas glandulares e pelo estroma fibromuscular (Figura 01) (ZERAT *et al.*, 2010). A zona de transição envolve a uretra prostática proximal e compreende 5% do tecido glandular. A maioria das Hiperplasias Prostáticas Benignas (HPB), também denominadas Hiperplasias Nodulares da Próstata (HNP), e cerca de 20% dos cânceres de próstata (CaP) ocorrem nessa área.



**Figura 01.** Corte transversal da próstata, em coloração em HE com aumento de 180x.

Fonte: Adaptada ATLAS DE HISTOLOGIA DI FIORE

A zona central representa aproximadamente 20-25% da massa glandular total da próstata e se encontra envolvendo os ductos ejaculatórios.



Aproximadamente 5 a 10% dos CaP estão localizados nessa região prostática. A zona periférica é a de maior tamanho, situada posterior e lateralmente na glândula. A maioria (70%) dos CaP e as Neoplasias Intraepiteliais Prostáticas (PIN) ocorrem nesta área. O estroma fibromuscular ocupa a superfície anterior da próstata e é constituído principalmente de músculo liso (NETTER, *et al.*, 2000).

A próstata é composta histologicamente por glândulas túbulo-alveolares organizadas em lóbulos envolvidos por um estroma, contidos dentro da cápsula prostática, sendo dividida em quatro zonas glandulares: periférica, transicional, central e periuretral (MCNEAL *et al.*, 2009). As glândulas são constituídas por ácinos e ductos prostáticos, formados por um epitélio glandular composto por duas camadas celulares: basal e secretora. Os ácinos e os ductos estão imersos em uma matriz estromal, tecido fibromuscular, vascular e conectivo, sendo possível observar dois tipos celulares dentro do estroma, o miofibroblasto e as células musculares lisas.

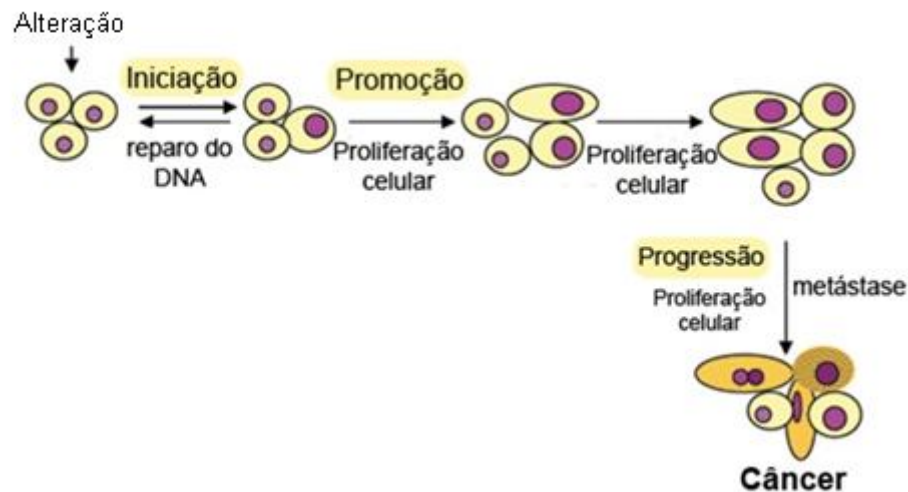
A camada basal do epitélio glandular é formada por uma ou duas camadas de células basais localizadas entre a membrana basal e a camada de células secretoras que por sua vez é formada por uma camada de células colunares que se projetam para o lúmen glandular. A principal diferença entre essas duas camadas celulares se refere à expressão do Antígeno Prostático Específico (PSA) e da fosfatase ácida que ocorre apenas nas células secretoras glandulares. A expressão do receptor de andrógenos ocorre nestas duas camadas celulares, que se encontram significativamente aumentadas nas células secretoras. Outra diferença que pode ser observada entre estas duas camadas de células é a expressão de determinadas citoqueratinas, indicativa do grau de diferenciação das células epiteliais (ALBERTI *et al.*, 2000).

## 2.2 Adenocarcinoma de próstata (CaP)

Câncer é o nome dado a um conjunto complexo de mais de uma centena de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, as células cancerosas tendem a ser muito agressivas e de crescimento incontrolável que determina a formação de tumores devido ao acúmulo de células. Na literatura especializada, este fenômeno é conhecido pelo termo neoplasia maligna. Por outro lado, um tumor benigno significa a existência de uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, cujo crescimento é geralmente contido em uma cápsula fibrosa (Brasil, INCA, 2013).

Segundo o Ministério da Saúde (2011), o processo de carcinogênese, com capacidade de gerar metástase, em geral, se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor. No primeiro estágio da carcinogênese, chamado iniciação, as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos que provocam modificações em alguns de seus genes (figura 02).

Nesta fase as células se encontram geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente. Encontram-se preparadas, ou seja, iniciadas para a ação de um segundo grupo de agentes que atuará no próximo estágio. No segundo estágio da carcinogênese as células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor (Brasil, INCA, 2009).



**Figura 02:** Desenho esquemático do processo de desenvolvimento do câncer.  
 Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2011). INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER.

A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas. Já o terceiro estágio, quando em progressão, se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O câncer é classificado de acordo com o tipo de célula normal que o originou. Essa classificação é dividida em epitelial e mesenquimal, sendo carcinoma, sarcoma, linfomas, leucemia, mielomas, tumores de células germinativas, melanomas, gliomas e neuroblastomas (FOYE *et al.*, 1996). Os carcinomas são os tipos mais comuns de câncer, originando-se em células de revestimento do corpo, podendo ser endodermis ou ectodermis. Os sarcomas se originam em tecidos suportes como ossos, tecido gorduroso, músculo e tecido fibroso. Os linfomas se originam em células chamadas linfócitos, podendo ser encontradas em todo o organismo. As leucemias originam-se em células da medula óssea, na qual ocorrem anomalias funcionais nessas células, além da

diminuição da produção de novas células. Os mielomas são caracterizados por malignidades nas células plasmáticas da medula óssea que produzem os anticorpos. Os tumores de células germinativas desenvolvem-se a partir de células embrionárias dos ovários e dos testículos. O melanoma origina-se em células que produzem o pigmento da pele chamada melanócitos. O glioma origina-se a partir de células do tecido de suporte cerebral ou da medula espinhal. Já o neuroblastoma é um tumor geralmente pediátrico devido ao fato de se desenvolver em células embrionárias (Brasil, INCA, 2013).

O CaP é comumente subdividido de acordo com os sítios de origem, podendo ser acinar e de ducto proximal, chamado adenocarcinoma ou carcinoma mucinoso, ou de ducto distal, carcinoma de célula transicional, carcinoma de célula escamosa, carcinoma ductal com características endometrióides (HANKS *et al.*, 1993). O adenocarcinoma corresponde a 95% das neoplasias malignas da próstata, comprometendo em especial a zona periférica da glândula, constituindo uma variante histológica com comportamento biológico e perfil genético molecular distinto (BOSTWICK e DUNDRE, 1997).

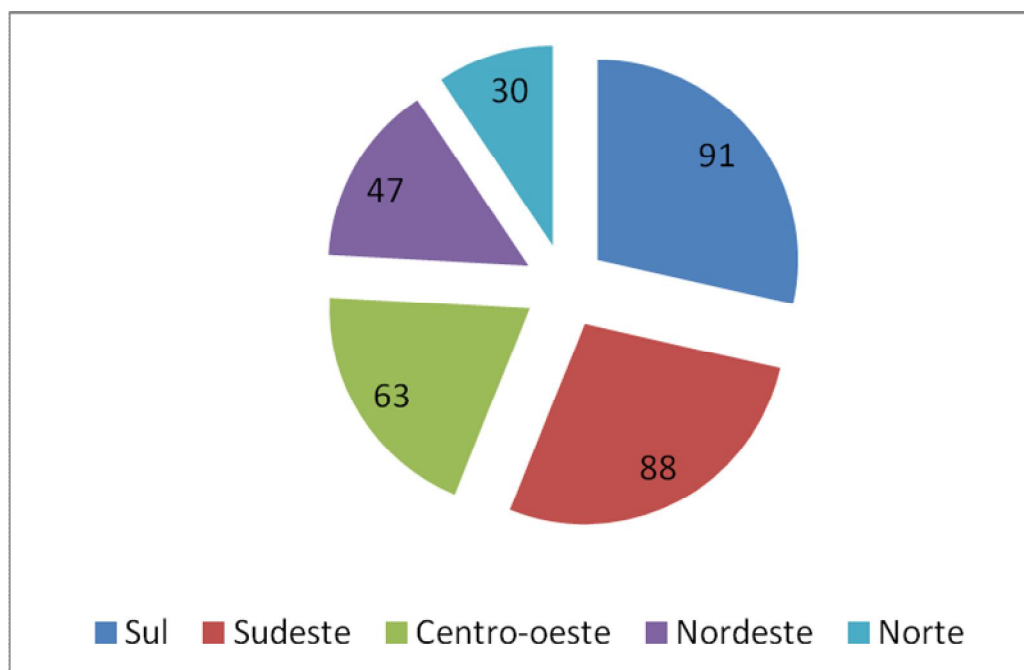
O carcinoma de próstata constitui, conforme Robbins (2001), a forma mais comum de câncer no sexo masculino, considerado a segunda causa principal de morte por câncer em homens. Sua frequência aumenta geralmente com a idade devendo ser diagnosticado precocemente (PEREZ, 2002).

### **2.3 Incidência de Câncer de Próstata**

Estudos epidemiológicos atuais apontam para um crescimento das taxas de incidência do câncer de próstata em todas as partes do mundo. Isso pode estar relacionado a um incremento na eficiência dos programas de rastreamento, ao amplo emprego do antígeno prostático específico (PSA) e ao aumento da longevidade, especialmente relacionada à redução da taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares e, talvez, a influência de fatores ambientais, dietéticos ou outros ainda não identificados ou não satisfatoriamente elucidados (GRONBERG, 2003).

O adenocarcinoma de próstata é o tumor maligno de maior incidência entre os homens nos Estados Unidos, estima-se que 1:6 homens desenvolvam a doença. Cerca de aproximadamente 200.000 novos casos são diagnosticados todo ano. Esta patologia é a segunda principal causa de morte por câncer em homens, com uma mortalidade anual avaliada em 38.000 óbitos, tendo um impacto relevante sobre a morbidade e a mortalidade na população masculina norte-americana a partir da meia-idade (ABDO *et al.*, 2006).

Dados do INCA (2014) mostram que o número de novos casos diagnosticados de CaP no mundo é de aproximadamente 580 mil por ano (Tabela 1). No Brasil, a maior incidência de CaP ocorre na região Sul, com 91 casos a cada 100 mil habitantes, seguida por Sudeste (88/100mil); Centro-Oeste (63/100 mil); Nordeste (47/100 mil); e Norte (30/100 mil) (Figura 03).



**Figura 03:** Incidência de câncer de próstata nas regiões brasileiras.  
Fonte: Adaptada de INCA 2014.

**TABELA 1.** Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo a localização primária.

Localização Primária	Estimativa dos Casos Novos			
	Homens			
	Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Neoplasia Maligna				
Próstata	60,2	62,5	15,7	75,3
Tumores Hematológicos	9,8	10,2	2,7	13,5
Glândula Tireoide	-	-	-	-
Sistema Nervoso Central	4,8	5,0	1,2	5,8
Pele Melanoma	3,2	3,3	810,0	4,1
Outros*	74,1	77,2	20,3	97,9
Outras Localizações**	43,1	44,8	11,1	53,3
Subtotal	195,2	202,9	51,8	248,6
Pele não Melanoma	62,7	65,2	14,6	70,4
Todas as Neoplasias	257,9	268,0	66,4	318,8

Fonte: Adaptada de INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER.

\*Outros: agrupamento das neoplasias malignas que ocorrerão nos seguintes sítios anatômicos: traqueia, brônquio, pulmão, cólon, reto, estômago, cavidade oral, laringe, bexiga e esôfago.

\*\*Outras localizações: regiões anatômicas não citadas.

## 2.4 Diagnóstico do Câncer de Próstata

O carcinoma de próstata pode não apresentar sintomas clínicos até a instalação de estágios avançados de progressão, que pode limitar as estratégias capazes de detectar precocemente o CaP. Neste sentido, o CaP tem merecido destaque nos desenhos experimentais atualmente propostos. Apesar dos avanços e dos esforços na compreensão do CaP como agravo à saúde humana, os fatores primários utilizados como indicadores prognósticos do CaP ainda permanecem o estadiamento e o grau histológico do tumor e a concentração do PSA (KOFF *et al.*, 2005).

Quando diagnosticados, os adenocarcinomas de próstata são classificados pelo sistema TNM, que define o estadiamento tumoral, levando em consideração a extensão do tumor primário (T), a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais (N) e a ausência ou presença de

metástase à distância (M) (EPSTEIN *et al.*, 2004). Os adenocarcinomas de próstata também são graduados segundo o sistema de Gleason, que considera a diferenciação histológica observado no tecido neoplásico (EPSTEIN *et al.*, 2004). Este sistema é baseado na soma dos graus dos dois focos neoplásicos mais prevalentes podendo variar de 2 a 10. Tumores com baixos escores de Gleason geralmente são menores em volume e tem baixo potencial metastático, enquanto tumores com altos escores tendem a serem maiores e apresentarem potencial metastático aumentado. O escore de Gleason pré-operatório está relacionado com indicadores importantes de extensão da doença, tais como envolvimento de linfonodos e a ocorrência de metástase à distância (GLEASON, 1977).

Em termos de prognóstico, os Escores de Gleason que variam de 2-4 são classificados como bem diferenciados; de 5-6 como moderadamente diferenciados; 7 como moderadamente para pobremente diferenciados; e de 8-10 como pobremente diferenciados. Um escore 7 de Gleason pode, além disso, ser sub-classificado em [3+4] ou [4+3], sendo que um pior prognóstico está associado com a variante [4+3]. A graduação de Gleason é uma variável clínica importante, pois afeta a decisão acerca do tratamento (DEMARZO *et al.*, 2003).

A detecção de um câncer de próstata ainda é dependente dos níveis séricos do PSA. Contudo, PSA > 4,0 ng/mL tem sido utilizado em muitos estudos. Em homens entre 50-66 anos, a detecção do câncer de próstata foi de 13,2% no intervalo de PSA entre 3-4 ng/mL, e a maioria desses cânceres foi julgada clinicamente significativa. Dados estatisticamente representativos ainda não estão disponíveis para que se possam fazer recomendações definitivas sobre o nível ótimo de PSA para detectar cânceres de próstata clinicamente significativos (LODDING *et al.*, 1998).

