

Polimorfismo -160 C/A no Promotor do Gene da E-caderina e Risco de Cancro da Próstata numa População Portuguesa

.....

Girão C¹, Girão H², Cortes L¹, Faro C¹

1 – Centro de Neurociências – Universidade de Coimbra
2 – IBILI – Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra

Resumo

Actualmente, nos países desenvolvidos, o cancro é a segunda causa de morte, depois das doenças coronárias. O adenocarcinoma da próstata é o segundo cancro mais mortal no homem, com idade superior a 55 anos. Mutações, herdadas ou adquiridas, nos genes que controlam o crescimento, combinadas com a susceptibilidade individual, são as principais causas de cancro. A susceptibilidade inclui idade, sexo, estado imunológico, estado nutricional, genético e étnico. Estudos recentes mostram que algumas mutações no promotor do gene da E-caderina estão associadas ao risco de cancro.

A E-caderina é uma proteína membranar, dependente de Ca²⁺, envolvida na adesão celular, com um papel importante na formação e manutenção dos tecidos sólidos, no desenvolvimento morfogénico e manutenção do fenótipo epitelial. Neste estudo caracterizamos a população portuguesa, da Região Centro, relativamente ao SNP no par de bases -160, no promotor do gene da E-caderina e determinamos o risco relativo de cancro da próstata associado com o referido polimorfismo. Foram genotipados sessenta e um homens diagnosticados com adenocarcinoma da próstata e noventa e seis controlos. Os genótipos diferem significativamente entre casos e controlos. Os portadores do alelo A (AA e AC) apresentam um risco relativo de adenocarcinoma da próstata mais elevado (OR=1,42, 95% CI 0,75 – 2,7), comparado com o genótipo CC. O genótipo AC tem um risco aumentado de adenocarcinoma da próstata (OR=2, 95% CI 1,0 – 3,9) e o genótipo AA tem um risco diminuído (OR=0,266 95% CI 0,05 – 1,25), comparado com o genótipo CC. Verificamos, também, a diminuição dos níveis de E-caderina na membrana plasmática, que foram avaliados por microscopia confocal e confirmados por Western blot. Verificamos que em doentes com o polimorfismo AC, as células tumorais da próstata apresentam uma diminuição de E-caderina na membrana plasmática comparadas com as células normais. Nos doentes com genótipo CC também verificamos uma diminuição dos níveis de E-caderina, ainda que menos acentuada. Os resultados sugerem uma associação do polimorfismo com cancro da próstata, sendo que o genótipo AC apresenta uma maior susceptibilidade para o referido cancro.

.....

Introdução

O cancro é uma patologia conhecida desde o momento em que as primeiras sociedades aprenderam a registar as suas actividades. Já era bem conhecido dos Egípcios e das sociedades seguintes, mas como muitos dos cancros só se manifestam numa fase tardia da vida, o número de pessoas que sobreviviam à “idade do cancro” era relativamente pequeno. O número de cancros diagnosticados aumentou a partir de meados do século XIX, quando a esperança de vida começou a aumentar, graças à implementação da saúde pública e cuidados médicos, permitindo a diminuição de doenças que no passado eram as principais causas de morte, como doenças infantis e doenças infecciosas.

Embora as doenças de coração e vasos sanguíneos ainda sejam a principal causa de morte nas pessoas mais idosas, o cancro constitui um grave problema nos países mais desenvolvidos.

Um tumor é um tecido novo, constituído por células que crescem de forma descontrolada, não respeitando as regras que controlam o crescimento normal e apresentam características diferentes das células normais do órgão do qual derivam. Estas alterações são devidas a mutações nos genes que controlam o crescimento, podendo essas mutações ser herdadas ou adquiridas por exposição continuada a factores carcinogénicos, incluindo factores de natureza física, química, viral. Além das mutações genéticas, o aparecimento e desenvolvimento do tumor depende também da susceptibilidade individual. Esta susceptibilidade, que inclui idade, sexo, estado imunológico, estado nutricional, genético e étnico, por vezes, torna difícil estabelecer causas para alguns tipos de cancro. O processo carcinogénico, desde a exposição aos agentes mutantes até à manifestação dos sintomas clínicos, é longo e assintomático, podendo durar décadas, pelo que a prevenção e detecção precoce é importante, tornando-se necessário encontrar métodos rápidos e não invasivos que permitam essa detecção, e cuja razão custo / benefício seja aceitável.

Actualmente, o cancro constitui a segunda causa de morte, a seguir às doenças coronárias. Nos homens com idade superior a 55 anos o cancro da próstata constitui o segundo cancro mais mortal, a seguir ao cancro do pulmão e a sua incidência está a aumentar em muitos países, incluindo Portugal.

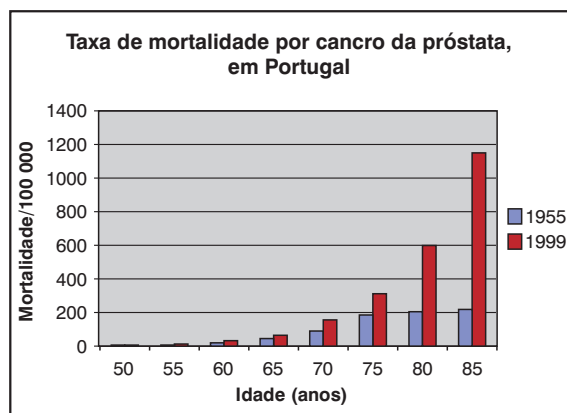


Fig. 1: Taxa de mortalidade em Portugal, por ano, nas últimas cinco décadas.

Cancro da próstata

A taxa de mortalidade, causada por cancro da próstata, nas últimas 6 décadas aumentou cerca de 14%, no entanto continua a ser relativamente baixa quando comparada com o número de pacientes diagnosticados por ano.

O número de novos casos de homens diagnosticados com adenocarcinoma da próstata, por ano, varia com as raças populacionais. Bernstein e Ross (1991) verificaram que esta patologia é mais frequente nos Afro-Americanos, com cerca de 116/100000, por ano. Nos Caucasianos e brancos dos Estados Unidos a incidência é de 71/100000, enquanto que nos asiáticos a taxa é mais baixa (Japoneses, 39/100000; Chineses, 28/100000), (Nomura 1991). Estas diferenças devem-se, muito provavelmente, à combinação de factores genéticos e ambientais.

No caso de Portugal, segundo dados da OMS, a taxa de mortalidade por cancro da próstata, aumentou cerca de seis vezes, nas últimas cinco décadas (Fig.1).

Desenvolvimento multifásico do cancro da próstata

A epidemiologia de muitos tumores sugere que o cancro é um processo multifásico, sendo o genoma sequencialmente sujeito a um número randomizado de agressões. Cálculos estatísticos baseados no aumento da frequência de cancro com a idade estimam que sejam necessárias quatro a seis agressões para se iniciar a formação do cancro.

No desenvolvimento do cancro da próstata, à semelhança da generalidade dos outros cancros, é possível distinguir três importantes fases. Numa 1ª

fase, denominada de fase de iniciação, ocorre a lesão do DNA da célula, originando um clone de células diferentes, que pode permanecer muito tempo numa fase oculta. Na 2ª fase ocorre a progressão da fase oculta para uma fase clinicamente detectável e localizada, envolvendo a desdiferenciação das células. Este processo parece implicar a existência de repetidas agressões à célula, o que faz que em muitos homens nunca haja progressão. A 3ª fase caracteriza-se pela metastização do cancro para nódulos linfáticos, ossos e outros órgãos. Assim, enquanto alterações morfológicas associadas com a iniciação são relativamente comuns e ocorrem numa fase precoce da vida, a progressão para o carcinoma invasivo é significativamente menos comum e ocorre numa população mais limitada e dependendo da idade. Isto poderá explicar que, embora, a prevalência do cancro 'histológico' da próstata se distribuía igualmente em todo o mundo, a manifestação clínica desenvolve-se de diferente modo nos vários países, dependendo de factores ambientais que podem funcionar como factores promotores da progressão.

Foram já identificadas várias alterações cromossómicas e envolvimento de diversos genes no cancro da próstata. No entanto, é a acumulação de acontecimentos, mais do que a ordem, que são responsáveis pelo mau comportamento dos genes, no desenvolvimento do cancro prostático.