Atualmente são consideradas as modificações do valor do PSA sérico, que podem melhorar a especificidade do exame na detecção precoce do câncer de próstata. Assim, além da concentração do PSA, as variáveis densidades do PSA, densidade do PSA da zona de transição, valores e referência para a idade, formas moleculares do PSA, velocidade do PSA, tempo de duplicação do PSA

podem ser usadas para apoiar as tomadas de decisões dos pacientes e da equipe médica assistente (ZLOTTA *et al.*, 1997). As modificações do PSA podem ajudar a distinguir entre o câncer de próstata e as lesões prostática benignas, particularmente na faixa intermediária de PSA que pode variar de 4 a 10 ng/mL. Entretanto, ainda não há consenso universal sobre a forma de aplicação e da conduta mediante a incorporação das informações da modificação do PSA na prática clínica (SCHMID *et al.*, 1993).

Segundo Carvalho (1999) e Catalona (1994) e colaboradores, as concentrações do PSA variam de 0 a 10ng/mL, sendo que de 0-1 o valor preditivo para o CaP é de 2 a 8,5%, concentrações do PSA maiores que 5ng/mL o valor preditivo é de aproximadamente 30% e acima de 10ng/mL a chance de desenvolver o CaP é de 69% (Tabela 2).

**Tabela 2.** Concentrações séricas do PSA e sua relação com o risco relativo de desenvolvimento do câncer de próstata, em pacientes com toque prostático suspeito.

PSA (ng/mL)	VPP para câncer
0-1	2,8-5%
1-2,5	10,5-14%
2,5-4	22-30%
4-10	41%
>10	69%

VPP: valor preditivo positivo.

Após uma prostatectomia radical, os pacientes com CaP normalmente apresentam níveis de PSA próximos a zero. Quando os valores permanecem acima de 0,4 ng/mL, o CaP é enquadrado em um pior prognóstico pois elevação do PSA em pacientes prostatectomizados está associado à progressão da doença metastática. Após uma prostatectomia radical, se o PSA permanecer  $\geq 0,2$  ng/mL, entende-se como evidência de recorrência bioquímica na predição de metástases à distância em pacientes com recorrência local da doença (STEPHENSON *et al.*, 2006).

O PSADT (PSA *doubling-time*) tem se mostrado um método eficiente para aumentar a sensibilidade do PSA em predizer o risco de recorrência da doença



após a cirurgia. A estimativa do PSADT é feita mediante a aplicação de um cálculo que usa regressão linear logarítmica, levando-se em consideração o tempo de duplicação do PSA em meses após a cirurgia. Considera-se que quanto menor o PSADT, maior é a chance de recorrência tumoral (ROBERTS *et al.*, 2001).

Segundo Partin e colaboradores (1997), a combinação das variáveis PSA, TNM e escore de Gleason contribuem significativamente para a predição do estágio patológico, podendo se estimar o risco de recorrência da doença em: baixo, moderado e alto risco, de acordo com as diretrizes estabelecidas pela *National Comprehensive Cancer Network (NCCN - Clinical Practice Guidelines in Oncology, version 02. 2007)*.

Uma característica prognóstica importante de um tumor é a sua capacidade de o tumor invadir as estruturas angiolímfáticas. Esta variável não é abordada pelo sistema TNM. Antunes e colaboradores (2006) avaliaram a relação da invasão microvascular (MVI) com outras características patológicas e sugeriram seu uso como um fator prognóstico independente em pacientes com CaP. Segundo os autores, 11% de 428 pacientes com CaP submetidos a prostatectomia radical apresentaram MVI. Desses, 44,6% apresentaram recorrência enquanto apenas 20,2% dos pacientes sem MVI tiveram recorrência ( $p < 0,001$ ). Além disso, a MVI se mostrou uma característica prognóstica independente da recorrência bioquímica.

Embora os parâmetros clínicos e histológicos sejam úteis na classificação dos tumores prostáticos, eles não são capazes de prever quais cânceres órgão-confinados poderão progredir e quais permanecerão indolentes. Baseado nisso e no fato de que a prostatectomia é um tratamento agressivo e que afeta a qualidade de vida dos pacientes (STANFORD *et al.*, 2000; STEINECK *et al.*, 2002), ainda é necessário identificar e propor marcadores prognósticos que possam discriminar quais carcinomas prostáticos realmente requerem cirurgia ou terapias pós-cirúrgicas.

## 2.5 Fatores de Risco para o CaP

O principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata é a idade. Cerca de 70% dos casos de câncer de próstata são diagnosticados em pacientes com idade superior a 65 anos, sendo apenas 0,1% dos casos diagnosticados antes dos 50 anos de idade. Outro fator de risco importante é a etnia. A mortalidade relacionada ao câncer de próstata é 2,4 vezes maior na população afrodescendente quando comparados à outras etnias (SIDDIQUI, *et al.*, 2006).

Merece destaque outro fator de risco de grande importância no desenvolvimento do CaP, a hereditariedade dos genes. Se um parente de primeiro grau tem a doença, o risco é no mínimo duas vezes maior do indivíduo ter CaP. Se dois ou mais indivíduos da mesma família são afetados, o risco aumenta em 5 a 11 vezes. Porém, a herança do tumor nas famílias parece ser fator prognóstico importante por influenciar negativamente na mortalidade relacionada ao CaP (SIDDIQUI, *et al.*, 2006).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, as chances de desenvolver o câncer de próstata dependem dos seguintes fatores: idade, etnias, história familiar, hormônios, dieta e fatores ambientais. A idade é o fator isolado mais importante ligado a esta doença, o risco aumenta consideravelmente após os 50 anos. Em relação à etnia, nos Estados Unidos, o risco é 80% maior entre os afro-americanos em relação aos caucasianos. É muito mais comum em norte-americanos e pessoas do norte da Europa, por exemplo, a Suécia tem uma prevalência de 31% e uma incidência de 0,16%, uma das maiores no mundo todo (HSING *et al.*, 2000).

Observa-se que geralmente os negros americanos são classificados com a maior incidência de câncer de próstata e com formas mais agressivas (RHODEN, *et al.*, 2004). Este estudo contrasta com a incidência de câncer de próstata clinicamente significativo, cuja incidência difere significativamente, dependendo da área geográfica considerada, sendo mais alta nos Estados

Unidos e países nórdicos da Europa, e baixos no sudeste da Ásia (GOLDGAR *et al.*, 1994).

Dentro do fator história familiar, pode-se destacar as mutações no DNA herdadas de um dos pais, o que aumenta o risco de uma pessoa desenvolver o câncer de próstata. Atualmente, estão sendo estudadas mutações de DNAs de certos genes para detecção de possíveis ligações com o câncer de próstata, como por exemplo, os genes *BRCA1* e *BRCA2*, o gene do receptor de andrógeno, *PTEN*, *L RNAase*, e o *CHK2*.

A alimentação também pode estar associada ao aparecimento do câncer, comidas gordurosas, carne vermelha e uma dieta pobre em fibras, estão ligadas a alto risco de desenvolvimento de câncer de próstata (BOSLAND *et al.* 1999). Além da alimentação, o Ministério da Saúde salienta que grande parte das neoplasias está ligada a fatores ambientais, aumentando o risco das pessoas desenvolverem câncer.

## 2.6 Classificação do Câncer de Próstata

Evidências epidemiológicas sugerem que o câncer de próstata apresenta um componente genético e familiar relevante. Nesse contexto e do ponto de vista fenotípico, esta neoplasia é classificada em câncer de próstata esporádico, familiar e hereditário. Os cânceres esporádicos ocorrem em indivíduos com história familiar negativa. O câncer de próstata familiar é definido como a ocorrência dessa condição em um homem com um ou mais familiares de primeiro grau afetados pela doença. Uma parte da população tem câncer de próstata hereditário verdadeiro, definido por três ou mais homens afetados, a ocorrência desta condição em três gerações sucessivas ou, no mínimo, dois familiares de primeiro grau com doença diagnosticada antes dos 55 anos (CARTER, *et al.*, 1992). Se um parente de primeiro grau tem a doença, o risco relativo individual é, no mínimo, duas vezes maior (AUS *et al.*, 2001). Se dois ou mais familiares de primeiro grau são afetados, o risco relativo individual de aumenta 5 a 11 vezes (GRONBERG *et al.*, 1996). A Tabela 3 a seguir evidencia

resumidamente, dentro do agrupamento familiar, as chances relativas e absolutas de se desenvolver o câncer de próstata.

**Tabela 3.** História Familiar e o risco de desenvolver o CaP.

História Familiar	Risco relativo	Risco absoluto (%)
Nenhuma	1	8
Pai ou irmão	2	15
Pai ou irmão afetado < 60 anos	3	20
Câncer de próstata Hereditário	5	35-45

Fonte: Adaptada de AUA *et al.*, 2006.

Segundo Ostrander (2008), estudos epidemiológicos têm demonstrado uma agregação de CaP em algumas famílias. Carpten e colaboradores (2002) relataram em seus estudos que um aparente excesso de casos de CaP nas famílias que apresentavam mutações no gene *BRCA2*. Sendo que, os genes *RNASEL* e *MSR1* são outros candidatos que têm sido implicados na agregação familiar de CaP. Os dois loci codificam para proteínas que desempenham funções críticas na resposta inflamatória a uma variedade ampla de agentes patogênicos de origem infecciosa.

Adicionalmente, a herança de certas variantes de *OGG1*, um gene que codifica para uma enzima capaz de reparar danos genômicos causados por produtos inflamatórios oxidativos, podem modificar o risco de desenvolvimento de CaP, levando ao HPC (XU, 2002). De modo semelhante, o papel de *BRCA2* no reparo do DNA pode explicar a ocorrência de um subgrupo de casos de início precoce da doença e pela história familiar do câncer de próstata.

A classificação do câncer de próstata e seu desenvolvimento pode estar relacionada com as lesões inflamatórias na próstata, conhecida como atrofia inflamatória proliferativa, o que tem sido proposto como a lesão precursora subjacente à Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) e ao CaP (de MARZO, 1999).

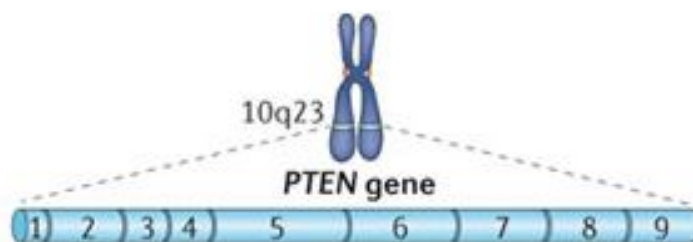
Segundo Yoshimoto e colaboradores (2006), as análises de CaP e das PIN tem demonstrado que deleções genômicas somáticas do gene *PTEN*

correspondem a eventos precoces em lesões PIN. Sendo assim, acredita-se que a agregação familiar de CaP possa estar relacionada com a herança das mutações genéticas, causando uma resposta imune diferenciada para situações de respostas inflamatórias e danos oxidativos que ocorrem na próstata. Nesse caso, lesões PIN podem ser detectadas precocemente em homens jovens das famílias com HPC. Frequentemente, essas lesões PIN são detectadas em amostras de biópsias obtidas a partir de punção aspirativa percutânea da próstata, sendo parte da triagem de rotina dos homens com agrupamento familiar e que apresentem resultados elevados de PSA. Entretanto, atualmente, não é possível determinar se as lesões PIN detectadas tendem a evoluir para CaP ou não.

## 2.7 Gene *PTEN*

Nas últimas décadas, tornou-se possível vislumbrar várias pistas que poderiam levar a um melhor entendimento da biologia da célula tumoral com a introdução de novas tecnologias de sequenciamento do DNA, expressão e análise computacional de genes.

O gene *PTEN* (do inglês, *Encoding Phosphate and Tensin Homologue*) está localizado na região 2 banda 3, próximo ao telômero (LI *et al.*, 1997), sendo considerado um dos supressores tumorais mais estudados, envolvido na regulação do ciclo e proliferação celular, limitação da auto-renovação de células tronco, metabolismo e sobrevivência celular, dentre outras funções (figura 04).



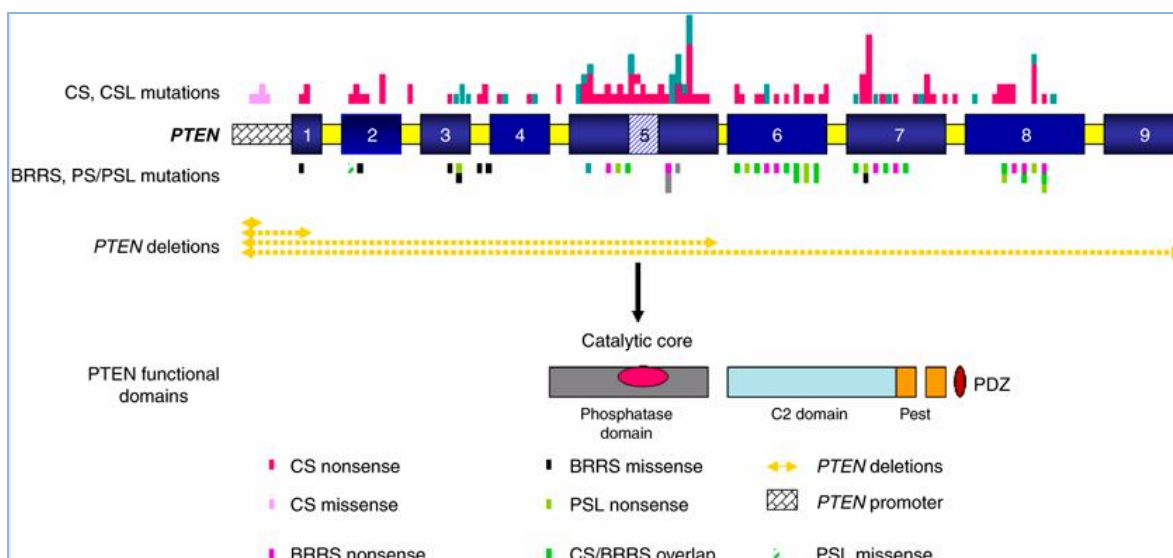
**Figura 04:** Gene *PTEN* localizado no cromossomo 10

Fonte: Adaptado de SONG *et al.*, 2012.

A partir de 1997, alterações genéticas de *PTEN* foram observadas em várias neoplasias, incluindo o câncer de próstata (STEACK *et al.*, 1997). O produto do gene *PTEN* é uma fosfatase lipoprotéica com papel significativo no ciclo celular e apoptose. A função de supressão tumoral do PTEN é dependente da sua atividade de fosfatase lipídica (MYERS *et al.*, 1998).

A proteína PTEN, constituída por 403 aminoácidos, faz parte da grande família de proteínas tirosina-fosfatase (PTP) e apresenta papéis importantes na fisiologia da célula, incluindo regulação, adesão, migração e diferenciação celulares (DI CRISTOFANO & PANDOLFI, 2000). A presença da PTEN mantém os níveis de (3,4,5) – trifosfato de fosfatidilinositol (PIP3) baixos, enquanto que a sua ausência promove o aumento da sinalização de fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K), promovendo a progressão não coordenada do ciclo celular, migração celular e a viabilidade de metástase através da inibição de vários estímulos apoptóticos. A ativação do gene *PTEN* vai depender da disponibilidade intracelular de fosfatidilinositol-3 quinase (DATTA *et al.*, 1999; DI CRISTOFANO & PANDOLFI, 2000).

A proteína é formada por dois principais domínios estruturais: domínio C2 e domínio fosfatase (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006; OKI *et al.*, 2005). O domínio C2 de PTEN tem afinidade lipídica e é responsável pela união da PTEN à membrana plasmática através de mecanismo cálcio-independente (figura 03). A região N-terminal do domínio fosfatase da PTEN se liga ao fosfatidilinositol e a sua região C-terminal se liga a PDZ (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006).



**Figura 05:** Representação esquemática de mutações germinativas no gene *PTEN*.

Fonte: Adaptada de VIROLLE *et al.*, 2001; STAMBOLIC *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2003; PEZZOLESI *et al.*, 2007.

As proteínas PTEN e p53 são importantes supressoras tumorais e estão funcionalmente relacionadas (KOHN; POMMIER, 2005). Estudos mostram que a proteína PTEN está relacionada diretamente ao controle de estabilidade da proteína p53, tanto no mecanismo fosfatase-dependente ao antagonizar a via Akt-Mdm2, quanto no mecanismo fosfatase-independente através da interação direta p53-PTEN (FREEMAN *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2006; MAYO; DONNER, 2001).

O câncer de próstata está associado à translocação e/ou deleções envolvendo a família dos genes *TMPRSS2/ETS*, isso para mutações do tipo somáticas iniciais (TOMLINS *et al.*, 2005).

Pode-se citar também outro evento inicial que ocorrem no desenvolvimento do câncer de próstata como a metilação de *GSTP1*. O gene *GSTP1* codifica a glutationa-S-transferase, que desintoxica muitos compostos conjugando um grupo sulfidril a vários substratos. Esse tipo de metilação do *GSTP1* ocorre em cerca de 90% dos cânceres de próstata. Vários genes participam na regulação do ciclo celular e na sinalização de fatores de crescimento, por exemplo, o *PTEN* e a *p53*, sendo implicados no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata (LEE *et al.*, 1994).

A prevalência das mutações nestes genes varia entre estudos diferentes, sendo que o papel exercido por estes genes no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata ainda precisa ser definido.

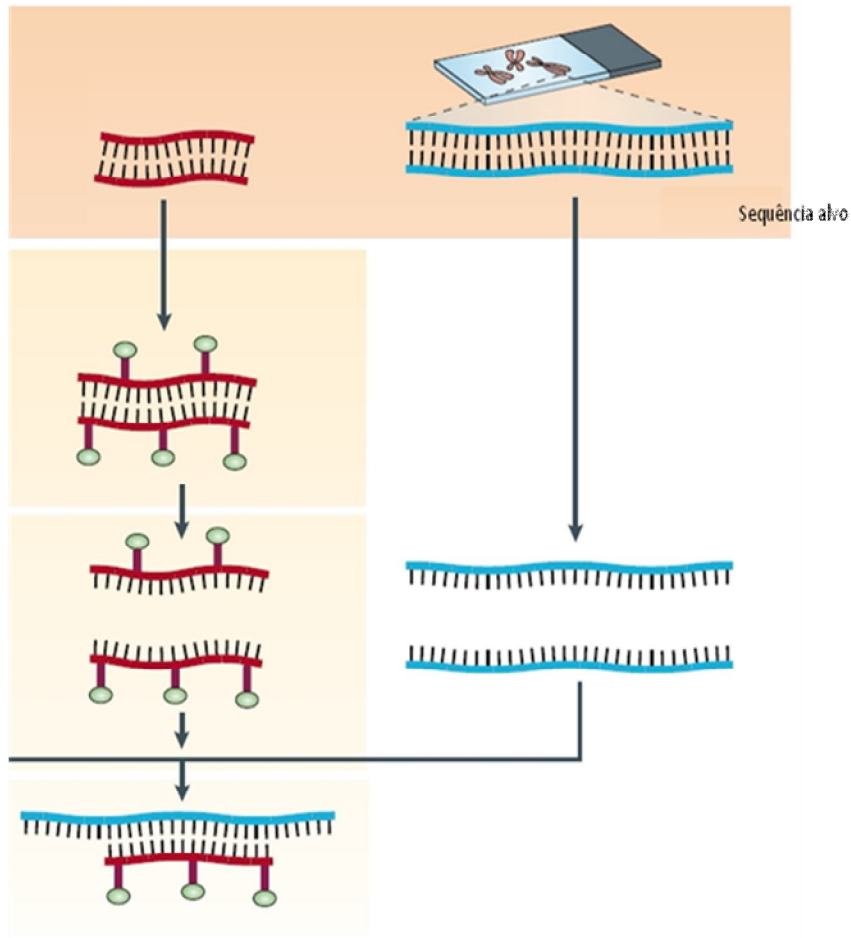
A perda da região cromossômica que contém o gene *PTEN* constitui um achado importante no câncer de próstata primário e metastático, embora não tenham sido encontradas mutações em *PTEN* nas síndromes de câncer de próstata familiares (CAIRNS P. e COONEY KA, 1997). A perda da função do *PTEN* resulta na intensificação da sinalização da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). A perda do *PTEN* pode estar associada à progressão da doença, em vez de a um evento inicial no desenvolvimento do câncer de próstata.

A ocorrência de mutações no gene *PTEN* em CaP é considerado comum, podendo ocorrer entre 30 a 60% (Whang et. al., 1998; Kwabi-Addo et. al., 2001). Dada a alta frequência de inativação do *PTEN* por deleção genômica no câncer de próstata constatada por métodos FISH (do inglês *Fluorescence in situ hybridization*), tornou-se mais prático realizar estudos correlatos muito maiores de evolução do paciente em situações em que o gene de *PTEN* ou está perdida, ou retida em tumores (YOSHIMOTO et al., 2006).

## **2.8 FISH – “*Fluorescence in situ hybridization*”**

O progresso mais importante em citogenética, desde a década de 80, foi o desenvolvimento da tecnologia da hibridização in situ por fluorescência – FISH (do inglês *fluorescence in situ hybridization*). A hibridização in situ tornou possível detectar sequencias específicas de ácidos nucleicos em morfologicamente preservados cromossomos, células e tecidos. Essa tecnologia é baseada na formação duplex, sob condições bem definidas, de um fragmento de ácido nucleico de fita simples modificado (sonda ou probe) e sua sequencia complementar (sequencia alvo) em um espécime biológico fixado (figura 06).





**Figura 06:** Representação esquemática da técnica de FISH.

Fonte: Adaptada de O'CONNOR, C. 2008.

A FISH é utilizada para identificar alterações, com alta resolução visual, de microdeleções, rearranjo cromossômico que envolve uma região camuflada na leitura pela banda ou rearranjos dentro do cromossomo. Essa técnica é usada para estudar os cromossomos de células em metáfase, mas seu principal uso é nas células em interfase, quando anormalidades numéricas e algumas estruturais podem ser detectadas. Essa propriedade é de grande valor em estudos sobre câncer, já que um grande número de células pode ser verificado quanto a anormalidades clonais específicas que podem estar presentes somente em poucas células. A citogenética em interfase também possui enorme potencial

para diagnóstico pré-natal, sendo também um instrumento valioso para o mapeamento gênico. (VERMA RS, BABU A, 1995).

A FISH consiste basicamente no pareamento de uma sonda de DNA ou RNA com uma sequência complementar do genoma. Para visualizar o segmento de DNA ou RNA hibridizado é necessário que a sonda esteja marcada por um fluorocromo, que fluoresce na presença de luz ultravioleta. Esta técnica tem sido amplamente utilizada na análise de tumores humanos para a identificação de marcadores (GUERRA, 2004). A técnica de FISH tem um impacto positivo e relevante no diagnóstico genético e é um requisito para futuras investigações moleculares, auxiliando na identificação de genes relacionados ao fenótipo tumoral (DONG *et al.*, 2001).

A técnica pode ser aplicada tanto para células em pró-metáfase, metáfase como em interfase, o que permite fazer diagnósticos citogenéticos mais acurados, tanto para anormalidades constitucionais, quanto para mudanças cromossômicas adquiridas como no caso de células cancerosas. É também um instrumento valioso para mapeamento gênico.

As vantagens de usar a FISH estão relacionadas à rapidez nas pesquisas de aneuploidias, sendo que não há necessidade de crescimento em culturas das células, podendo usar tecidos preservados, tecidos fixados em formol, amostras de sangue e de medula óssea. Dos vários meios para se determinar a deleção genômica de *PTEN*, a FISH oferece a vantagem de ser altamente específica e quantitativa, além de permitir a determinação do número de cópias do gene dentro de células individuais em cortes de tecido (YOSHIMOTO, 2006).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

- O objetivo geral da presente proposta de estudo foi compreender como a perda/ganho genômico de *PTEN* se associa com o câncer de próstata.

#### 3.2 Específicos:

- Contribuir para avaliar o uso das novas estratégias de diagnóstico aplicadas ao CaP.
- Estimar a frequência de distribuição das alterações no gene *PTEN* como marcador biológico nos casos de CaP.

## 4. METODOLOGIA

Este estudo foi desenhado como uma estratégia investigativa para a avaliação citogenética molecular de tecido tumoral de próstata, obtido de pacientes com adenocarcinoma de próstata, para identificar alterações citogenéticas do gene *PTEN*, utilizando a técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH). A prática laboratorial ocorreu no Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. As amostras tumorais foram obtidas de pacientes provenientes do Hospital Araújo Jorge (HAJ), com o apoio dos serviços de Urologia e Anatomia Patológica.

### 4.1 Grupo amostral

Foram avaliadas 38 amostras de tecido prostático, obtidas a partir de prostatectomia radical, de portadores de adenocarcinoma de próstata, em agrupamentos familiar, hereditário e esporádico. Os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, sendo que a participação e a doação das amostras biológicas foram voluntárias. A presente proposta foi aprovada pelo Comitê de Ética da PUC Goiás e do HAJ CAEE no 4353212.5.0000.0037 e Protocolo CEP/ACCG nº 011/2012.

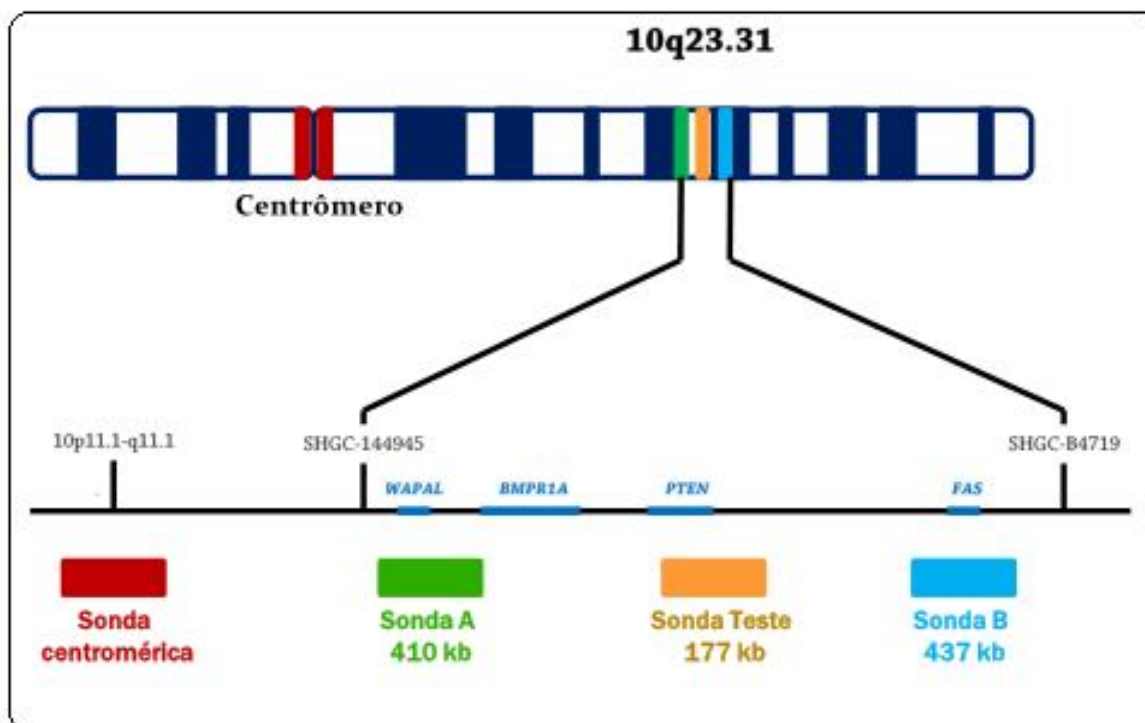
Dos prontuários individuais dos pacientes, foram obtidos dados clínicos, histórico familiar, o PSAi (PSA inicial) e o Gleason total, além do estilo de vida o que possibilitou agrupar esses pacientes seguindo a classificação do tipo de câncer, podendo ser hereditário, familiar ou esporádico.

### 4.2 Ensaio de FISH para *PTEN*

A frequência com que as deleções de *PTEN* ocorreram foi estimada usando-se a estratégia de FISH interfásico sobre cortes histopatológicos de cinco micra ( $\mu\text{m}$ ), conforme descrito por YOSHIMOTO *et al.*, (2008), com

modificações (anexo 1). As modificações incluídas no método descrito foram um passo adicional de desparafinização em xilol, tempo de digestão em pepsina variando de 13 a 17 minutos, um passo de lavagem em 2x SSC após a digestão enzimática e co-denaturação do tecido e das sondas a 82° C por 10 minutos em forno HyBrite® (Vysis Inc., EUA).