Factores etiológicos e de predisposição para o cancro da próstata

Uma característica importante do cancro da próstata é a sua forte associação com a idade, sendo esta um importante factor de risco para este tipo de cancro. Além da idade e do grupo populacional, outro factor de risco importante no cancro da próstata é a história familiar da doença (Narod *et al.*, 1995), ainda que os factores hereditários expliquem uma percentagem relativamente pequena (aproximadamente 10%) de cancro da próstata e estejam geralmente associados à manifestação precoce da doença (Cannon *et al.*, 1982; Carter *et al.*, 1992, 1993). Ainda assim, o cancro da próstata é considerado o quarto cancro com associação familiar mais forte, ultrapassando o da mama ou o do colon, considerados de componente genética significativa. Foi em 1956 que Morganti e colaboradores associaram, pela primeira vez, o cancro da próstata com a história familiar. Outros estudos posteriores (Steinberg *et al.*,

1990; Gronberg *et al.*, 1994, 1996; Whittmore *et al.*, 1995b; Page *et al.*, 1997; Lichtenstein *et al.*, 2000) sugerem a existência de genes susceptíveis para o cancro da próstata, que poderão ser herdados na forma dominante autossómica de um alelo raro e de alto risco (Monroe *et al.*, 1995; Narod *et al.*, 1995). Outros resultados moleculares têm sugerido a existência de genes de alto risco, com possibilidade de localização em mais do que um *locus* (Eeles, 1999). No entanto, embora seja difícil a identificação de *loci* com susceptibilidade genética para o cancro da próstata, foram já referidos *loci* localizados nos cromossomas 1q24-25 (HPC1), 1q42 (PCAP), 1p36 (CAPB), 8p22-23, cromossoma Xq27-28 (HPCX), 17p11 (ELAC2) e 20q13 (HPC 20), (Jacques Simard *et al.*, 2002; Cunningham JM *et al.*, 2003) (Fig. 2). Outros estudos epidemiológicos de cancro da próstata e mama têm revelado a associação destes cancros em determinadas famílias (Anderson e Badzioch, 1992; Tulinius *et al.*, 1992). Também foi estimado um aumento do risco de cancro da próstata em homens portadores de mutações no gene BRCA1 (Ford *et al.*, 1994), assim como se verificou um aumento do risco relativo de cancro da próstata em famílias com mutações no gene BRCA2 (The Breast Câncer Linkage Consortium, 1999). Cussent e Valeri sugerem que a grande proporção de cancro familiar

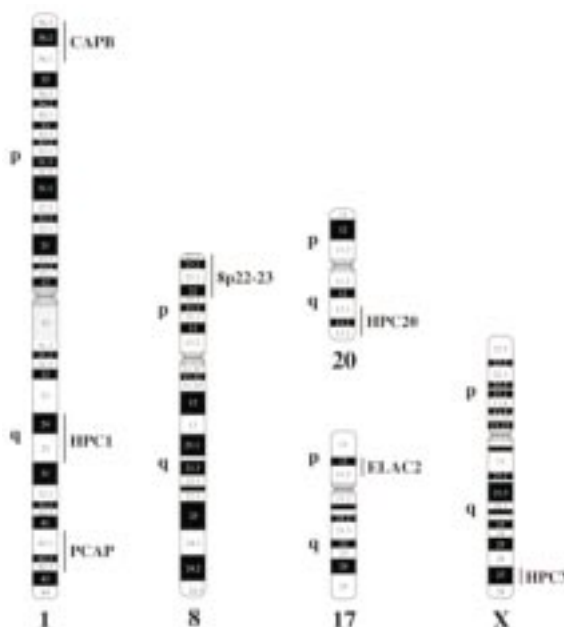


Fig. 2: Localização dos *loci* com susceptibilidade para o cancro da próstata referenciados na literatura.

da próstata é devida não a poucas mutações em genes maiores, transmitidas de acordo com uma herança monogénica, mas devido a partilha familiar de alelos em muitos *loci*, em que cada um contribui com um pequeno aumento do risco de cancro (Cussett e Valeri, 2001).

Supõe-se que a dieta e factores ambientais desempenhem um papel chave semelhante ao que acontece em outros cancros epiteliais comuns (Carter *et al.*, 1990 a). Possivelmente o risco de cancro está associado com o consumo de gorduras e sobretudo gorduras saturadas, cuja associação foi maior nos Aso-Americanos (Whittemore *et al.*, 1995, WHO, 1980-1988).

As hormonas, nomeadamente as hormonas esteróides, desempenham também um papel importante no cancro da próstata, podendo intervir na sinalização de vias de transdução através do seu receptor e têm um papel importante em todas as fases da carcinogénese da próstata.

Base molecular do cancro da próstata

Apesar do progresso no diagnóstico e tratamento, o cancro da próstata constitui uma das principais causas de morte nos homens de países industrializados do Ocidente

A base molecular do cancro tem sido um enigma, durante muitas décadas. Talvez porque atinge, sobretudo, homens de meia-idade, o cancro da próstata não tem sido alvo de grandes atenções e investimento por parte da investigação molecular. No entanto, o conhecimento adquirido no estudo de outros tumores tem contribuído para a evolução no conhecimento do cancro da próstata. Tradicionalmente, a investigação relativa ao cancro da próstata centrava-se principalmente nos androgénios. No entanto, recentemente foi descrito que genes supressor tumoral e oncogenes importantes em outros tipos de cancro estão também envolvidos no cancro da próstata (Schulz, 2003).

A perda alélica é um processo comum no adenocarcinoma prostático, presente em mais de 50% dos casos nos cromossomas 8p, 10q, 13q, 16q (Carter *et al.*, 1990b, Bergerheim *et al.*, 1991; Macoska *et al.*, 1993; Sakr *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 1995; Cher *et al.*, 1996; Iltmann 1996; Trybus *et al.*, 1996; Saric *et al.*, 1999; Bostwick, 1996). Entre os potenciais genes candidatos localizados em 10q23, está PTEN/ MMAC1. O gene PTEN codifica uma fosfatase lipídica cujo

principal substrato é PIP-3, resultando a sua perda na inactivação da actividade da cinase PKB/AKT, diminuindo a sensibilidade para a morte celular. Dois estudos independentes (Li *et al.*, 1997, e Steck *et al.*, 1997) mostraram que PTEN estava mutado em todas as quatro linhas celulares prostáticas examinadas. Um segundo candidato localizado no cromossoma 10q25 é o gene MXI1, que codifica uma proteína de ligação a Myc (Eagle *et al.*, 1995). Esta proteína é particularmente importante dada a sua íntima associação com a proteína Myc, que está envolvida no cancro da próstata, e que se localiza numa região, frequentemente amplificada, do cromossoma 8q (Van den Berg *et al.*, 1995; Budendorf *et al.*, 1999). A proteína c-Myc é uma fosfoproteína nuclear cuja função é a promoção da replicação de DNA, a regulação da transição da fase G0 para a fase G1 do ciclo celular e controlo da diferenciação celular. Enquanto a perda do cromossoma 10q está, provavelmente envolvida numa fase mais tardia da progressão do cancro da próstata, a perda de regiões específicas do cromossoma 8p, que ocorre em cerca de 80% de tumores prostáticos, é um dos principais acontecimentos na fase inicial da carcinogénese da próstata (Chang *et al.*, 1994; Imbert *et al.*, 1996; Wistuba *et al.*, 1999). A perda de material do cromossoma 13, incluindo a região que contém o gene Rb ocorre em pelo menos 50% dos tumores prostáticos (Cooney *et al.*, 1996b; Melamed *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998). Curiosamente, a proteína Rb foi descrita como reguladora do processo apoptótico das células prostáticas, particularmente em resposta aos androgénios (Zhao *et al.*, 1997; Bowen *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 1998).

A inactivação do p53, gene supressor tumoral localizado no cromossoma 17p, está presente em mais de 25% de cancros prostáticos avançados, sendo raro em cancros precoces, sugerindo que possa actuar na fase tardia da progressão (Henke *et al.*, 1994; Voeller *et al.*, 1994; Prendergast *et al.*, 1996). O gene da E-caderina, que funciona como gene supressor tumoral e supressor de metástases, é outro factor envolvido no cancro da próstata.

E-caderina

A formação de uma “sociedade celular”, constituindo estruturas mais complexas denominadas tecidos, dependem largamente da formação de adesões célula-célula. As caderinas são as principais proteínas envolvidas na adesão celular, contribuindo

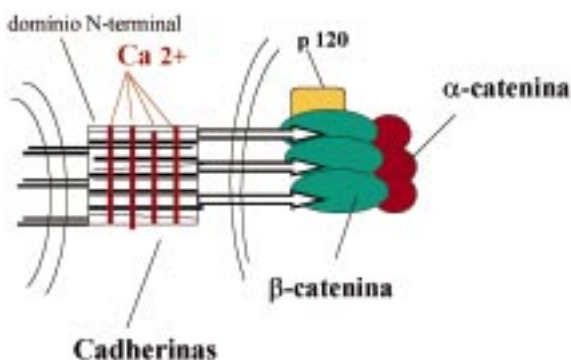


Fig. 3: As caderinas medeiam o próprio reconhecimento por ligação a uma caderina idêntica

para a formação e manutenção de tecidos sólidos (Takeichi, 1991), para o desenvolvimento morfológico e manutenção da polaridade celular. As caderinas são proteínas membranares, dependentes de cálcio e pertencentes à família de proteínas de adesão homofílicas, actuando como ligando e receptor, sendo expressas por vários tipos de tecidos. A E-caderina é expressa de forma predominante pelo tecido epitelial, contribuindo para a manutenção do seu fenótipo (Takeichi, 1991). O gene localiza-se no cromossoma 16q22.1 (Natt *et al.*, 1989) e ocupa uma região de aproximadamente 100 kb do DNA genómico. Tem 16 exões e um intrão 2, longo, com 65 kb. No intrão 1 há uma 5' ilha CpG de alta densidade, que pode estar implicada na regulação da transcrição durante a embriogénese e carcinogénese (Berx *et al.*, 1995a). O mRNA tem aproximadamente 4,8 kb.