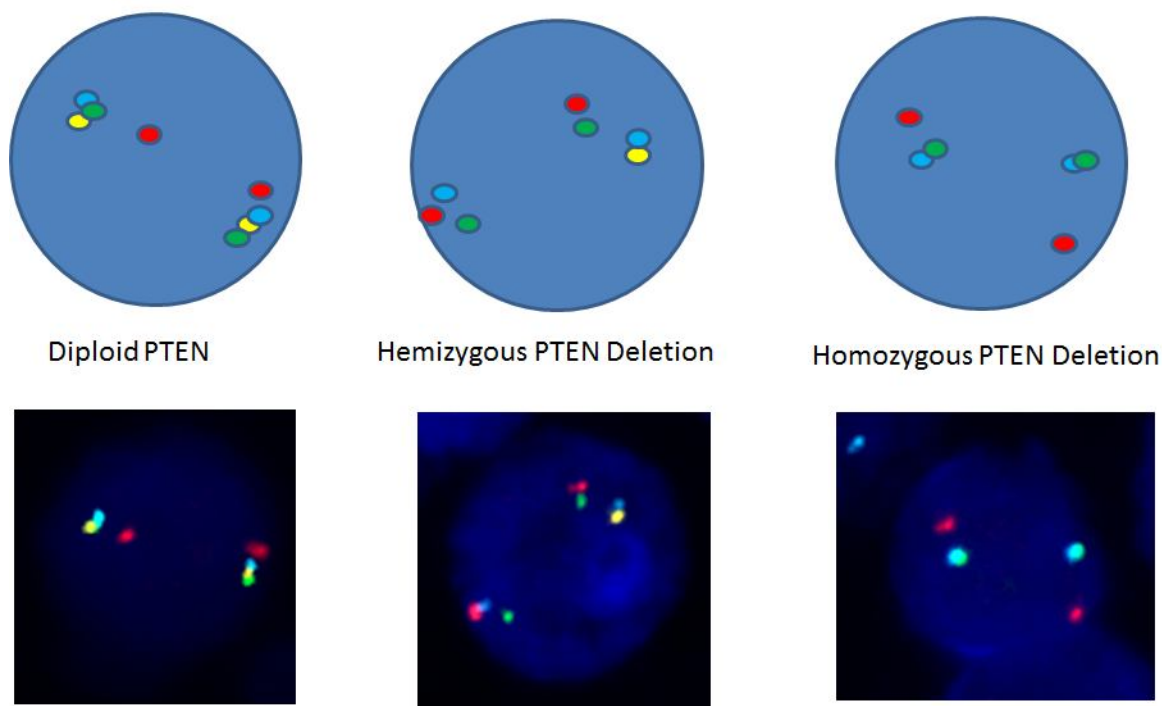
Para o procedimento da FISH, aplicou-se um ensaio comercial altamente sensível de quatro cores para analisar o gene *PTEN* (Del-TECT CymoGenDx®) (figura 07). O ensaio foi proposto e desenvolvido no laboratório do Dr. J. Squire, na Queen's University, Ontário – Canadá. Os sinais fluorescentes para cada sonda foram contados em 100 núcleos interfásicos por lâmina, não sobrepostos e intactos na área do tumor, definida por um Patologista. A proporção de pacientes com deleção de *PTEN* foi comparada entre câncer de próstata familiar, esporádico e hereditário.



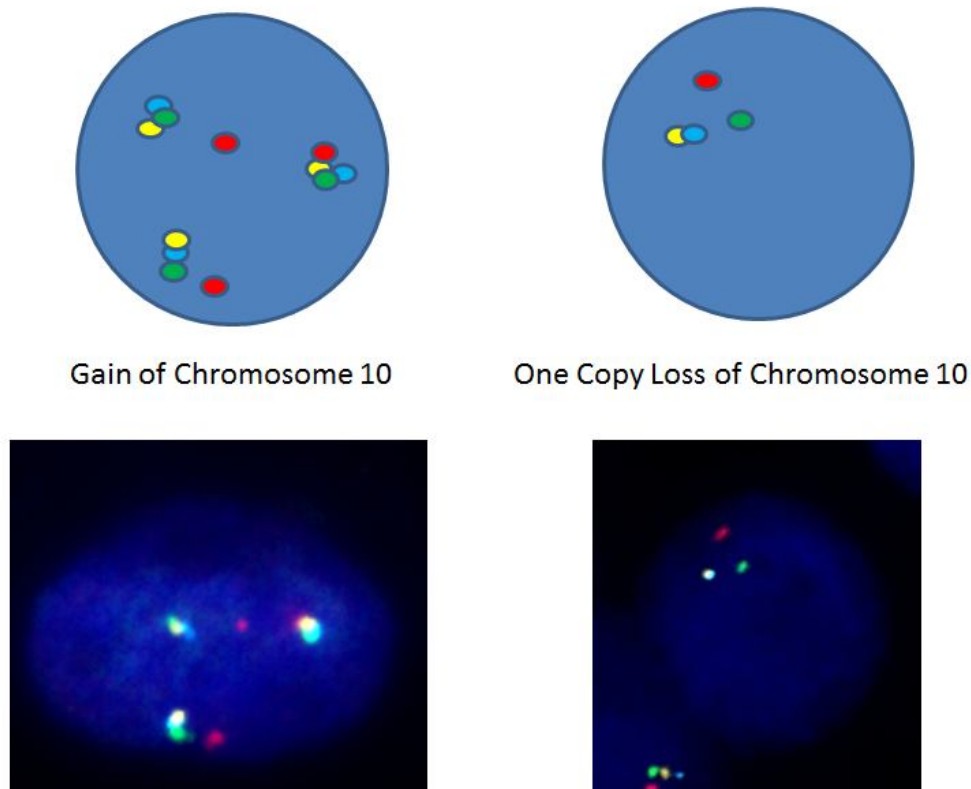
**Figura 07:** Ensaio de quatro cores para avaliação citogenética do gene *PTEN* (Del-TECT CymoGenDx).

Fonte: Adaptada do catálogo Del-TECT CymoGenDx, 2012.

As lâminas foram analisadas usando-se um microscópio de epifluorescência automático da Zeizz® Axioplan2 Imaging. Para a contagem dos sinais foi utilizado o *software ISIS® (Metasystems)*, sendo considerado resultado normal à presença de dois sinais para cada cor, verde, azul, vermelho e laranja. Para a análise e obtenção das imagens foram utilizados três filtros DAPI (340/440nm – cor azul), Vermelho (TRICT – 660/570nm) e Verde (FITC – 550/540nm). A sonda vermelha cora a região centromérica, que auxilia na avaliação da presença de monossomia, a sonda laranja detecta a deleção do gene *PTEN*, a sonda verde hibrida proximamente ao *PTEN*, em região ao centrômero e a azul ou acqua, hibrida distalmente do *PTEN*, em direção ao centrômero (Figura 08 e 09).

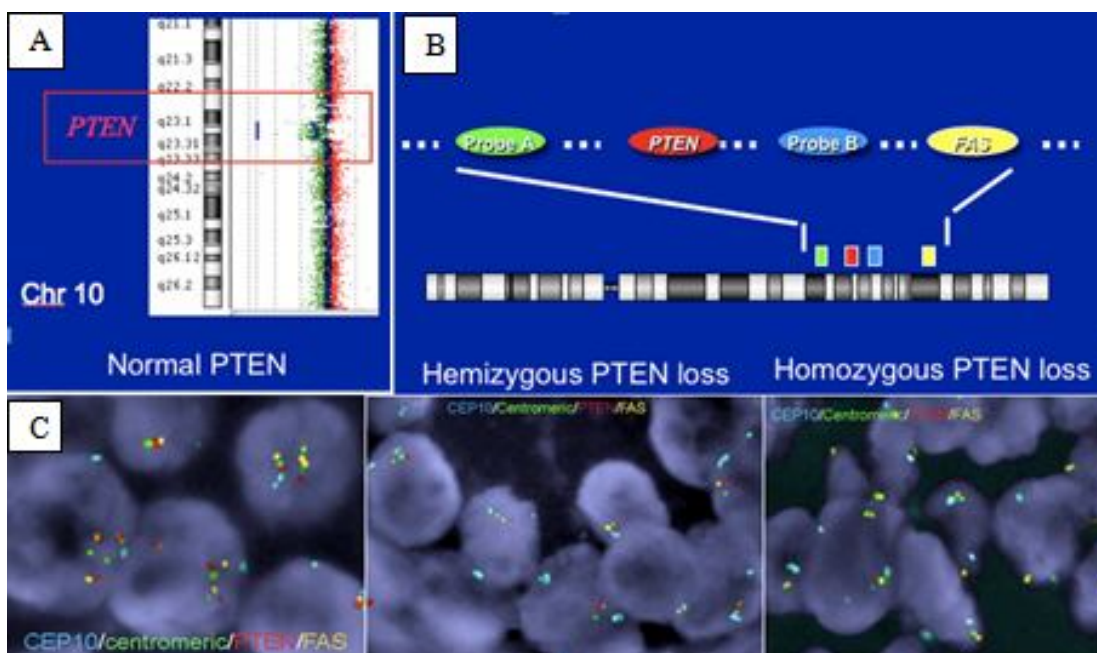


**Figura 08:** Esquema representativo dos quatro sinais observados nas células glandulares diploides, em hemizigose e homozigose. .



**Figura 09:** Esquema representativo dos quatro sinais observados nas células glandulares com ganho e perda do cromossomo 10.

As vantagens de se usar a sonda PTEN são: diminui a detecção de deleções artefactuais (falso-positivo) devido à presença de três sondas controles, maior caracterização da quebra cromossômica envolvida na deleção do PTEN devido ao uso de sondas flanqueando este gene e o ensaio de FISH de quatro cores para o PTEN (Cymogen Dx, LLC) pode ser utilizado em material em suspensão e em cortes histológicos (Figura 10).



**Figura 10:** Análise por FISH para detectar alterações no gene *PTEN* de amostras de câncer de próstata. **Legenda:** **A** - microdeleção hemizigótica consistente de ~900kb no *PTEN* em CaP (Squire *et al.*, 2007). **B** – Mapa de localização e configuração da sonda de 4 cores usadas na estratégia de FISH para determinar deleções hemizigóticas no cromossomo 10. O conjunto de sondas de BAC *PTEN* permite o mapeamento das regiões flangeadoras de perda genômica associada com deleções de *PTEN* em tumores. **C** – FISH de 4 cores mostrando *PTEN* normal, e com deleções em hemizigose e homozigose.

Fonte: Adaptada de YOSHIMOTO *et al.*, 2007.

### 4.3 Análise Estatística

As análises incluíram estatística descritiva e Regressão Linear Simples. Todos os testes foram conduzidos com nível de significância de  $p < 0,05$  e intervalo de confiança de 95%, com o uso do programa BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).

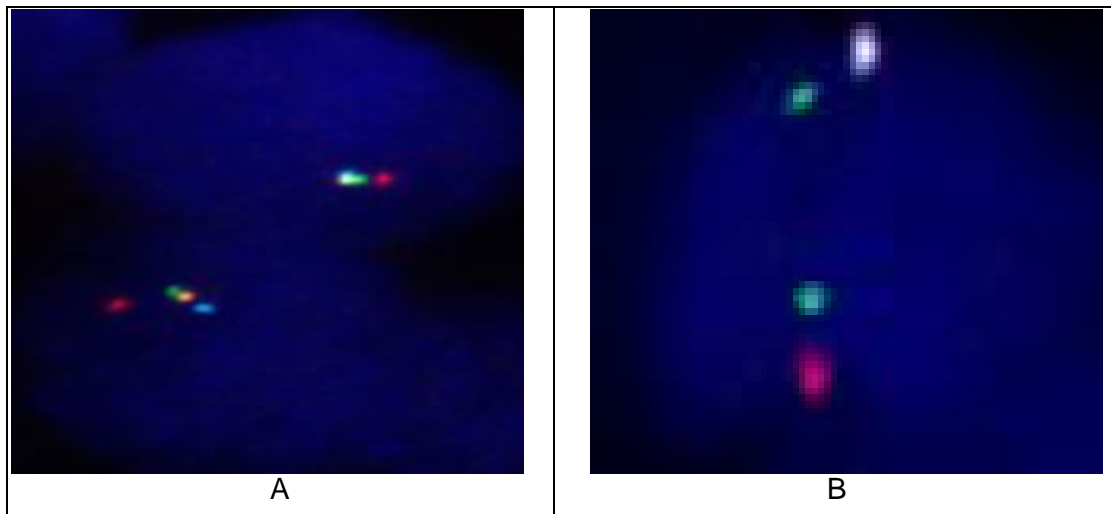


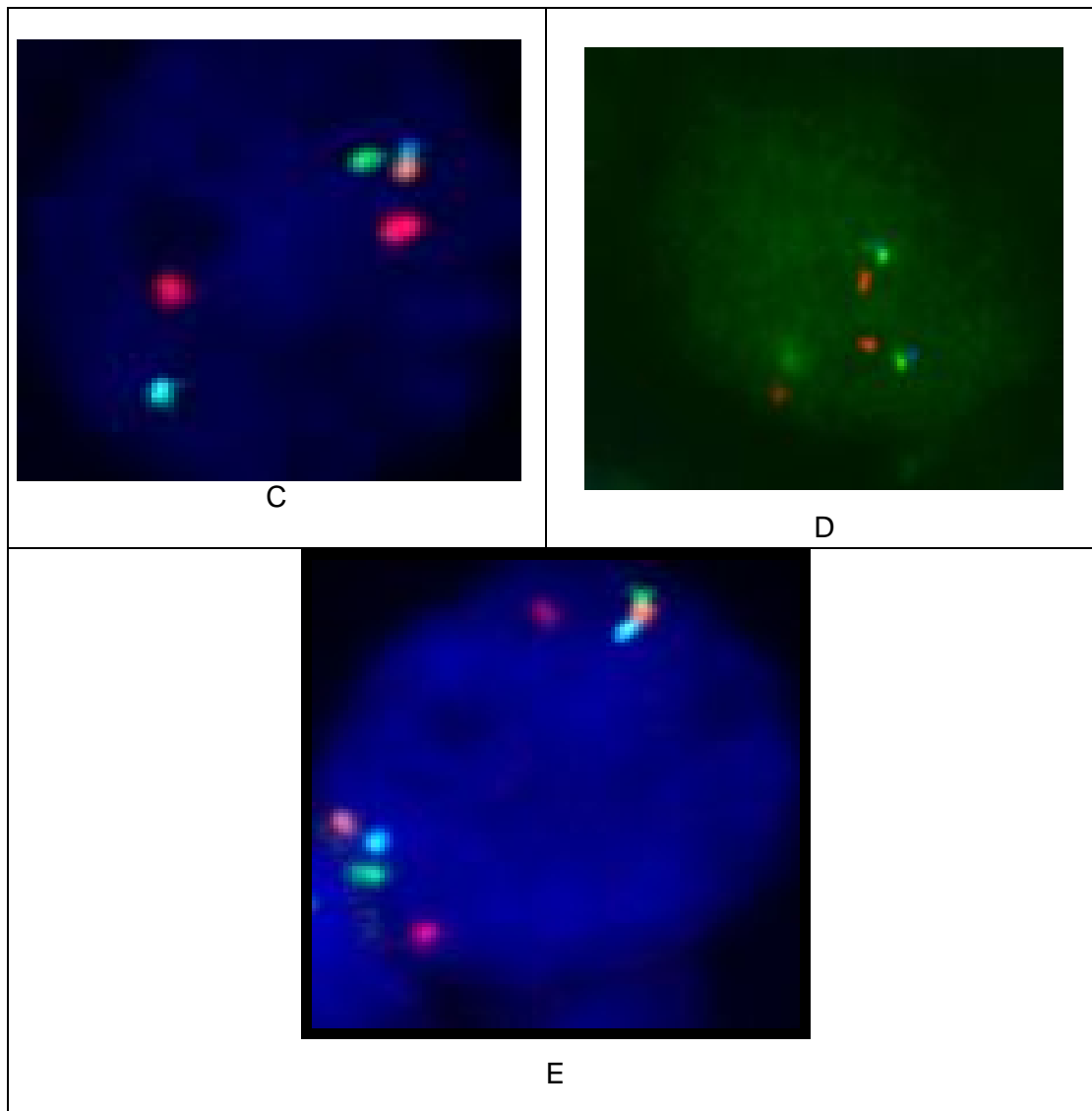
## 5. RESULTADOS

A frequência com que as deleções de *PTEN* ocorreram foi estimada usando-se a estratégia FISH interfásico sobre cortes histopatológicos de 5µm, conforme descrito por Yoshimoto *et al.*, 2006-8. A análise da FISH foi detalhada, usando um ensaio altamente sensível de quatro cores.

As deleções foram avaliadas em 38 casos de pacientes com câncer de próstata e os sinais fluorescentes para cada sonda foram contados em 100 núcleos interfásicos por lâmina, não sobrepostos e intactos (Figura 11).

A ocorrência das alterações genômicas de *PTEN* foram examinadas e classificadas em homozigose, hemizigose, monossomia, ganho e perda de regiões do cromossomo 10. Esses dados foram avaliados em função da idade, uso do álcool, tabagismo e do agrupamento familiar.





**Figura 11.** Alterações citogenético-moleculares em núcleos interfásicos de pacientes com adenocarcinoma prostático. A. Monossomia. B. Perda em homozigose. C. Perda em hemizigose. D. Ganho cromossômico. E. Célula normal. As alterações foram analisadas na objetiva de 63x.

Fonte: Núcleo de Pesquisas Replicon/PUCGO.

Foi encontrada monossomia do cromossomo 10 em 76,3% dos casos, e deleções do tipo hemizigose em 21,1% sendo que a porcentagem de ganho do cromossomo 10 foi de 2,6%.

A média da idade dos pacientes foi de 61,7 e o PSA apresentou uma média de 10,2 variando de 1,6 a 38ng/mL. O Escore de Gleason variou de 5 a 8, com moda de 6,4 para os casos estudados. De acordo com a análise dados clínicos dos pacientes e o estilo de vida, observou-se que 47,3% eram tabagistas, 39,4% não tabagistas, sendo que 13,2%, 18,4% eram etilistas, 23,7% eram hipertensos e 7,9% dos pacientes apresentavam diabetes. Os dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes podem ser observados com mais detalhes na Tabela 4.

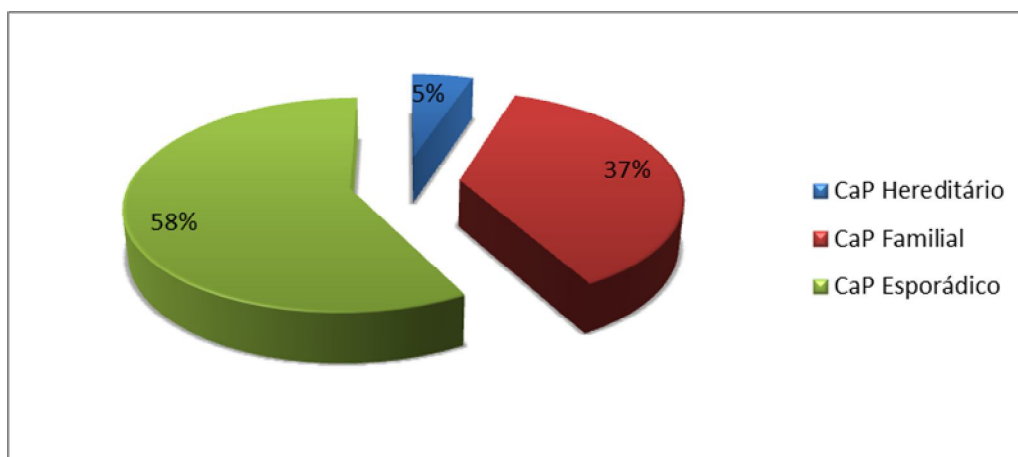
**Tabela 4.** Hábitos de vida e dados clínico-patológicos dos casos participantes da análise de alterações no gene *PTEN*, subdivididos de acordo com a classificação do câncer de próstata em esporádico, familiar e hereditário de Goiânia.

Parâmetros clínico-patológico	N* (%)	Classificação do CaP		
		Hereditário	Familiar	Esporádico
	38			
<b>Idade (min-max)</b>		66(59-73)	59,71(45-69)	62,5(50-78)
<b>Tabagismo</b>				
Sim	18 (47,3)	0	7 (18,4)	11 (28,9)
Não	15 (39,4)	0	6 (15,8)	9 (23,6)
NC	5 (13,1)	2 (5,26)	1 (2,6)	2 (5,2)
<b>Etilismo</b>				
Sim	7 (18,4)	0	4 (10,5)	3 (7,9)
Não	13 (34,2)	0	5 (13,2)	8 (23,7)
NC	18 (47,3)	2 (5,26)	5 (13,2)	11 (26,3)
<b>Hipertensão</b>				
Sim	9 (23,7)	0	3 (7,9)	6 (15,7)
Não	17 (44,7)	1 (2,6)	4 (10,5)	12 (31,6)
NC	12 (31,5)	1 (2,6)	7 (18,4)	4 (10,5)
<b>Diabetes</b>				
Sim	3 (7,9)	0	2 (5,2)	1 (2,6)
Não	22 (57,9)	1 (2,6)	5 (13,2)	15 (39,5)
NC	13 (34,2)	1 (2,6)	7 (18,4)	6 (15,7)
<b>Score de Gleason</b>				
Gleason 5-6	22 (57,9)	2 (5,2)	7 (18,4)	13 (34,2)
Gleason 7-8	16 (42,1)	0	7 (18,4)	9 (23,7)
<b>PSA</b>				
0-5	9 (23,7)	2 (5,2)	2 (5,2)	6 (15,8)
6-10	12 (31,5)	0	5 (13,2)	7 (18,4)
>10	13 (34,2)	0	9 (23,7)	9 (23,7)

N\*: Número de casos

NC\*\*: Não constava no prontuário.

Os pacientes com adenocarcinoma de próstata foram classificados de acordo com a história familiar contida no prontuário em câncer hereditário, familiar e esporádico, sendo que para concluir o tipo de câncer, eram necessárias informações familiares do histórico de câncer em parentesco de 1º grau, 2º grau, dentre outros. No grupo de pacientes avaliados, 5% eram do tipo hereditário, 37% familiares e 58% esporádicos (Figura 12).



**Figura 12.** Distribuição percentual dos casos com CaP Hereditário, Familiar e Esporádico.

Os pacientes com câncer de próstata esporádico apresentaram 24,7% de células monossômicas e 51,7% de células normais. Nos casos classificados como familiares 31,6% das células foram monossômicas e 43,2% normais. Nos casos hereditários, pode-se observar 27% de células monossômicas, 16,5% em homozigose e 48% de células normais (Tabela 5).

**Tabela 5.** Frequência relativa de alterações no gene PTEN dos pacientes analisados por FISH em adenocarcinoma prostático.

Alterações moleculares do <i>PTEN</i>	Total 38	Classificação do Câncer de Próstata			Média
		Esporádico (22)	Familiar (14)	Hereditário (02)	
Monossomia		24,70%	31,60%	27%	27,7
Homozigose		1,20%	3,50%	1,50%	2
Hemizigose		14,40%	19%	16,50%	16,6
Ganho		8%	1,90%	7%	5,6
Normal		51,70%	43,20%	48%	47,6

No prontuário de cada paciente foi possível observar as características patológicas do tumor quanto à sua localização, comprometimento angio-linfático (ausente ou presente), extravazamento capsular (ausente ou presente), vesícula seminal livre de neoplasia ou não, linfonodos, margens vesical livre ou não, tumor órgão confinado sim ou não e espécime do tumor. Essas informações podem ser observadas com mais detalhes na tabela 6.

**Tabela 6.** Informações patológicas tumorais contidas no prontuário de cada paciente.

Parâmetros patológicos tumorais	N* (%) 38	Classificação do CaP		
		Hereditário	Familiar	Esporádico
<b>Estágio Patológico</b>				
pT1	1 (2,6)	1 (2,6)	1 (2,6)	0
pT1c	7 (18,4)	0	0	6 (15,8)
pT2	1 (2,6)	0	1 (2,6)	0
pT2a	13 (34,2)	0	5 (13,2)	8 (21,1)
pT2b	2 (5,3)	0	0	2 (5,2)
pT2c	10 (26,3)	1 (2,6)	6 (15,8)	3 (7,9)
pT3a	3 (7,9)	0	1 (2,6)	2 (5,2)
pT3b	1 (2,6)	0	0	1 (2,6)
<b>Invasão da Vesícula Seminal</b>				
Positivo	3 (7,9)	0	2 (5,2)	1 (2,6)
Negativo	35 (92,1)	2 (5,2)	12 (31,5)	21 (55,2)
<b>Invasão Perineural</b>				
Positivo	15 (39,5)	0	6 (15,8)	9 (23,7)
Negativo	21 (55,2)	2 (5,2)	7 (18,4)	12 (31,6)
NC	2 (5,2)	0	1 (2,6)	1 (2,6)
<b>Invasão Angiolinfático</b>				
Positivo	0	0	0	0
Negativo	34 (89,5)	2 (5,2)	12 (31,6)	20 (52,6)
NC	4 (10,5)	0	2 (5,2)	2 (5,2)
<b>Invasão Capsular</b>				
Negativo	27 (71,1)	2 (5,2)	10 (26,3)	14 (36,8)
Focal	8 (21,1)	0	3 (7,9)	5 (13,1)
Extenso	1 (2,6)	0	1 (2,6)	0
NC	2 (5,2)	0	0	3 (7,9)
<b>Invasão Linfonodal</b>				
Positivo	0	0	0	0
Negativo	13 (34,2)	0	7 (18,4)	5 (13,1)
NC	25 (65,8)	2 (5,2)	7 (18,4)	17 (44,7)
<b>Órgão Confinado</b>				
Positivo	22 (57,5)	2 (5,2)	9 (23,7)	11 (28,9)
Negativo	10 (26,3)	0	4 (10,5)	6 (15,8)
NC	6 (15,8)	0	1 (2,6)	5 (13,1)

N\* = número de casos

NC\*\* = Nada consta no prontuário

No presente estudo observou-se que o Escore de Gleason (EG) nos pacientes com câncer esporádico variou de 6 a 8. No total de 22 casos, esporádicos, um paciente apresentou escore 8, 5 apresentaram o escore 7 sendo que destes 2 considerado mais grave com somatória 4+3. No câncer hereditário, o escore encontrado foi 6, já no câncer familiar houve uma variação na graduação de Gleason, sendo uma frequência maior o escore 6 e 7 (3+4).

O Antígeno Específico da Próstata (PSA), avaliado bioquimicamente em exame de sangue, é usado para se detectar, juntamente com outros exames, o câncer de próstata. Caso o PSA apresente um valor alterado, é necessário que seja feita a biópsia para confirmar o diagnóstico de câncer. No presente estudo, a média dos níveis de PSA no câncer esporádico foi de 9ng/mL. No câncer de próstata familiar a média do PSA foi de 11,73ng/mL e 4,66ng/mL no câncer de próstata hereditário.

Ao avaliar e comparar o variável fumo e alterações no gene *PTEN*, pode-se observar um alto índice de alterações nos pacientes fumantes, sendo que quem fuma tem 5,7 vezes mais chance de sofrer alterações do tipo monossômicas ( $p= 0,0495$ ), evidenciando uma correlação significativamente entre fumantes e alterações monossômicas. Não houve associação estatisticamente significativa quando se comparou os pacientes etilistas com alterações no *PTEN* ( $p= 0,52$ ), níveis de PSA x *PTEN* ( $p= 0,58$ ) e PSA x idade ( $p= 0,68$ ).

## 6. DISCUSSÃO

O câncer de próstata é o tumor maligno mais comumente diagnosticado em homens, sendo a terceira principal causa de mortalidade relacionada ao câncer depois do câncer de pulmão e retal em homens a partir dos 40 anos e mais velhos (JEMAL *et al.*, 2006).

Apesar dos progressos significativos na análise clínica, pouco se sabe sobre a etiologia do câncer de próstata. Critérios bioquímicos, histopatológicos e clínicos utilizados como, Antígeno Específico da Próstata (PSA), a graduação de Gleason, e o estágio do tumor, têm demonstrado uma variabilidade significativa na previsão de subgrupos de pacientes com câncer de próstata com a evolução clínica distinta (MILLER *et al.*, 2001; DEMARZO *et al.*, 2003; GLINSKY *et al.*, 2004). O PSA tem sido utilizado na avaliação diagnóstica de homens com sinais e sintomas sugestivos de câncer de próstata, na avaliação de recorrência bioquímica após tratamento e no monitoramento de homens com diagnóstico prévio de câncer de próstata.