A E-caderina é uma glicoproteína da superfície celular, cujo polipeptídeo precursor tem 135 kDa, que é processado numa proteína madura com 120 kDa (Shore e Nelson, 1991). A forma madura é libertada para a membrana e na presença de Ca^{2+} , dimeriza numa conformação *cis* com moléculas de E-caderina de células vizinhas. A adesão intercelular mediada pela E-caderina depende da formação de complexos, na presença de Ca^{2+} , com outras proteínas, nomeadamente cateninas. A E-caderina é uma proteína transmembranar de três grandes domínios: o domínio maior, extracelular que medeia a adesão homotípica com caderinas de células vizinhas; um domínio transmembranar menor e o domínio citoplasmático (Berx *et al.*, 1998) que interactua com proteínas citoplasmáticas, incluindo α -, β - e γ -cateninas, (Fig. 3), e cuja interacção é necessária para manter

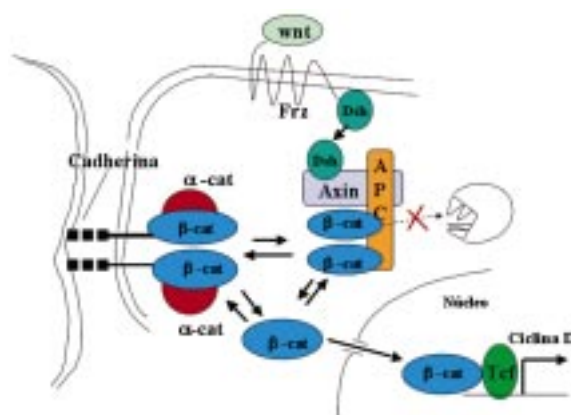


Fig.4: Ligação da E-caderina às proteínas citoplasmáticas α , β e γ cateninas. No espaço intercelular os dímeros de E-caderina, estabilizados por íões Ca^{2+} , interagem através dos seus domínios extracelulares com os dímeros de E-caderina de uma célula vizinha.

a funcionalidade e integridade do tecido (Kemler, 1989). Mas as cateninas não estão só envolvidas na ancoragem à superfície celular. A p120, que parece estar envolvida na modulação negativa da função da caderina, liga-se a um factor de transcrição (Kaiso zinc-finger) cuja função desta interacção ainda não é bem conhecida (Daniel, 1999). No entanto há uma isoforma da p120, de localização nuclear parcial, em tumores de células epiteliais cuja expressão da E-caderina está afectada (van Hengel, 1999). Também, cada vez é mais notável que a γ -catenina tem um papel central na via de transdução de sinal iniciada por Wnt/Wingless (Willert, 1998).

Alterações da função da E-caderina podem dever-se a diversos factos, incluindo mutações no seu DNA (Suzuki 1996, Schalken, 1995) que originam uma sequência polipeptídica alterada ou metilação de ilhas 5'-CpG do gene da E-caderina.

Para além de estar envolvida na formação de junções aderentes entre as células, as caderinas têm também um papel importante na regulação da quantidade de β -catenina livre no citoplasma, limitando assim a quantidade de β -catenina que pode entrar no núcleo. No núcleo a β -catenina liga-se a factores de transcrição LEF e Tcf e activa a expressão de genes tais como ciclina D1, estimulando, assim, a proliferação celular (Stockinger *et al.*, 2001) (fig. 4). Para além da sua ligação à caderina membranares, os níveis de cateninas livres no citoplasma também podem ser reguladas através da sua degradação. Após ligação

à APC, que permite a ligação da catenina à cinase GSK3, a catenina é fosforilada. A fosforilação da proteína funciona como um sinal para ubiquitinação e consequente degradação pelo proteosoma. Por outro lado a via de sinalização Wnt impede a formação do complexo entre GSK3 e o APC, impedindo assim a fosforilação da β -catenina, inibindo a sua degradação (Daniels *et al.*, 2001).

A perda da caderina resulta na libertação da β -catenina para o citoplasma. Um aumento de caderina conduz a uma diminuição da catenina disponível para migrar para o núcleo impedindo a expressão do gene da ciclina D1. Efeito semelhante se observa quando há aumento da expressão de APC. Assim, a quantidade de catenina no citoplasma pode ser controlada através da adesão celular ou através de factores de sinalização extracelular.

Objectivo

O objectivo do nosso trabalho foi

- 1 – Caracterizar a população portuguesa relativamente ao SNP C/A no par de bases –160 da região do promotor, no gene da E-caderina.
- 2 – determinar o risco relativo de cancro da próstata associado a este polimorfismo.

Material e Métodos

População estudada

As amostras de sangue periférico foram colhidas de 61 homens, diagnosticados com cancro da próstata, no Instituto Português de Oncologia de Coimbra, cuja média de idades foi de 69,6 anos (49 – 82 anos). As amostras de sangue controlo foram obtidas de 96 homens, que fazem parte de uma base de dados existente no Laboratório de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, sem qualquer patologia conhecida, cuja média de idades foi de 46,9 anos (26 – 80 anos). Todos os casos e controlos são Caucasianos.

Análise do polimorfismo

O DNA foi obtido de leucócitos de sangue periférico, colhido em tubo estéril (de 10ml), contendo anti-coagulante (EDTA), e utilizando o kit de extração da Roche.

Um fragmento de 190 pb, contendo o SNP C/A na posição –160, relativamente ao local de início da

transcrição na região do promotor do gene da E-caderina, foi amplificado por PCR, usando o primer Forward 5'-TCCCAGGTCTTAGTGAGCCA-3' e o primer Reverse 3'-ACGACTAACCGACACCGG-5', num volume final de 25 μ l contendo 30ng de DNA, 900nM de cada primer, 200nM de dNTP's e 1xTaq. O protocolo utilizado foi o seguinte: 94° C durante 1 minuto, um ciclo; 94° C durante 40 segundos, 64° C durante 40 segundos e 72° C durante 40 segundos, 35 ciclos; seguido de um ciclo de elongação de 72° C durante 10 minutos. Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *BstE2*, que cliva especificamente fragmentos com o alelo-C e *HincII* que cliva especificamente o fragmento com alelo-A. A digestão foi feita num volume final de 20 μ l, contendo 10l de DNA, 2 μ l de tampão, 0,3 μ l de enzima e 7,7 μ l água, durante 1h e 30 minutos a 60° C e a 37° C, respectivamente para a enzima *BstE2* e *HincII*. No caso da enzima *HincII* o volume de água utilizado foi de 7,5 μ l e 0,2 de BSA.. Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 3%.

Análise por imunofluorescência de fragmentos de próstata humana

Fragmentos da glândula prostática e da cápsula foram obtidos por prostatectomia radical e imediatamente congelados em azoto líquido. Foram feitas criosecções, com uma espessura de 15mm, num criostato Shandon, a –20°C. Essas secções foram fixadas em paraformaldeído 4%, preparado em tampão fosfato, durante 10 minutos, após o que foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e permeabilizadas com Triton X-100 1% v/v, preparado em PBS, durante 10 minutos. Após incubação com soro de cabra (1:10), durante 20 minutos, as amostras foram incubadas com anticorpos primários Sigma (St Louis, MO, USA), dirigidos ao domínio citoplasmático da E-caderina, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, as amostras foram incubadas com anticorpos secundários, durante 1 hora, à temperatura ambiente, após o que foram lavadas e montadas numa lamela com Glycergel (Dako). Todas as soluções usadas durante este processo foram preparadas em PBS, contendo 0,2% p/v albumina sérica bovina (BSA) e 0,02% de azida de sódio. Os controlos foram efectuados por omissão de anticorpo primário. Os anticorpos primários foram detectados usando fluoresceína-5-isotiocianato (FTIC) e os anticorpos secundários foram conjuga-

481 actgcccctg tccgcccga ctgtctctc tacaaaaagg caaaagaaaa aaaaaattag
 541 cctggcgtgg tgggtgacac ctgtactecc agctactaga gaggctgggg ccagaggacc
 601 gcttgagecc aggagttcga ggctgcagtg agctgtgac gcaccaactgc actccagctt
 661 gggtgaaaga gtgagcccga tctccaaaac gaacaacaa aaaatcccaa aaaacaaaag
 721 aactcagcca agtgtaaaag cctttctga **tcccaggctct tagtgageca ccggcggggc**
 781 tgggattcga acccagtgga atcagaaccg tgcaggctcc ataaccacc tagaccctag
 841 caactccagg ctgagggctc **accgcgtcta tgcgagccg ggtggcggg ccgtcagctc**
 901 cggcctgggg aggggtccgc **gctgctgatt ggetgtgccc** ggcaggtgan cctcagcca
 961 **atcagcggta** cggggggcgg tctccgggg ctcacctggc tgcagccacg cccccctct
 1021 **catg**ggcgtc ggaactgcaa agcacctgtg agcttgcgga agtcagttca gaetccagcc
 1081 cgetccagcc cggeccgacc cgaccgcacc cggegcctgc cctcgtctgg cgtcccggg
 1141 cagccatggg ccttgggagc cgcagcctct cggcgtctgt gctgctctg cag

Fig. 5: Parte da sequência do DNA da região do promotor, do gene da E-caderina, onde se encontram assinalados, os primers utilizados na reacção de PCR, para amplificação do segmento; na posição -160, o nucleotídeo polimórfico; a CCAAT box; na posição 1022, o início da transcrição; na posição 1146, o codão de iniciação da síntese da proteína, atg.

dos com Texas Red isotiocianato (TRITC). As imagens foram obtidas por microscopia confocal usando um sistema Bio-Rad MRC-600.

A presença de células cancerígenas e normais foram confirmadas por análise histológica, realizada no Laboratório de Anatomia Patológica Cedap de Coimbra.

Análise da proteína por Western Blotting

Pequenos fragmentos de próstata humana foram homogeneizados em tampão Tris 5 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, NaCl 190 mM, pH 8,0. As proteínas solúveis foram removidas por centrifugação a 100 000 rpm, durante 30 minutos e o sedimento foi ressuspenso em tampão de lise NaCl 190 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 6 mM, 2,5% Triton X-100, 0,2% SDS contendo uma mistura de inibidores de proteases, 2mM PMSF, 10 mM iodacetamida, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 500 mM. As amostras foram em seguida desnaturadas por incubação em tampão de Laemmli durante 30 minutos, a 37° e separadas por SDS-PAGE.

A presença de E-caderina foi avaliada por western blott, após transferência das proteínas para uma membrana de PVDF, e marcada com anticorpos monoclonais contra a E-caderina, obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). A intensidade das bandas, após o blotting, foi determinada por digitalização dos filmes por varrimento laser (Micotek, ArtixScan 1800f).

Análise estatística

A significância da distribuição genotípica, nos dois grupos, foi calculada usando o teste de X^2 com 2 graus de liberdade, utilizando o software SPSS, versão 11.1. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O risco específico ligado ao genótipo foi estimado utilizando o *odds ratios*, com limites de confiança 95%. Quer as frequências alélicas quer as genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, que foram testadas com o teste de X^2 com 1 grau de liberdade, considerando as diferenças significativas quando $p < 0,05$.

Tabela I: Frequências genótípicas e alélicas, do polimorfismo C/A -160 no promotor do gene da E-caderina.

	Doentes (n=61)	Normais (n=96)	Teste X²	p
Média de idades (Média ± d.p.)	69,6 ± 8,1	80 ± 14,8		
Genótipo (%)				
AA	2 (3,3)	14 (14,6)	9,257	0,010
AC	30 (49,2)	28 (29,2)		
CC	29 (47,5)	54 (56,3)		
Frequ. Alélica (%)				
A	29	29		

Resultados e Discussão

Como tem sido referido, o cancro é um processo de evolução longa, cuja manifestação clínica, normalmente, é tardia e a sua detecção é feita com base no diagnóstico histológico. Mas, o avanço da Biologia Molecular e a introdução de novas técnicas nesta área, começam a permitir fazer um diagnóstico molecular com identificação precoce do risco para desenvolver a doença. Este avanço na ciência reveste-se de grande importância, quando já estão identificadas mutações em genes implicados na proliferação celular. O cancro da próstata é uma patologia que se manifesta, geralmente, a partir dos 50/55 anos, o que parece desmotivar um pouco o interesse dos investigadores. No entanto, nos últimos anos, a investigação tem-se centrado na procura de marcadores precoces do cancro da próstata já identificados em outros cancros, nomeadamente em cancros epiteliais. Um estudo desenvolvido numa outra população demonstrou a associação entre o risco de cancro da próstata e o polimorfismo -160 C/A no promotor do gene da E-caderina (Verhage *et al.*, 2002). Assim, com base nestes resultados fomos analisar se o polimorfismo -160 C/A no promotor do gene da E-caderina pode conferir um aumento do risco de cancro da próstata na população portuguesa. Para isso foi estudada a frequência deste polimorfismo em 61 indivíduos com cancro da próstata e em 96 indivíduos considerados normais, cujos resultados estão registados na Tabela I. A análise genotípica destes indivíduos foi realizada usando duas enzimas de restrição, na digestão de fragmentos de 190 pb, amplificados por PCR, sendo que a enzima *BstE2*

cliva o fragmento com alelo C e a enzima *Hinc II* cliva o fragmento com alelo A (Fig.14). Os dois grupos considerados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de X²; 1 grau de liberdade).

As frequências dos genótipos CC, AC e AA para a população doente, em estudo, foram de 47,5, 49,2 e 3,3 respectivamente. As frequências dos controlos foram de 56,3, 29,2 e 14,6 respectivamente, que diferem significativamente dos valores dos doentes (p = 0,010), sugerindo uma associação entre o polimorfismo C/A -160 pb do promotor do gene da E-caderina e o aumento de risco de adenocarcinoma da próstata, no grupo de portugueses estudados, que fazem parte da população da Zona Centro do país.

A frequência no genótipo AA foi mais elevada nos controlos do que nos doentes (14,6% vs 3,3%), o que está de acordo com os resultados de Verhage (2002) e Jonsson (2004). No entanto, Hajdinjak (2004), num estudo realizado na população eslovena, encontrou maior frequência deste genótipo nos doentes, sendo uma diferença significativa nos doentes com menos de 70 anos, comparada com os normais (15,9% vs 7,4%). É de referir que os doentes homocigóticos AA, do nosso estudo, têm uma média de idade superior aos outros dois genótipos, CC e AC, respectivamente 79,0, 69,1 e 69,4. A frequência do alelo A nos doentes e controlos foi semelhante (0,29 ,p n.s.) mas mais baixa do que a frequência apresentada por outros autores, Li *et al* (2000), que foram 0,54 e 0,39, respectivamente para casos e controlos. Um estudo desenvolvido por Verhage (2002) apresenta frequências de 0,39 para casos e 0,25 para controlos numa população de 82 e 188 respectivamente. Jonsson (2004),

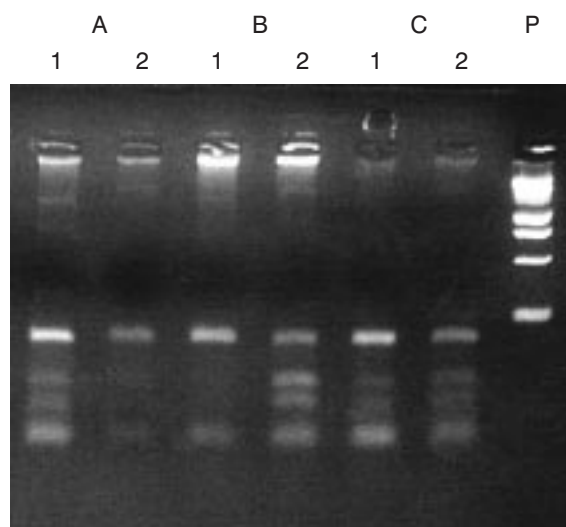


Fig. 6: Análise em gel de agarose, do polimorfismo C/A -160 no promotor da E-caderina,

P: Padrão

A: Genótipo AA; **B:** Genótipo CC; **C:** Genótipo AC

1: digestão com *Hinc II*

2: digestão com *BstE2*

num estudo realizado numa população sueca, apresenta 0,289 e 0,281, respectivamente para casos e controlos, e Hajdinjak (2004), numa população eslovena, apresenta 0,31 e 0,26. As frequências encontradas no nosso estudo estão de acordo com estes estudos referenciados, o que seria de esperar visto serem populações Caucasianas.