Se o resultado clínico do PSA apresenta valores acima do normal, 2,5 ng/mL para homens entre 40 e 50 anos e até 4,0 ng/mL para homens entre 50 e 60 anos, isso significa que está havendo alterações na glândula e o médico poderá recomendar outros exames para determinar a melhor forma de tratamento (KOWALSKI *et al.*, 2002; SROUGI, 2007). Na análise do PSA dos 38 pacientes estudados, 95% apresentavam valores acima de 4,5 ng/mL (média de 10,17 ng/mL) e o tratamento determinado pelo médico para esses pacientes foi a prostatectomia radical (PR).

O método PR consiste na retirada da próstata (tumor, hiperplasia e glândula prostática) e das vesículas seminais, posteriormente unindo-se a bexiga à uretra (GOMES *et al.*, 2008). Apesar da eficácia deste tratamento, Srougi e Simon (1996) e Srougi (2007), ressaltam que este procedimento é muito agressivo podendo acarretar certas complicações como o estreitamento da nova união entre a bexiga e a uretra, incontinência e fugas involuntárias de urina e impotência sexual.



Quando o câncer prostático encontra-se localizado, a radioterapia é uma das opções de tratamento vigentes (GALÁN *et al.*, 2004; SHAHI; MANGA, 2006) que se baseia em administrar radiações externas ou internas sobre a próstata para destruir as células cancerígenas (SROUGI; SIMON, 1996; SROUGI, 2007). No grupo de pacientes avaliados, em dois casos o tratamento incluiu a radioterapia. Observou-se que esses pacientes possuíam alto nível de PSA (38 e 16ng/mL) com tumor primário de tamanho crescente com extensão local (T2A e T3A).

Semelhante aos achados do presente estudo, investigações detalhadas das perdas 10q utilizando hibridização *in situ* de fluorescência (FISH), mostraram que microdeleções *PTEN* estavam presentes em 68% dos carcinomas (YOSHIMOTO *et al.*, 2006) .

A frequência de deleções do gene *PTEN* usando a técnica FISH, é considerado um padrão importante para a determinação do número de cópias de genes em amostras de tecido parafinado, realizada para estimar a quantidade de mutações de *PTEN*. Segundo Han *et al.*, (2009) e Sircar *et al.*, (2009), as deleções *PTEN* foram encontradas entre 17% a 68% dos casos analisados. Esses achados corroboram com o presente estudo, no qual foram encontrados 21,1;% de deleções hemizigóticas do gene *PTEN*.

As alterações nos grupos esporádicos, familiar e hereditário foram de 57,9%, 36,8% e 5,3% respectivamente, com uma média de 76,2% de monossomia, evidenciando uma porcentagem alta desse tipo de alteração quando comparado com outros estudos. A ocorrência de perda do gene *PTEN* no câncer de próstata é comum com frequências relatadas de 30 a 62%, ressaltando a importância deste evento desenvolvimento do câncer de próstata (WHANG *et al.*,1998; KWABI-ADDO *et al.*, 2001).

A perda de uma cópia do gene *PTEN* em pacientes com câncer de próstata foram encontradas em 40% dos casos estudados (YOSHIMOTO *et al.*, 2007, 2008;. REID *et al.*, 2010). Estudos anteriores demonstram que a exclusão de uma cópia do *PTEN* por perda hemizigótica parece trazer um prognóstico desfavorável (YOSHIMOTO *et al.*, 2007), enquanto que a perda de ambas as

cópias do gene, homozigose, está fortemente associada à metástase e câncer de próstata (SIRCAR *et al.*, 2009; REID *et al.*, 2010).

No presente estudo observou-se que em todos os casos foram encontradas alterações no gene *PTEN*, principalmente do tipo monossômicas, ou seja, foram encontradas apenas uma cópia do cromossomo 10, e o PSA dos casos analisados estavam elevados, corroborando os estudos de MCMENAMIN *et al.*, 1999; BERTRAM *et al.*, 2006 e YOSHIMOTO *et al.*, 2007, 2008; REID *et al.*, 2010.

Yoshimoto e colaboradores, 2011, sugeriram que provavelmente a dosagem da *PTEN* desempenha um papel importante no câncer inicial de próstata. Também tem sido mostrado que os níveis reduzidos de proteína *PTEN* podem levar a instabilidade genômica (ALIMONTI *et al.*, 2010), e que isto pode aumentar a capacidade de células portadoras do gene *PTEN* adquirirem aberrações cromossômicas.

Segundo Rhoden (2004) os adenocarcinomas de próstata tem geralmente um longo período de evolução até se apresentarem sintomáticos. Com a análise do PSA, alguns tumores podem ser diagnosticados na fase pré-clínica (T1c), onde as chances de cura podem ser maiores. No presente estudo apenas quatro casos, dentro dos 38, apresentou o tumor nessa fase clínica, podendo observar para todos eles um alto nível de PSA.

Os fatores ambientais evidenciam uma relação direta com o desenvolvimento do CaP, a fumaça de automóveis, cigarros, fertilizantes e outros produtos químicos também estão sob suspeita, porém, mais estudos ainda são necessários (BANDEIRAS *et al.*, 2003). Os resultados desse trabalho corroboram para esse achado, visto que pacientes fumante tiveram um aumento de aproximadamente 6x maior de terem alterações gênicas no *PTEN*, porém se fazem necessários mais estudos para inferir significativamente essa relação da perda do *PTEN* com o fumo.

Estudos recentes mostram também que a exposição ao arsênico inorgânico, um contaminante ambiental, também tem sido responsabilizado pela iniciação e/ou progressão do câncer de próstata (BENBRAHIM-TALLAA;

WAALKES, 2009). Populações que vivem em locais de baixa incidência de CaP, quando migram para áreas de alta incidência, apresentam, geralmente, um aumento na ocorrência de casos, ficando evidente que fatores ambientais estão relacionados com a etiologia da doença.

Resultados de estudos clínicos já publicados demonstram que a genética tem muito a oferecer para a caracterização do câncer de próstata, assim como para outros tipos de câncer. A deleção do gene *PTEN* é um dos principais focos dos estudos atuais, na busca pela identificação de pacientes que realmente precisam de tratamento e para preservar a qualidade de vida dos homens que podem adiar o tratamento, submetendo-se apenas a uma vigilância mais rigorosa (YOSHIMOTO *et al.*, 2006).

Embora a técnica FISH forneça meios de determinação da presença ou ausência de um gene específico ou uma região genômica, a abordagem é incapaz de fornecer informações exatas sobre a localização de pontos de interrupção do DNA. Técnicas de mapeamentos moleculares mais precisos combinados com sequenciamento seriam necessários para fornecer informações exatas das regiões de exclusão *PTEN* e pontos de interrupção associados.

Portanto, a genética deixa de ser apenas uma área de pesquisa promissora no câncer de próstata e passa a contribuir concretamente para um encaminhamento seletivo dos pacientes, adicionando informações novas em uma área que permaneceu aparentemente com poucas mudanças durante anos. Atualmente há a necessidade de aprimorar os métodos de estratificação de pacientes, onde se pode utilizar biomarcadores através de estudos de genômica do câncer de próstata (YOSHIMOTO *et al.*, 2008).

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que alterações do gene *PTEN* do tipo homozigose, hemizigose, monossomia e ganho podem ser observadas em pacientes com carcinoma prostático esporádico, familiar ou hereditário. Pode-se concluir que pacientes fumantes possuem um aumento de 5,7% de apresentar alterações monossômicas. As alterações nos grupos esporádicos, familiar e hereditário foram de 57,9%, 36,8% e 5,3% respectivamente, com uma média de 31,3% de monossomia, evidenciando uma porcentagem alta desse tipo de alteração quando comparado com outros estudos.

A técnica FISH possibilitou a análise das alterações de forma clara e eficaz, evidenciando a confiabilidade desta técnica quanto à leitura dos sinais em cada célula, essa confiabilidade ocorre pelo uso de sondas específicas para regiões do cromossomo 10.

O estudo do gene *PTEN* é importante para associar perdas e ganhos genômicos, com aspectos biológicos e morfológicos do tumor, como o Escore de Gleason e os níveis séricos de PSA, que poderão ser usados para se proceder com o manejo e tratamento adequados e eficazes dos pacientes com esta patologia.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, C. H. N. **Disfunção erétil: resultados do estudo da vida sexual do brasileiro.** Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo, v. 52, n. 6, p. 424-426, fev./mar. 2006.

AH. **Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 That is mutated in multiple advanced cancers.** Nature Genetics 1997; 15:62- 356.

ALBERTI I, BARBORO P, BARBESINO M, SANNA P, PISCIOTTA L, PARODI S, NICOLÒ G, BOCCARDO F, GALLI S, PATRONE E, BALBI C. **Changes in the expression of cytokeratins and nuclear matrix proteins are correlated with the level of differentiation in human prostate cancer.** J. Cell Biochem. Sep 7;79 (3):471-85. 2000.

ALMEIDA, VL de. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.** Quim Nova 28.1 (2005): 118-29.

ALIMONTI A, CARRACEDO A, CLOHESSY JG, TROTMAN LC, NARDELLA C, EGIA A, SALMENA L, SAMPIERI K, HAVEMAN WJ, BROGI E, RICHARDSON AL, ZHANG J, PANDOLFI PP. **Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility.** Nat Genet 42:454–458. 2010.

AUA. Course 79 IC: **Prostate Cancer – Prevention and Genetics.** Tuesday, May 23, 2006. Eric A. Klein, M.D. (Director).

AUS G, ABBOU CC, PACIK D, SCHMID H-P, van POPPEL H, WOLFF JM, **EAU Guidelines on Prostate Cancer.** Eur Urol 2001; 40:97-101.

BENSON MC, WHANG IS, PANTUCK A, RING K, KAPLAN SA, OLSSON CA, COONER WH. **Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer.** J Urol 1992; 147:815-816.

BOOKSTEIN R, MACGROGAN D, HILSENBECK SG. **p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers.** Cancer Res 1993;53:3369–73.

BOSLAND MC, OAKLEY-GIRVAN I, WHITTEMORE AS. **Dietary fat, calories and prostate cancer risk.** Journal of the Nacional Cancer Institute, 91(6): 489-491, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2008. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 12 de Dez. 2013

BRESLOW N, CHAN CW, DHOM G, DRURY RAB, FRANKS LM, GELLEI B, LEE YS, LUNDBERG S, SPARKE B, STERNBY NH, TULINIUS H. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. **The International Agency for Research on Cancer**, Lyons, France. Int J Cancer 1977; 20:680-688.

CAIRNS P, OKAMI K, HALACHMI S. **Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer**. Cancer Res 1997;57:4997-5000.

CARPTEN, J., NUPPONEN, N., ISAACS, S., SOOD, R., ROBBINS, C., XU, J., FARUQUE, M., MOSES, T. & EWING, C., **Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1**. Nat. Genet. 2002; 30:181-184.

CARTER BS, BEATY TH, STEINBERG GD, CHILDS B, WALSH PC. **Mendelian inheritance of familial prostate cancer**. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:3367-3371.

CARTER HB, PEARSON JD, METTER EJ, BRANT LJ, CHAN DW, ANDRES R, FOZARD JL, WALSH PC. **Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease**. JAMA 1992; 267:2215-2220.

CARVALHAL GF, SMITH DS, MAGER DE, CATALONA WJ. **Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng/ml or less**. J Urol 1999; 161:835-839.

CATALONA WC, SMITH DS, WOLFERT RL, WANG TJ, RITTENHOUSE HG, RATLIFF TL, NADLER RB. **Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening**. JAMA 1995; 274:1214-1220.

CATALONA WJ, RICHIE JP, AHMANN FR, HUDSON MA, SCARDINO PT, FLANIGAN RC, DE KERNION JB, RATLIFF TJ, KAVOUSSI Lr, DALKIN BL, WATERS WB, MACFALANE MT, SOUTHWICK PC. **Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen (PSA) in the early detection of prostate cancer: results of a multicentre clinical trial of 6,630 men**. J Urol 1994; 151:1283-1290.

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

COONEY KA, TSOU HC, PETTY EM. **Absence of PTEN germ-line mutations in men with a potential inherited predisposition to prostate cancer.** Clin Cancer Res 1999;5: 1387-91.

CORRÊA, N. A. B. **Diagnóstico precoce de carcinoma de próstata: antígeno prostático específico (PSA), um marcador quase ideal.** Rev. Bras. Anál. Clín., Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, p. 63-64, 2003.

DE MARZO, A. M., MARCHI, V. L., EPSTEIN, J. I. & NELSON, W. G. **Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis.** Am. J. Pathol. 1999; 155:1985-1992.

DEMARZO AM, PLATZ EA, SUTCLIFFE S, XU J, GRÖNBERG H, Drake CG, NAKAI Y, ISAACS WB, NELSON WG. **Inflammation in prostate carcinogenesis.** Nat Rev Cancer, 7: 256-269, 2007.

DEMARZO, A.m.; NELSON, W.G.; ISAACS, W.B.; EPSTEIN, J.I. **Pathological and molecular aspects of prostate cancer.** The Lancet. 361: 955-64, 2003.

DI CRISTOFANO A & PANDOLFI PP. 2000. **The multiple roles of PTEN in** DINI, L. I.; KOFF, W. J. **Perfil do câncer de próstata no hospital de clínicas de Porto Alegre.** Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo, v. 52, n. 1, p. 28-31, jan./fev. 2006.

EPSTEIN JI, ALGABA F, ALLSBROOK Jr WC, BASTACKY S, BOCCON-GIBOD L, De MARZO AM, **Tumours of the prostate: Acinar adenocarcinoma.** In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World health organization classification of tumours - Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC;. p. 159-92. 2004.

FREEMAN DJ, LI AG, WEI G, Li H, KERTESZ N, LESCHE R. **PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and independent mechanisms.** Cancer Cell 2003;3;117-30.

GÁLAN **Historia natural del cáncer de próstata localizado.** Datos preliminares de progresión y mortalidad. Actas Urol. Esp., v. 28, n. 5, p. 354-363, mai. 2004.