A Tabela II apresenta o *odds ratio* relativo ao genótipo e ao tipo de alelos do polimorfismo. Verificamos que o genótipo AA apresenta um risco de 0,27 vezes menor (95% IC 0,057 – 1,25) para cancro da próstata, comparado com o genótipo CC, sendo o risco do genótipo CA de 1,99 vezes maior (95% IC 1,00 – 3,96) do que o genótipo CC, embora não estatisticamente significativo. O risco de cancro para os portadores do alelo A (AA e AC) é de 1,42 (95% IC 0,75 – 2,7), valor mais baixo do que o referido por Verhage (2002), (OR=3,6, 95% CI 2,0-6,4). Jonsson (2004) não encontrou associação significativa entre o alelo A e cancro esporádico (OR=1,0; 95% CI=0,8-1,2) ou familiar (OR=1,4; 95%CI=0,9 – 2,2), contrariamente ao nosso estudo e ao resultado apresentado por Verhage em que se verificam frequências estatisticamente diferentes entre casos e controlos. Por outro lado, o risco de cancro hereditário está aumentado no genótipo AC (OR=1,7; 95%CI=1,0 – 2,7) e particularmente nos homozigóticos AA (OR=2,6; 95%CI 1,4 – 4,9). Os

nossos resultados estão de acordo com os estudos referidos, confirmando o polimorfismo C/A -160 no promotor da E-caderina como um novo factor de risco para o cancro da próstata, confirmando um maior risco do genótipo AC. No que se refere aos homozigóticos AA, o nosso estudo, tal como o de Jonsson, não encontrou um risco aumentado neste genótipo. No nosso estudo a doença manifestou-se mais tarde nos homozigóticos AA (média de idades $79 \pm 2,8$), quando comparamos este grupo com o genótipo CC e AC, (médias de idades respectivamente $69,1 \pm 7,7$ e $69,4 \pm 8,4$), como indicado na Tabela III. De acordo com estes resultados e com Wu *et al.*, (2002), e os restantes estudos, o genótipo AA parece ser um factor de protecção contra o adenocarcinoma da próstata, na população portuguesa. Todos os doentes do nosso estudo tinham um diagnóstico de adenocarcinoma da próstata efectuado dois anos antes e não temos conhecimento de história familiar ou hereditária. Porém, Verhage analisou doentes com cancro da próstata esporádico e familiar e não encontrou diferenças nas frequências deste polimorfismo, tal como Jonsson, que, encontrou sim um risco significativamente aumentado no cancro hereditário entre heterozigóticos. As diferenças encontradas nos vários estudos também poderão ser devidas, pelo menos em parte, à diferente selecção de casos e controlos

Tabela II – Genótipo e *odds ratio* (95% I.C.) dos doentes com adenocarcinoma da próstata.

Genótipo	Doentes OR (95% IC)
AA	0,266 (0,0565 a 1,2518)
AC	1,995 (1,006 a 3,9568)
CC (referência)	1,00
AA e AC	1,4187 (0,745 a 2,70)
CC (referência)	1,00

Tabela III – Genótipos e médias de idades do grupo de doentes

Genótipo	Frequência	Doentes	
		Média	Desvio padrão
AA	2	79,00	2,8
AC	30	69,43	8,4
CC	29	69,14	7,7

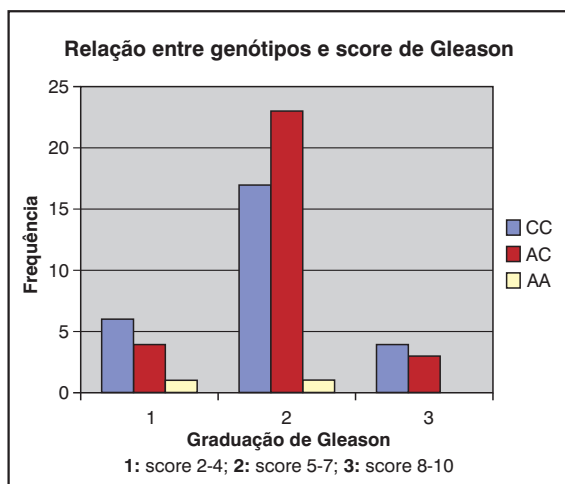


Fig.7: Distribuição dos genótipos, dos doentes, de acordo com o sistema de gradação de Gleason, considerando: **1:** score 2-4, tumor com células bem diferenciadas; **2:** score 5-7, tumor com células moderadamente diferenciadas; **3:** score 8-10, tumor com células fracamente diferenciadas. O score de Gleason representa a soma dos dois graus mais frequentes no tecido analisado.

ou devida à coexistência de alterações genéticas desconhecidas com baixa penetrância nas famílias, o que está de acordo com a teoria de Gong, (2002), que múltiplos genes com baixa penetrância podem ser responsáveis por muitos cancros prostáticos herdados. Comum a todos os estudos é o facto do polimorfismo em causa poder ser considerado como um factor de risco no cancro da próstata.

Genótipos e sua relação com a gradação de Gleason e Antígeno Específico da Próstata

Tentamos também estabelecer uma relação entre os genótipos e a gradação de Gleason e genótipos e valores de PSA, cujos valores foram determinados no Laboratório do Instituto Português de Oncologia de Coimbra e estão expressos nas figuras 7 e 8, respectivamente. Na figura 7, consideramos três grupos, que correspondem a três estadios de diferenciação celular e fazendo a sua análise verificamos que no intervalo 2-4 da gradação de Gleason, que corresponde a um adenocarcinoma com células bem diferenciadas, há uma frequência maior do genótipo CC, como seria de esperar, visto apresentar um menor risco de cancro da próstata, como discutimos anteriormente. No segundo grupo que inclui o intervalo 5-7 e corresponde a células moderadamente diferenciadas, verificamos uma elevada frequência

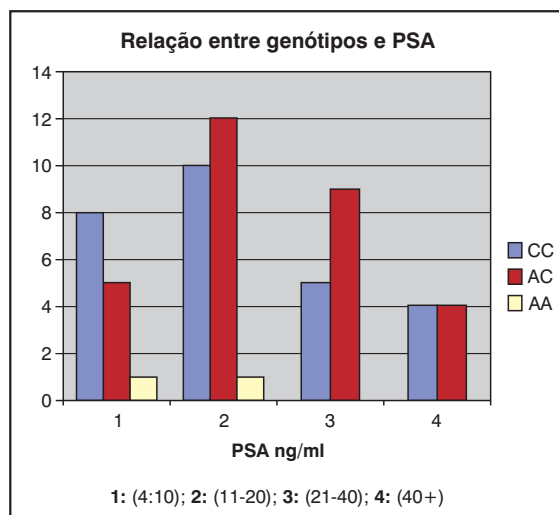


Fig.8: Relação entre genótipos e PSA, considerando quatro grupos de valores de PSA; **1:** 4-10ng/ml; **2:** 11-20ng/ml; **3:** 21-40ng/ml; **4:** > 40ng/ml

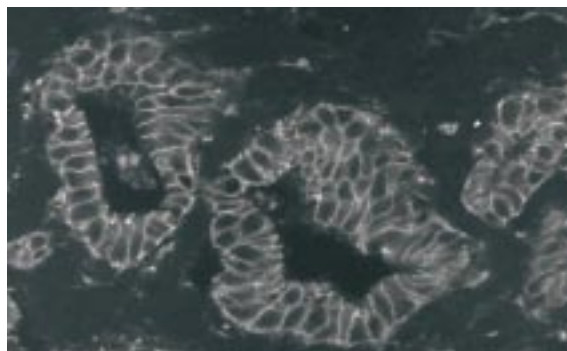
do genótipo AC, levando-nos a especular sobre a associação entre o genótipo AC e maior risco para desenvolver cancro da próstata. No terceiro grupo verifica-se igual frequência dos dois genótipos. De notar que o genótipo AA apresenta, apenas, dois casos com graus 4 e 5, incluído um no primeiro intervalo considerado e outro no segundo.

Hajdinjak (2004) não encontrou qualquer associação entre o polimorfismo e o grau de Gleason.

Na figura 8 consideramos quatro intervalos de valores de PSA e verificamos que no intervalo de 4 –10 ng/ml de PSA, o genótipo CC é o que apresenta maior frequência; nos grupos 2 e 3 aumenta a frequência do genótipo AC e no quarto grupo verificamos igualdade das frequências de AC e CC, que nos permite continuar a especular sobre a associação do genótipo AC e cancro da próstata.

Imunofluorescência – Com o objectivo de avaliar se a mutação na zona do promotor estava associada a uma alteração na distribuição subcelular da E-caderina, realizámos estudos de imunofluorescência em cortes histológicos de amostras de tecido prostático, do mesmo doente, contendo células normais e células tumorais. Para isso usamos anticorpos dirigidos contra a E-caderina e a localização da proteína no tecido determinada por microscopia confocal. O estudo foi feito a partir de fragmentos de próstata humana, obtidos por prostatectomia radical, de pacientes com genótipo CC e CA. Os resultados estão

Controlo



Tumor

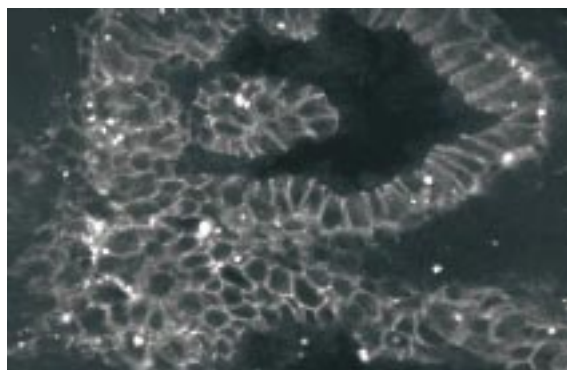
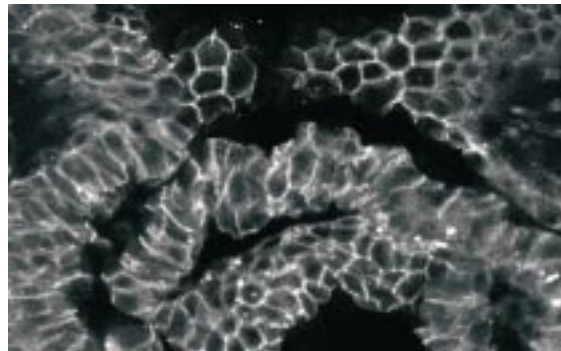


Fig.9: Imunofluorescência do Genótipo CC. Marcação das membranas com Ac anti-E caderina

Controlo



Tumor

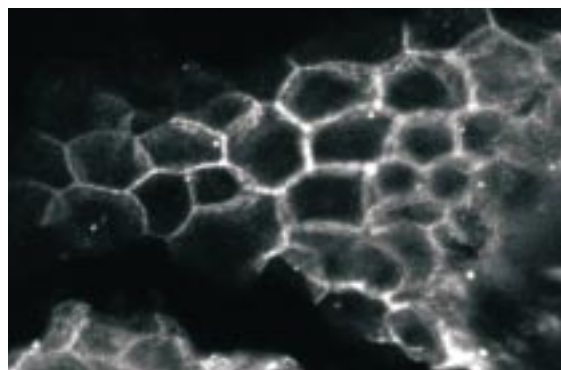


Fig.10: Imunofluorescência do Genótipo CA. Marcação das membranas com Ac anti-E-caderina

expressos nas Figs. 9 e 10, correspondendo respectivamente ao genótipo CC e AC e podemos verificar que, nas células normais, e tal como esperado, a maioria da E-caderina se encontra na membrana plasmática, na zona de contacto entre as células. No entanto, nas células tumorais verifica-se uma diminuição do sinal de fluorescência na membrana plasmática, comparada com as células controlo, o que sugere uma diminuição da quantidade de proteína na membrana, contribuindo para o enfraquecimento das ligações intercelulares. Este resultado está de acordo com os estudos feitos por outros autores (Frixen *et al.*, 1991 e Dunsmuir *et al.*, 2000) que associam alterações na E-caderina com degeneração maligna do epitélio prostático, metástases e fraco prognóstico. Umbas (1992) refere uma correlação entre alto grau de tumor prostático e diminuição ou ausência da expressão de E-caderina que vem confirmar os nossos resultados. Num outro estudo Li (2000) mostrou que o alelo A diminuía a eficiência transcricional entre 10 e 68%, comparada com o alelo C, possivelmente porque o alelo C tem uma ligação mais forte ao factor de transcrição do que o alelo A.

Western Blot – Para confirmar os resultados obtidos por imunofluorescência, determinamos, também, os níveis de E-Caderina na membrana plasmática, por análise de Western Blotting, utilizando um anticorpo contra o domínio intracelular da E-caderina, extremidadecarboxilica, cujo resultado está expresso na Fig. 11. Verifica-se a existência de uma banda mais concentrada de E-caderina 120 na célula normal e uma diminuição na célula tumoral, quer no genótipo CC quer no genótipo AC. Este resultado é consistente com o obtido na análise por imunofluorescência.

O lobo esquerdo foi considerado como controlo, quer na imunofluorescência quer no Western blot,

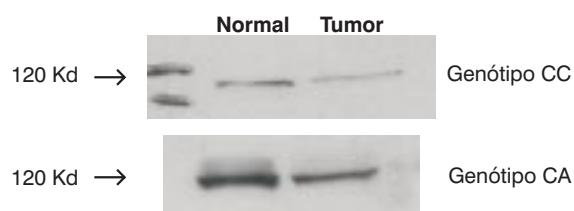


Fig.11: Análise por Western blotting, em tecido normal e tecido tumoral prostático.

dado não terem sido detectadas células tumorais, eliminando, assim, potenciais efeitos perturbadores se comparássemos tecido normal e tumoral de pacientes diferentes.

Todos os resultados nos levam a acreditar que existe uma relação entre o polimorfismo -160 C/A e cancro da próstata, havendo uma diminuição dos níveis da E-caderina nas células tumorais. Se observarmos as bandas do Western blot verificamos que os níveis da proteína estão mais diminuídos no genótipo AC.

Em conclusão, podemos observar que na população estudada, pertencente à Zona Centro, os resultados mostram que o SNP C/A -160, no promotor do gene da E-caderina, é um factor de risco para o cancro da próstata, podendo ser um dado adicional para identificação precoce de indivíduos susceptíveis, facilitando uma intervenção atempada.

Perspectivas Futuras

Para completar o estudo realizado ao longo deste trabalho seria de interesse, por um lado, alargar o estudo a uma população mais geral, de modo a podermos estreitar a relação genótipo-susceptibilidade de cancro da próstata, na população portuguesa. Por outro lado seria interessante complementar o estudo de imunofluorescência com indivíduos de genótipo AA.

Bibliografia

- Abrahamsson, PA.** 1999. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate* 39: 135-148.
- Aihara M, wheeler TM, Ohori M, Scardino PT.** 1994. Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. *Urology* 43: 60-66.
- Anderson DE, Badzioch MD.** 1992. Breast cancer risks in relatives of male breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 84: 1114-1117.
- Akasaki K, Stemmerman GN.** 1973 Comparative study of latent carcinoma of the prostate among Japanese in Japan and Hawaii. *J Natl Cancer Inst* 50: 1137-1144.
- Barkley MS, Goldman BD.** 1977. A quantitative study of serum testosterone, sex accessory organ growth and the development of internale aggression in the mouse. *Horm. Behav.* 8: 208-218.
- Bergerheim, US, Kunimi k, Collins VP, Ekman P.** 1991. deletion mapping of chromosomes 8, 10 e 16 in human prostatic carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 3: 215-220.
- Bernstein L, Ross RK** 1991. Cancer in the Los Angeles Country: A portrait of incidence and mortality 1972-1987. University of Southern California Press, Los Angeles, CA
- Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F.** 1995. E-cadherin is a tumor/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J*, 14: 6107-6115.
- Berx G, Staes K, van Hengel J, Molemans F, Bussemakers MJ, van Bokhoven A, van Roy F.** 1995 Mar. Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 26(2): 281-9.
- Berx G, Becker KF, Hofler H, van Roy F.** 1998. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Human Mutat* 12: 226-237.
- Billis A.** 1996. Age and race distribution of high grade intraepithelial neoplasia (HGPIN): an autopsy study in Brazil (South America). *Mod Pathol* 9: 71 (Abstract).
- Bochum S, Paiss T, Vogel W, Herkommer K, Hautmann R, Haeussler J.** 2002. Confirmation of the prostate cancer susceptibility locus HPCX in a set of 104 German prostate cancer families. *Prostate* 52 (1): 12-9.
- Bostjan** 2002
- Bostwick DG, Pacelli A, Lopez-Beltran A.** 1996. Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 29: 117-134.
- Bostwick DG.** 1996. Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hiperplasia. *Cancer* 78: 330-336.
- Bostwick DG, Amin MB, Dundore P, Marsh W, Shultz DS.** 1993. Architectural patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Human Pathol*, 24: 298-310.
- Bowen C, Spiegel S, Gelmann EP.** 1998. Radiation-induced apoptosis mediated by retinoblastoma protein. *Cancer Res.* 58: 3275-3281.
- Brawer, MK., Peehl, DM, Stamey, TA Bostwick, DG.** 1985. Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Cancer Res.* 45: 3663-3667.
- Brawn PN, Johnson EH, Kuhl DL, Riggs MW, Speights VO, Johnson CF, Pandya PP, Lind ML, Bell NF.** 1993. Stage at presentation and survival of white and black patients with prostate carcinoma. *Cancer* 71: 2569-2573.
- Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP.** 1999. survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 59: 803-806.
- Bui M, reiter RE.** 1998. Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 17. 391-399.
- Cannon L, Bishop DT, Skolnick M, Hunt S, Lyon JL, Smart CR.** 1982. Genetic epidemiology of prostate cancer in the Utah mormon genealogy. *Cancer Surveys* 1: 47-69.