GLEASON, DF. **Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma, In: Urologic pathology: The prostate, Tannenbaum, M; Lea e Febiger, Philadelphia, 1977.**

GRIGNON, DJ; RO, JY; ORDOÑEZ, NG; AYALA, AG e CLEARY, KR. **Basal cell hyperplasia, adenoid basal cell tumor, and adenoid cystic carcinoma of the prostate gland: an immunohistochemical study.** Hum Pathol. 19:1425-1433,1988

GRONBERG H, DAMBER L., DAMBER JE. **Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study** Cancer 1996; 77:138-143.

GRONBERG H. **Prostate cancer epidemiology.** Lancet 2003; 361:859-64.

GRONBERG, H. **Prostate Câncer Epidemiology.** Lancet, v. 361, p. 859-64, 2003.

GOMES, R. **A prevenção do câncer de próstata: uma revisão da literatura.** Ciênc. Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 239-242, jan. 2008.

HSING AW, TSAO L., DEVESA SS. **International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality.** Rev Int J Cancer 2000; 85: 60-67.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Câncer de próstata. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao>>. Acesso em: 26 set. 2013.

INCA Instituto Nacional do Câncer – **Estimativas de incidência de câncer para o ano de 2013.** Brasil. [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br).

KOFF WJ, POMPEO ACL, DAMIÃO R, CARRERETTE FB, editors. **Diretrizes em urooncologia.** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Urologia; 2005. 261p.

KOWALSKI, L. P. Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia. 2. ed. São Paulo, SP: Âmbito Editores, 2002. KUPELIAN PA, KUPELIAN VA, WITTE JS, J **Clin Oncol.** 1997;15:1478–1480.

LEDUC, IE. **The anatomy of the prostate and the pathology of early benign hypertrophy.** J Urol, 42:1217, 1939.

LEE C, KOZLOWSKI JM, GRAYHACK JT. **Etiology of benign prostatic hyperplasia.** Urol Clin Am 1995; 22(2):237-46.

LEE WH, MORTON RA, EPSTEIN JI. **Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis.** Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91:11733–7.



LIE JO, YANG H, GEORGESCU MM, DI CRISTOFANO A; MAEHAMA T, SHI LODDING P, AUS G, BERGDAHL S, FROSING R, LILJA H, PIHL CG, HUGOSSON J. **Characteristics of screening detected prostate cancer in men 50 to 66 years old with 3 to 4 ng/mL, Prostate specific antigen.** J Urol 1998; 159:899-903.

MCNEAL, JE; REDWINE, EA; FREIHA, FS e STAMEY, TA. **Zonal distribution of the prostatic adenocarcinoma.** Am J Surg Pathol. 12:897,1988.

MCMENAMIN ME, SOUNG P, PERERA S, KAPLAN I, LODA M, & SELLERS WR. 1999. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. Cancer Res, 59:6-4291.

MYERS MP, PASS I, BATTY IH, VAN DER KAAY J, STOLAROV JP & HEMMING BA. **The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its** NELSON WG, DE MARZO AM, ISAACS WB. **Prostate cancer.** NEJM 2003; 349(4):366-81.

OESTERLING JE, JACOBSEN SJ, CHUTE CG, GUESS HA, GIRMAN CJ, PANSER LA, LIEBER MM. **Serum prostate specific antigen in a community-based population of healthy men.** Establishment of age-specific reference ranges. JAMA 1993; 270:860-864.

OSTRANDER EA, JOHANNESSON B. **Prostate cancer susceptibility: finding the genes.** Adv Exp Med Biol. 2008; 617:179–90.

PARTIN AW, KATTAN MW, SUBONG EN, WALSH PC, WOJNO KJ, OESTERLING JE, **Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer.** Jama. 227: 1445-51. 1997.

PEREZ, R. **O cancer de próstata – um desafio constante para médico da família.** 2002. Disponível em <http://www.bireme.br> acesso em 04/11/2013.

RHODEN EL, GRAZIOTTIN TM, SOUTO CAV. **Câncer de Próstata.** In: Rhoden EL, Souto CAV. Urologia Oncológica. Porto Alegre: Revinter, 2004:291-307

REID AH, ATTARD G, AMBROISINE L, FISHER G, KOVACS G, BREWER D, CLARK J, FLOHR P, EDWARDS S, BERNEY DM, FOSTER CS, FLETCHER A, GERALD WL, MOLLER H, REUTER VE, SCARDINO PT, CUZICK J, de BONO JS, COOPER CS. 2010. **Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer.** Br J Cancer 102:678–684.

ROBBINS, L. Stanley **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan. 2001

ROBERTS SG, BLUTE ML, BERGSTRALH EJ, SLEZAK JM, ZINCKE H. **PSA doubling time as a predictor of clinical progression after biochemical failure following radical prostatectomy for prostate cancer**. Mayo Clin Proc. Jun;76(6):576-81. 2001.

SCHMID H-P, MCNEAL JE, STARNEY TA. **Observations on the doubling time of prostate cancer. The use of serial prostate-specific antigen in patients with untreated disease as a measure of increasing câncer**. 1993; 71:2031-2040.

SCHMID H-P, MCNEAL JE, STARNEY TA. **Observations on the doubling time of prostate cancer. The use of serial prostate-specific antigen in patients with untreated disease as a measure of increasing cancer**. Cancer 1993; 71:2031-2040.

SIDDIQUI, S. A. **Impacto of Familial and Hereditary Prostate Câncer on Cancer Specific Survival after Radical Retropubic Prostatectomy**. J Urol, v. 176, n. 3, p. 1118-21, 2006

SQUIRE JA. **TMPRSS2-ERG and PTEN loss in prostate cancer**. Nat Genet 41(5):509-10. 2009

SICAR K, YOSHIMOTO M, MONZON FA, KOUMAKPAYI IH, KATZ RL, KHANNA A, ALVAREZ K, CHEN G & SQUARIZE CH. 2002. **Estudo comparativo da expressão imunoistoquímica de PTEN e da graduação histológica de malignidade em carcinomas epidermóides bucais** [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

SROUGI, M. **Hiperplasia prostática**. Rio de Janeiro, RJ: Record, 1995.

SROUGI, M; SIMON, S. D. **Câncer urológico**. 2. ed. São Paulo, SP: Platina, 1996.

STEACK PA, PERSHOHOUSE MA, JASSER AS, YUNG WK, LIN H & IGON STEPHENSON AJ, KATTAN MW, EASTHAM JA, DOTHAN ZA, BIANCO FI Jr, LILJA H, SCARDINO PT. **Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition**. J Clin Oncol, 24: 3973-3978, 2006.

TOMLINS SA, RHODES DR, PERNER SI. **Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer.** Science 2005; 310:644–8. **tumor suppression** Cell., 100:90-387. DATTA SR, BRUNET A. 1999. Cellular survival: a play in three AKTs. Genes Development, 13:27- 2905.

WARE JL. **Growth factors and their receptors as determinants in the proliferation and metastasis of human prostate cancer.** Cancer Metastasis Reviews 1993, 12: 287-301.

XU, J., ZHENG, S. L., TURNER, A., ISAACS, S. D., WILEY, K. E., HAWKINS, G. A., CHANG, B. L., BLEECKER, E. R. & WALSH, P. C., **Associations between hOGG1 sequence variants and prostate cancer susceptibility.** Cancer 2002. Res 62:2253-2257.

ZERATI F, NARDOZZA J, ARCHIMEDES. R, RODOLFO Borges dos. **Urologia I.**, 2010.

YOSHIMOTO M, CUNHA IW, COUDRY RA, FONSECA FP, TORRES CH, SOARES FA, SQUIRE JA. **FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome.** Br J Cancer. 2007 Sep 3;97(5):678-85.

YOSHIMOTO M, CUTZ JC, NUIN PA, JOSHUA AM, BAYANI J, EVANS AJ, ZIELENSKA M, SQUIRE JA. **Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias.** Cancer Genet Cytogenet. 2006 Sep;169(2):128-37.

YOSHIMOTO M, CUTZ J-C, NUIN PAS, JOSHUA AM, BAYANI J, EVANS AJ, ZIELENSKA M, SQUIRE JA. **Interphase FISH Analysis of PTEN in Histologic Sections Shows Genomic Deletions are Present in 68% of Primary Prostate Cancer and 23% of High-Grade Prostatic Intra-Epithelial Neoplasia.** Cancer Genetics and Cytogenetics 169:128-37, 2006.

YOSHIMOTO M, CUNHA IW, COUDRY RA, FONSECA FP, TORRES CH, SOARES FA, SQUIRE JA. **FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome.** Br J Cancer. 2007 Sep 3;97(5):678-85.

YOSHIMOTO M, CUNHA IW, COUDRY RA, JOSHUA A, FP FONSECA, ZIELENSKA M, soares FA, SQUIRE JA. **Absence of TMPRSS2:ERG fusions**

**and PTEN losses identifies prostate cancer genomic grade with favorable outcome.** Modern Pathology Epub ahead of print, 2008.

ZARIDZE DG, Boyle P. **Cancer of the prostate: epidemiology and aetiology.** Br J Urol 1987; 59:493-502

ZLOTTA AR, DJAVAN B, MARBERGER M, SCHULMAN CC. **Prostate specific antigen of the transition zone: a new parameter for prostate cancer prediction.** J Urol 1997; 157:1315-1321.

## 9. APÊNDICE

Tabela: Dados clínico-patológicos extraídos dos prontuários dos pacientes com câncer de próstata.

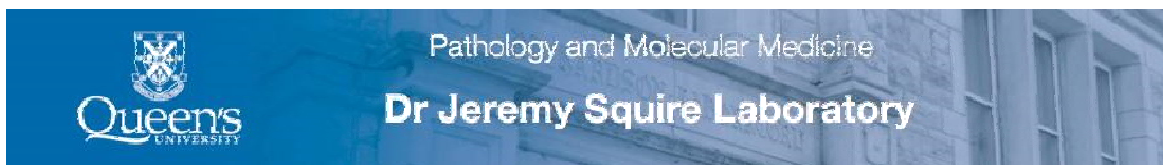
Nº DO BLOCO	IDADE	TABAGISTA	ETILISTA	HAS	DM	HISTORIA FAMILIAR	PARENTESCO 1º GRAU	PARENTESCO 2º GRAU	PARENTESCO - OUTROS GRAUS	TTO	PSAI	PT	GLEASON TOTAL	GLEASON 1º	ANGIO LINF	PERINEURO	3-EXTENSO	VES. SEM	LND POS	MARGENS	ORG CONF
B-87/11	50	X	X	X	X	1- PAI E IRMAO CA PROSTATA	SIM (2)	X	X	PR	6.7	T2C	3+3	2	1	1	2	X	1	1	X
B-10494/10	72	N	N	S	N	1-IRMAO CA DE PROSTATA	1(IRMAO)	X	X	PR	17.34	T1C	4+3	2	2	1	2	X	1	1	1
B-10895/08	69	N	X	X	X	1 - TIO CA DE PROSTATA	X	X	X	PR	10.31	T2C	3+4	2	2	1	2	2	1	1	1
B-631/09	73	S	N	S	X	1 - IRMAO CA ESOFAGO	X	X	X	PR	6	T2A	3+3	2	2	1	2	X	1	1	1
B-1049/09	68	N	N	S	X	1 - MÃE CA PULMÃO	X	X	X	PR	6	T2	3+3	2	2	1	2	X	1	1	1
B-146/09	78	N	N	N	N	2	X	X	X	PR	11	T2A	3+3	2	2	1	2	2	1	1	1
B-2708/09	70	N	N	S	S	1 - PAI CA PULMÃO	X	X	X	PR	5.85	T1C	3+3	2	2	1	2	X	1	1	1
B-581/09	64	N	S	N	N	2	X	X	X	PR	7.43	T2A	3+3	2	2	X	2	X	1	X	
B-1336/09	61	S	X	X	X	2	X	X	X	PR+RT	15.3	T3A	3+4	2	2	2	2	2	2	2	2
B-1602/09	73	X	X	X	X	X	X	X	X	PR	4.83	T1C	3+3	2	2	1	2	X	1	1	1
B-2165/09	71	N	N	S	X	2	X	X	X	PR+RT	14.78	T2C	4+4	2	1	2	2	X	3	2	2

B-292 3/09	50	S	X	X	X	X	1 - PAI CA FIGADO	X	X	X	PR	12.86	T 2A	7	3+4	2	1	1	2	2	1	1
B-618/ 11	63	S	N	X	X		1 - IRMÃ CA INTESTINO	SIM (IRMÃ)	NÃO	NÃO	PR	X	T 2A	6	3+3	X	X	1	2	X	1	1
B-86/ 11	45	S	S	N	N		1 - IRMÃ CA BEXIGA	X	X	X	PR	8.2	T 1C	6	3+3	2	2	1	2	X	2	2
B-827/ 11	56	S	S	N	S		1 - PAI CA PRÓSTATA, IRMÃ E IRMÃO CA DE ESÔFAGO	1 (PAI)	X	X	PR	9.25	T 2C	6	3+3	2	1	1	2	X	1	X
B-556 3/08	56	S	X	X	X		1 - PAI CA PRÓSTATA	X	X	X	PR	7.36	T 2C	6	3+3	X	X	1	2	2	1	1
B-104 93/10	52	S	N	X	X		CA DE PELE E DE PRÓSTATA	X	X	X	PR	4.95	T 2A	7	3+4	2	1	1	2	2	1	1
B-584 7/08	53	N	X	X	X		1- AVÔ MATERNO CA DE PROSTATA	NAO	NAO	1(AVÔ MATE RNO)	PR	3.96	T 1	5	3+2	2	2	1	2	X	1	1
B-345 3/08	47	N	N	X	X		1 - PAI CA PRÓSTATA	X	X	X	PR+ QT+ RT	16	T 3A	8	3+5	2	1	2	2	2	2	2
B-129 0/09	66	X	X	X	S		1 - PAI CA PROSTATA	X	X	X	PR	8.87	T 2A	7	4+3	2	2	2	2	X	1	2
B-536 9/10	59	X	X	N	N		2 IRMÃOS CAP	X	X	X	PR	4.5	T 2C	6	3+3	2	2	1	2	X	1	1
B-742/ 11	63	S	S	N	N		1 - PAI CA PRÓTATA	SIM (PAI)	NÃO	NÃO	PR	10.5	T 2A	6	3+3	X	2	2	1	2	2	2
B-887 0/10	63	S	N	S	N		2	X	X	X	PR	4.82	T 2C	6	3+3	2	1	2	2	X	1	X
B-255 5/11	67	N	N	N	N		2	X	X	X	PR	9.1	T 1C	7	3+4	2	2	1	2	X	1	1
B-433 7/11	59	N	N	N	N		2	NÃO	NÃO	NÃO	PR	18.9	T 2A	6	3+3	2	2	1	2	X	1	X
B-973/ 11	64	S	X	S	N		1- PAI CA DE OSSO	SIM (PAI - OSSO)	NÃO	NÃO	PR	1.6	T 2B	7	4+3	2	1	1	2	2	1	1
B-681 7/10	58	S	X	N	N		1 - IRMA CA DUODENO; IRMAO HPB	X	X	X	PR	9.3	T 2B	7	3+4	2	2	1	2	X	3	1
B-961 1/10	63	S	X	N	N		1 - IRMA FIGADO	X	X	X	PR	8.8	T 1C	6	3+3	X	1	1	2	X	1	1
B-833/ 09	68	N	N	X	X		1- PRIMO CA PROSTATA	X	X	X	PR	14.35	T 2C	6	3+3	2	2	1	2	2	1	1
B-118 3/11	61	S	S	S	N		1 - IRMÃO CA PRÓSTATA	1 (IRMÃO)	X	X	PR	1.7	T 2A	7	3+4	2	1	1	2	X	3	1

										6											
B-954 5/09	6 7	N	N	S	N	IRMAO COM CA DE PROSTATA	X	X	X	PR+ QT	3 8	T 2 A	6 3	2 +	1	3	1	2	2	2	
B-602 2/10	6 5	S	X	N	N	IRMAO CAP, IRMAO CA DE PULMÃO, MÃE COM CA DE FÍGADO	X	X	X	PR	8. 0 2	T 2 C	7 4	3 +	2	2	1	2	X	1	1
B-650 7/10	6 6	N	S	N	N	2.	X	X	X	PR	1 2. 0 3	T 3 A	7 4	3 +	2	2	2	2	X	1	2
B-900 8/10	5 5	N	X	N	N	1 - PAI CA PULMÃO	X	X	X	PR	5. 7 3	T 2 A	6 3	3 +	2	1	1	2	X	1	1
B-244 8/09	5 7	X	X	N	N	1 - PAI CA FIGADO	X	X	X	PR	7. 5	T 2 A	7 4	3 +	2	1	2	2	X	2	2
B-927 0/10	6 1	S	X	N	N	2	X	X	X	PR	3	T 1 C	6 3	3 +	2	2	1	2	X	1	X
B-576 9/10	6 5	S	X	N	N	IRMÃ COM CA DE MAMA	X	X	X	PR	1 1. 7 9	T 3 B	6 3	3 +	2	1	X	1	2	1	2
B-558 7/10	4 5	S	S	N	N	PAI CAP, 2 TIAS COM CA MAMA	X	X	X	PR	1 5	T 2 C	7 3	4 +	2	1	1	2	2	1	1

**Legenda:** N<sup>1</sup>= Não; S<sup>2</sup>=Sim; X<sup>3</sup>= não consta no prontuário. Características patológicas: 1<sup>a</sup>= presença; 2<sup>b</sup>= ausência; 3<sup>c</sup>= vesicular; TTO=tratamento, PT= estágio patológico; ANGIO LINF= angiolinfático; LND POS= linfonodo positivo; ORG CONF= órgão confinado; HAS= hipertensão; DM= diabetes.

## 10. Anexo



### FISH em tecido incluído em parafina: *Four Colour PTEN Deletion Probe*

O protocolo de FISH descrito abaixo é recomendado para cortes histológicos, material incluído em parafina, de **5µm** montados em lâminas silanizadas ou apropriadas para cortes histológicos.

### Materiais e Equipamentos

**Tabela 1.** Reagentes, equipamentos e material de consumo

Reagentes e Soluções	Equipamento	Material de consumo
Xileno	Banho-maria (80°C e 37°C)	
100% EtOH	Borel ou Cuba (plástico e vidro)	Lâminas silanizadas ou carregadas Positivamente
85% EtOH	Cronômetro	Lamínulas (22x40 e 22x50)
70% EtOH	Pinça	Rubber Cement
20x SSC	Caneta com ponta de diamante	Microtubos de 1 ml
2x SSC (pH 7.0)		Pipetas sorológicas
dH <sub>2</sub> O	Micropipeta e ponteiras	pHmetro
Pepsina (Porcine Gastric Mucosa)(Sigma-Aldrich, Cat # P6887)	Vortex	Lenço de papel ( <i>Kimwipes</i> )
HCl 1N	Microcentrífuga	
HCl 0.01N	Proveta, balão volumétrico	
HCl 0.2N	Termômetro	
IGEPAL(Sigma-Aldrich, Cat # P6887)	Microscópio de fluorescência equipado com os filtros recomendados	
0.4x SSC/0.3% Igepal	Placa aquecida (45°C)	



	Agitador magnético
Cymogen DX PTEN FISH probe	Barra magnética
DAPI II (Abbott Cat# 32-804831)	ThermoBrite Hybridization Instrument (Abbott Cat# 30-144110)
Citrato de sódio 10 mM / EDTA 2 mM (pH 6,4)	Incubadora (37°C e 65°C)
Locus-specific Hybridization Buffer (Abbott # 32-804826)	Microscópio com contraste de fase

## Reagentes e Soluções

*Pepsina: solução de estoque*

Solução de estoque (75000U/ml)

- Adicionar 178.57 mg de pepsina (4200 U/mg – Sigma Cat # P6887) em 10mL de dH<sub>2</sub>O. Há uma grande variação na U/mg, portanto deve-se conferir e ajustar a diluição corretamente de acordo com a concentração da pepsina utilizada;
- Distribua a solução de estoque em alíquotas de 0.5 ml e mantenha-as à -20°C no máximo por 3 meses;

Solução de uso: o preparo da solução de uso deve ser realizada no momento da sua aplicação. Adicione 0.5 ml da solução de estoque em 49.5 ml da solução 0.01N HCl pré-aquecida a 37°C.

Observação: A pepsina estoque deve ser adicionada IMEDIATAMENTE antes do início da digestão enzimática.

*2x SSC (100 ml) pH 7.0*

- 10 ml de 20x SSC
- 90 ml de dH<sub>2</sub>O
- Ajustar o pH com 1N HCL ou 1N NaOH

*0.4x SSC/0.3% IGEPAL (500 ml)*

- 100 ml de 2xSSC (pH 7.0)
- 398.5 ml de dH<sub>2</sub>O
- 1.5 ml de IGEPAL (Sigma-Aldrich, Cat # P6887)
- Adicionar 1.5 mL de IGEPAL com o auxílio de uma pipeta sorológica.

Ressuspender a solução 10 vezes com a pipeta para evitar qualquer resíduo do reagente IGEPAL na pipeta.

- Misturar a solução no agitador magnético a 40-50°C para a diluição completa do IGEPAL. Armazenar a solução em frasco escuro a temperatura ambiente por no máximo por 30 dias.

*HCl 0.01N (50 ml)*

- 0.5 ml de 1N HCl
- 49.5 ml de dH<sub>2</sub>O

*HCl 0.2N (50 ml)*

- 10 ml de 1N HCl
- 40 ml de dH<sub>2</sub>O

*Citrato de sódio 1 M*

- Medir 500mL de dH<sub>2</sub>O e adicionar metade deste volume à um frasco volumétrico de 1 litro
- Adicionar 147 g de *Citrate Powder* (Sigma Cat# S1804)
- Dissolver completamente o citrato de sódio; adicionar dH<sub>2</sub>O remanescente até volume final de 500 ml
- Ajustar o pH (6,4) com solução HCl 1N
- Autoclavar à 121°C por 20 minutos

*Citrato de sódio 10 mM/ EDTA 2 mM (500 mL):*

- 493 ml de dH<sub>2</sub>O
- 5 ml de Citrato de sódio 1 M (pH 6.4)
- 2 ml de EDTA, 0.5M
- Misturar bem

*70% EtOH*

- 350 ml de 100% EtOH;
- Completar o volume para 500 ml com dH<sub>2</sub>O.

*85% EtOH*

- 425 ml de 100% EtOH
- Completar o volume para 500 ml com dH<sub>2</sub>O

## Procedimento

### *Amostras*

Cortes histológicos incluídos em parafina de 5 micrômetros de espessura montados em lâminas silanizadas.

### *Controle de Qualidade*

- Lâminas controles (mesmo tipo de tecido ou metáfases) devem ser utilizadas para avaliação da eficiência da técnica de FISH e para a enumeração dos sinais.
- Lâminas controles devem ser realizadas em cada procedimento de FISH.
- Todas as lâminas de FISH devem ser adequadamente avaliadas de acordo com o critério previamente estabelecido (por exemplo: critério descrito no *“Principles of FISH Scoring Selection of Cells and Signal Enumeration”* ([http://ptendeletion.net/?page\\_id=26](http://ptendeletion.net/?page_id=26)).
- Temperatura de todos os reagentes e soluções devem estar averiguadas antes do início do procedimento de FISH.
- Para cada sonda, os valores de *“cut off”* devem ser previamente estabelecidos.
- Qualidade de hibridação deve ser avaliada de acordo com os parâmetros de qualidade pré-determinados pelo laboratório.
- Identificação das lâminas deve ser realizada de acordo com os critérios do laboratório.

## Protocolo

### Primeiro dia:

- Incubar a lâmina contendo o corte histológico (5µm) a 65 °C, por 16 horas;
- Retirar a parafina em 3 lavagens de xileno, 10 minutos cada, temperatura ambiente. Secar as lâminas em temperatura ambiente;
- Lavar as lâminas em etanol 100%, duas vezes, 5 minutos cada, temperatura ambiente. Secar as lâminas em temperatura ambiente;
- Pré-tratamento da lâminas. **IMPORTANTE:** As lâminas dever ser imersas imediatamente de uma solução a outra para evitar a secagem das mesmas durante o procedimento:
  - a. Incubar em HCl 0.2N, temperatura ambiente por 30 minutos.
  - b. Incubar em Citrato de sódio 10 mM/ EDTA 2 mM a 80°C por 45 minutos.

- c. Incubar em 2xSSC, temperatura ambiente por 2 minutos.
- d. Incubar em dH<sub>2</sub>O, temperatura ambiente por 10 minutos.
- e. Incubar em HCl 0.2N, temperatura ambiente por 2 minutos.
- f. Adicionar 0.5 ml da solução de estoque da pepsina (75000U/ml) em 49.95 ml de HCl 0.01N.
- g. Incubar em pepsina/ 0.01N HCl a 37°C por 15 minutos.

*Observação: O tempo de incubação na solução da pepsina depende do tecido, tamanho do corte histológico, fixação do material, heterogeneidade celular, dentre outros fatores.*

- h. Incubar as lâminas em dH<sub>2</sub>O, temperatura ambiente por 10 minutos imediatamente após a retira-las da solução de pepsina/ 0.01N HCl.
- i. Incubar em 2xSSC a temperatura ambiente, por 5 minutos.
- j. Desidratar em série de etanol 70%, 85% e 100% a temperatura ambiente e, secar.
- k. Observar a morfologia celular com o auxílio do microscópio de contraste de fase: determinar a eficiência da digestão do tecido; avaliar se os núcleos encontram-se visíveis e distintos, não cobertos por restos celulares e com margem celular bem definida. Se necessário, a lâmina pode ser incubada novamente na pepsina/ 0.01N HCl. Cortes histológicos com a maioria das células com aparência “fantasma” devem ser descartados. Nesse caso, os núcleos apresentam o interior vazio, extremamente digerido e o tempo de incubação na pepsina/ 0.01N HCl deve ser diminuído.

- Aquecer a sonda a 37°C por 5 minutos;
- Agitar em Vortex e centrifugar rapidamente;
  - Aquecer as lâminas a 45°C por 5 minutos;
  - Aplicar 10 µl da sonda na região do corte histológico e cobrir com lamínula de vidro (22x30). Vedar com cola (*rubber cement*);
  - Co-denaturar em thermobrite a 83°C, por 10 minutos. IMPORTANTE: calibrar a temperatura do thermobrite antes de usá-lo;
  - Incubar as lâminas em câmara úmida a 37°C, por um período de 16 horas.

### Segundo dia:

#### Lavagem pós-hibridação

- Remover com cuidado o *rubber cement* e a lamínula de vidro;
  - Incubar a lâmina em 0.4x SSC/0.3% Igepal a 72°C por 2 minutos (acrescentar 0.2°C para cada lâmina, sendo no máximo 73°C);
  - Lavar em 2xSSC a temperatura ambiente, por 5 minutos;
  - Preparar a diluição 1:1 do reagente Vysis DAPI II em Vectashield Mounting Medium. Aplicar 25 µl de DAPI II diluído e cobrir com lamínula de vidro

**Tabela 2.** Protocolo

	<b>Procedimento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo de incubação</b>
<b>Incubar as lâminas a 65°C por 16 horas</b>			
<b>Primeiro dia</b>			
1	Xileno (3 lavagens)	TA	10 minutos cada
2	Secar as lâminas	TA	
3	100% ETOH (2 lavagens)	TA	5 minutos cada
4	Secar as lâminas	TA	
5	Incubar em HCl 0.2N	TA	30 minutos
6	Incubar em CitratoNa/ EDTA previamente aquecido	80°C	45 minutos
7	2x SSC	TA	2 minutos
8	dH2O	TA	10 minutos
9	Incubar em HCl 0.2N	TA	2 minutos
10	Incubar em pepsina/ HCl 0.01N a 37°C previamente aquecida	37°C	15 minutos
11	dH2O	TA	10 minutos
12	2x SSC	TA	5 minutos
13	70%, 85% e 100% EtOH	TA	2 minutos cada
14	Secar as lâminas	TA	
15	Avaliar a morfologia celular		
16	Preparar a sonda de acordo com o protocolo recomendado pelo laboratório		
17	Aquecer as lâminas	45°C	5 minutos
18	Apicar a sonda e cobrir com lamínula (22x30)		
19	Vedar com <i>rubber cement</i>		
20	Co-denaturar no thermobrite	83°C	10 minutos
21	Incubar a lamina para hibridação <i>in situ</i>	37°C	16 horas
<b>Segundo dia</b>			
22	Remover com cuidado o rubber cement e lamínula		
23	0.4x SSC/0.3% Igepal	72°C	2 minutos
24	2x SSC	TA	5 minutos
25	Aplicar DAPI II e cobrir com lamínula (22x50)		
TA: temperatura ambiente			