- Carter BS, Ewing CM, Ward WS, treiger BF, Aalders TW, Schalken JA, Epstein JI, Isaacs WB.** 1990b. Allelic loss of chromosomes 16q e 10q in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 8751-8755.
- Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD.** 1992. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 3367-3371.
- Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC.** 1993. Hereditary prostate cancer: Epidemiologic and clinical features. *J.Urol.* 150: 797-802.
- Chang M, Tsuchiya K, Batchelor RH, Rabinovitch PS, Kulander BG, Haggitt RC, Burmer GC.** 1994. Deletion mapping of chromosomes 8p in colorectal carcinoma and dysplasia arising in ulcerative colitis, prostatic carcinoma and malignant fibrous histiocytomas. *Am. J. Pathol.* 144: 1-6.
- Chappius-Flament S Wong Ellen, Hicks Les D, Kay CM, Gumbiner BM.** 2001. Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol* 154: 231-243
- Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, , Carroll PR, Pin SS, Epstein JI, Isaacs WB, Jensen RH.** 1996. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomichybridization and allelotyping. *Cancer Res.* 56: 3091-3102.
- Cooney KA, Wetzel JC, Merajver SD, Macoska JA, Singleton TP, Wojno KJ.** 1996. Distinct regions of allelic loss on 13q in prostate cancer. *Cancer Res* 56: 1142-1145.
- Ntais Cs, Polycarpou A, Ioannidis JPA.** 2003 July. SRD5A2 Gene Polymorphisms and the Risk of Prostate Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 12: 618-624.
- Cunningham JM, McDonnell SK, Marks A, Hebbring S, Anderson AS, Peterson BJ, Slager S, French A, Blute ML, Schaid DJ, Thibodeau SN.** 2003, Dec. Genome linkage screen for prostate cancer susceptibility loci: Results from the Mayo Clinic familial prostate cancer study. *Prostate* 57 (4): 335-46.
- Cussent O, Valeri A.** 2001. Heterogeneity in genetic susceptibility to prostate cancer. *Elsevier* 0953-6205. 12(1): 11-16.
- Dai WS, Kuller LH, LaPorte RE, Gutai JP, Falvo-Gerard L, Caggiula A.** 1981. The epidemiology of plasma testosterone levels in middle-aged men. *Am. J. Epidemiol.* 114. 804-816.
- di Sant'Agnese, PA.** 1992. Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer* 70: 254-268.
- di Sant'Agnese, PA.** 1998. Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: A review of morphologic aspects. *Urology* 51: 121-124.
- dos Santos NR, Van Kessel AG.** 1999. Chromosomal abnormalities: detection and implications for cancer development. *Anticancer Res* 19: 4697-4714.
- Dunsmuir WD, Gillett CE, Meyer LC, Young MP, Corbishley C, Eeles RA, Kirby RS.** 2000. Molecular markers for predicting prostate cancer stage and survival. *BJU Int.* 86: 869-878.
- Eagle LR, Yin X, Brothman AR, Williams BJ, Atkin NB, Prochownik EV.** 1995. Mutation of the *MXII* gene in prostate cancer. *Nat. Genet.* 9: 249-255.
- Eeles RA.** 1999. Genetic Predisposition to prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Disease* 2: 9-15.
- Fincham SM, Hill GB, Hanson J, Wijayasinghe C.** 1990. Epidemiology of prostatic cancer: a case-control study. *Prostate* 17: 189-206
- Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE.** 1994. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast cancer Linkage Consortium. *Lancet* 343: 692-695.
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Iochner D, Birchmeier W.** 1991. *J. Cell Biol.* 113: 173-185.
- Gray IC, Phillips SM, Lee SJ, Neoptolemos JP, Weissenbach J, Spurr NK.** 1995. Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res.* 55: 4800-4803.
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PW.** 1997. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8272]. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3320-3323
- Gleason D.** 1977. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: M. Tannenbaum (ed) *Urologic pathology: the prostate*. Lea and Febiger, Philadelphia
- Gleason D.** 1992. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Hum. Pathol.* 23: 273-279.
- Glover FE, Jr., Coffey DS, Douglas LL, Russell H, Cadiagan M, Tulloch T, Wedderburn K, Wan RL, Baker TD, Walsh PC.** 1998. Familial study of prostate cancer in Jamaica. *Urology* 52: 441-443
- Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH.** 1994. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* 86: 1600-1608
- Gong G, Oakley-Girvan I, Wu AH, Kolonel LN, John EM, West DW, Felberg A, Gallagher RP, Whittemore AS.** 2002. Segregation analysis of prostate cancer in 1,719 white, African-American and Asian-American families in the United States and Canada. *Cancer Causes Control.* 13: 471-82.
- Goode EL, Stanford JL, Chakrabarti L, Gibbs M, Kolb S, McIndoe RA, Buckley VA, Schuster EF, Neal CL, Miller EL, Brandzel S, Hood L, Ostrander EA, Jarvik GP.** 2000. Linkage analysis of 150 high-risk prostate cancer families at 1q24-25. *Genet Epidemiol* 18: 251-275

- Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG.** 2000. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-Cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 275: 2727-2732.
- Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB.** 1995. E-Cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 55: 5195-5199.
- Greenlee R, Murray T, Bolden S, Wingo P.** 2000. Cancer Statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 50:7-33
- Grönberg H, Damber L, Damber JE.** 1994. Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol* 152: 1484-1487
- Grönberg H, Damber L, Damber.** 1996. Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. *Cancer* 77: 138-143
- Haber D, Harlow E,** 1997. Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nat Genet* 16: 320-322.
- Hajdinjak T, Toplak N.** 2004. E-cadherin Polymorphism -160 C/A and Prostate Cancer. *Int. J. Cancer* 109: 480-481.
- Hayes RB, Liff JM, Pottern LM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Schwartz AG, Swanson GM, Silverman DT, Brown LM, Hoover RN, Fraumeni JF Jr.** 1995. Prostate cancer risk in U.S. blacks and whites with a family history of cancer. *Int J Cancer* 60: 361-364
- Henke RP, Kruger E, Ayhan N, Hubner D, Hammerer.** 1994. Frequency and distribution of numerical chromosomal aberrations in prostatic cancer. *Hum Pathol.* 25: 476-84
- HWO.** Trends in prostate cancer 1980-1988. *WHO Weekly Epidemiol Rec* 1992; 67:281-288.
- Holund B.** 1980 Latent prostatic cancer in a consecutive autopsy series. *Scand J Urol Nephrol* 14: 29-35.
- Hsing AW, Tsao L, Devesa SS.** 2000. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Bethesda, 20852-7234, USA.
- Hsing AW, Tsao L, Devesa SS.** 2000 International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 85: 60-67.
- Imbert A, Chaffanet M, Essioux L, Noguchi T, Adelaide J, Kerangueven F, Le Paslier D, Bonaiti-Pellie C, Sobol H, Birnbaum D.** 1996. Integrated map of the chromosome 8p12-p21 region, a region involved in human cancers and werner syndrome. *Genomics* 32: 29-38.
- Ittmann M.,** 1996. Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res.* 56: 2143-2147.
- Jean-Faucher C, Berger M, de Turckheim M, Veyssiere G, Jean C.** 1978. Developmental patterns of plasma and testicular testosterone in mice from birth to adulthood. *Acta Endocrinol.* (Copenh.) 89: 780-788.
- Jonsson BA, Adami HO, Hagglund M, Bergh a, Goransson I, Statin P, Wiklund F, Gronberg H.** 2004. *Int. J. Cancer* 109: 348-352
- Kabalin JN, McNeal JE, Price HM, Freiha FS, Stamey TA.** 1989. Unsuspected adenocarcinoma of the prostate in patients undergoing cystoprostatectomy for other causes: incidence, histology and morphometric observations. *J Urol* 141: 1091-1094.
- Karube K.** 1961. Study of latent carcinoma of the prostate in the Japanese based on necropsy material. *Tohoku J Exp Med* 74: 265-285.
- Kemler R, Ozawa M.** 1989. *Bioessays* 11: 88-91.
- Kim SK, Ro JY, Kemp BL, Lee JS, Kwon TJ, Hong WK,, Mao L.** 1998. Identification of two distinct tumor-suppressor loci on the long arm of chromosome 10 in small cell lung cancer. *Oncogene* 17: 1749-1753.
- Kinzler KW, Vogelstein B.** 1998. Familial cancer syndromes: The role of caretakers and gatekeepers. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill. P 241-242.
- Lange EM, Gillanders EM, Davis CC, Brown WM, Campbell JK, Jones M, Gildea D, Riedesel E, Albertus J, Freas-Lutz D, Markey C, Giri V, Dimmer JB, Montie JE, Trent JM, Cooney KA.** 2003. Genome-wide scan for prostate cancer susceptibility genes using families from the University of Michigan prostate cancer genetics project finds evidence for linkage on chromosome 17 near BRCA1. *Prostate* 1; 57: 326-34.
- Larue** 1994.
- Levine AJ.** 1993. The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* 62: 623-651.
- Li C, Larsson C, Futreal A, Lancaster j, Phelan C, Aspenblad U, Sundelin B, Liu Y, Ekman P, Auer G.** 1998. Identification of two distinct deleted regions on chromosome 13 in prostate cancer. *Oncogene* 16: 481-487.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Pae J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R.** 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science* 275: 1943-1947.
- Li LC, Chui RM, Sasaki M, Nakajima K, Perinchery G, Au HC, Nojima D, Carroll P, Dahiya R.** 2000 A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities. *Cancer Res.* 60: 873-876.
- Li LC, Zhao H, Nakajima K, Oh BR, Filho LA, Carroll P, Dahiya R.** 2001. Methylation of the E-cadherin gene promoter correlates with progression of prostate cancer. *J. Urol* 166: 705-709.
- Lichtenstein P, Holm NV, VerkasaloPK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K.** 2000 Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden Denmark and Finland. *N Engl J Méd* 343: 78-85.
- Liu AY, True LD, La tray L, Nelson PS, Ellis WJ, Vessella RL, Lange PH, Hood L, van den engh G.** 1997. Cell-cell

- interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 10705-10710.
- Macoska JÁ, Micale MA, Sakr WA, Benson PD, Wolman SR.** 1993. Extensive genetic alterations in prostate cancer revealed by dual PCR and FISH analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 8: 88-97.
- Marshall JR.** 2001. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia as an exposure biomarker for prostate cancer chemoprevention research. *IARC Sci Publ* 154: 191-8.
- Mawhinney MG, Neubauer BL.** 1979. Actions of estrogen in the male. *Invest. Urol.* 16: 409-420.
- McNeal JE.** 1968. Regional morphology and pathology of the prostate. *A.m. J. Clin. Pathol.* 49: 347-357.
- McNeal JE.** 1969. Origin and development of carcinoma in the prostate. *Cancer* 23: 24-34.
- McNeal JE.** 1988. Normal histology of the prostate. *Am.J. Surg. Pathol.* 12: 619-633.
- Melamed J, Einhorn JM, Ittmann MM.** 1997. Allelic loss on chromosome 13q in human prostate carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 3: 1867-1872.
- Montironi R, Bostwick DG, Bonkhoff H.** 1996. Origins of prostate cancer. *Cancer*, 78: 362-365.
- Monroe KR, Yu MC, Kolonel LN, Coetzee GA, Wilkens LR, Ross RK, Henderson BE.** 1995. Evidence of an X-linked or recessive genetic component to prostate cancer risk. *Nat Med* 1: 827-829.
- Morganti G, Gianferrari L, Cresseri A, Arrigoni G, Lovati G,** 1956; Recherches clinico-statistiques et genetiques sur les neoplasies de la prostate. *Acta Genet* 6: 304-305.
- Nagle RB, Ahmann FR, McDaniel KM, Paquin MI, Clark Va, Celniker, A.** 1987. Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. *Cancer Res* 47: 281-286.
- Narod SA, Dupont A, Cusan L, Diamond P, Gomez JL, Suburu R, Labrie F.** 1995. The impact of family history on early detection of prostate cancer. *Nat Med* 1: 99-101.
- Natt E, Magenis RE, Zimmer J, Mansouri A, Scherer G.** 1989. Regional assignment of the human loci for uvomorulin (UVO) and chymotrypsinogen B (CTRB) with the help of two overlapping deletions on the long arm of chromosome 16. *Cytogenet Cell Genet* 50: 145-148.
- Nomura AMY, Kolonel LN** 1991. Prostate cancer: a current perspective. *Am J Clin Epidemiol* 13: 200-227.
- Ostrander Elaine A and Stanford Janet L.** 2000, Genetics of prostate cancer: too many loci, too few genes. *Am. J. Hum. Genet.*, 67: 1367-1375.
- Page WF, Braun MM, Partin AW, Caporaso N, Walsh P.** 1997. Heredity and prostate cancer: a study of World War II veteran twins. *Prostate* 33: 240-245
- Prehn RT.** 1999. On the prevention and therapy of prostate cancer by androgen administration. *Cancer Res* 59: 4161-4164.
- Prendergast NJ, Atkins MR, Schatte EC, Paulson DF, Walther PJ.** 1996. p53 immunohistochemical and genetic alterations are associated at high incidence with post-irradiated locally persistent prostate carcinoma. *J.Urol.* 155: 1685-1692.
- Rebbeck TR, Walker AH, Zeigler-Johnson C, Weisburg S, Martin A-M, Nathanson KL, Wein AJ, Malkowicz SB.** 2000. Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer. *Am J Hum Genet* 67: 1014-1019
- Reese JH, MaNeal JE, Redwine EA.** 1986. Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and the seminal vesicle. *J Urol* 136: 1148.
- Reese JH, MaNeal JE, Redwine EA.** 1988. Tissue type plasminogen activator as a marker for functional zones, within the human prostate gland. *Prostate* 12: 47.
- Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C.** 1995. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 855-9.
- Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD.** 1993. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostatic in young male patients. *J. Urol.* 150: 379-385.
- Sakr WA, Macoska JA, Benson P, Grignon DJ, Wolman SR, Pontes JE, Crissman JD.** 1994. Allelic loss in locally metastatic, multisampled prostate cancer. *Cancer Res.* 54: 3273-3277.
- Sakr WA, Grignon DJ, Haas GP, Heilbrun LK, Pontes JE, Crissman JD.** 1996. Age and racial distribution of prostatic intraepithelial neoplasia. *Eur Urol* 30: 138-144.
- Saric T, Brkanac Z, Troyer DA, Padalecki SS, Sarosdy M, Williams K, Abadesco L, Leach RJ, O'Connell P.** 1999. Genetic pattern of prostate cancer progression. *Int. J. Cancer* 81: 219-224.
- Simard J, Dumont M, Soucy P, Labrie F.** 2002. Perspective: Prostate cancer susceptibility genes. *Endocrinology*, 143: 2029-2040
- Schulz WA, Burchardt M and Cronauer, MV.** 2003. Molecular biology of prostate cancer. *Molecular Human Reproduction*: vol 9, Nº 8, 437-448
- Sherwood ER, Berg LA, Mitchell NJ, McNeal JE, Kozlowski JM, Lee C.** 1990. Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate. *J. Urol.* 143: 167-171.
- Shore EM, Nelson WJ.** 1991. Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 266: 19672-19680.
- Spitz MR, Currier RD, Fueger JJ, Babaian RJ, Newell GR.** 1991. Familial patterns of prostate cancer: a case control analysis. *J Urol* 146: 1305-1307
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T.** 1997. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* 15: 356-362.

- Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC.** 1990. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 17: 337-347.
- Stockinger A, Eger a, Wolf J, Beug H, Foisner R.** 2001. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol.* 154: 1185-96.
- Takahashi S, Shan AL, Ritland SR, Delacey KA, Bostwick DG, Lieber MM, Thibodeau SN, Jenkins RB.** 1995. Frequent loss of heterozygosity at 7q31.1 in primary prostate cancer is associated with tumor aggressiveness and progression. *Cancer Res.* 55: 4114-4119.
- Takeichi M.** 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251: 1451-1455.
- Tavtigian SV, Simard J, Labrie F, Skolnick MH, Neuhausen SL, Rommens J, Cannon-Albright LA.** 2000. A strong candidate prostate cancer predisposition gene at chromosome 17p. *Am J Hum Genet Suppl* 67:A7
- Tavtigian SV, Simard J, Teng DH, Abtin V, Baumgard M, Beck A, Camp NJ, Carrilo AR, Chen Y, Dayananth P, Desrochers M, Dumont M, Farnham JM, Frank D, frye C, Ghaffari S, Gupte JS, Hu R, Iliev D, Janecki T, Kort EN, Laity KE, Leavitt A.** 2001. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat Genet* 27: 172-180.
- The Breast Cancer Linkage Consortium.** 1999. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 91: 1310-1316.
- Tulinus H, Egilsson V, Olafsdottir GH, Sigvaldason H.** 1992. Risk of prostate, ovarian and endometrial cancer among relatives of women with breast cancer. *Br Med J* 350: 855-857.
- Trybus TM, Burgess AC, Wojno KJ, Glover TW, Macoska JA.** 1996. Distinct areas of allelic loss on chromosomal regions 10p and 10q in human prostate cancer. *Cancer Res* 56: 2263-2267.
- Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE, Debruyne FM, Isaacs WB.** 1992. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res.* 52: 5104-5109.
- Van den Berg C, Guan Xy, Von Hoff d, Jenkis R, Bittner M, Griffin C, Kallioniemi O, Visakorpi T, McGill J, Herath J.** 1995. DNA sequence amplification in human prostate cancer identified by chromosome microdissection: potential prognostic implications. *Clin. Cancer Res* 1: 11-18.
- Van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes k, van roy F.** 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7980-7985.
- Verhage Bas AJ, Houwelingen K, Ruijter T EG, Kiemene LA, schalken JA.** 2002. Single-Nucleotide Polymorphism in the E-Cadherin Gene Promotor Modifies the Risk of Prostate Cancer. *Int. J. Cancer* 100: 683-685.
- Verhagen, AP, Ramaekers FC, Aalders, TW., Schaafsma, HE, Debruyne, FM, Schalken, JA.** 1988. Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration. *Prostate* 13: 25-38.
- Verhage AP, Ramaekers FC, Aalders TW, Schaafsma HE, Debruyne FM, Schalken, JA.** 1992. Colocalization of basal and luminal cell-type cytokeratins in human prostate cancer. *Cancer Res* 52: 6182-6187.
- Voeller Hj, Sugars LY, Pretlow T, Gelmann EP.** 1994. p53 oncogene mutations in human prostate cancer specimens. *J.Urol.* 151: 492-495.
- Vogelstein B, Kinzler KW.** 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9: 138-141.
- Whitmore Jr WF.** 1984. Natural history and staging of prostate carcinoma. *Urol Clin North Am* 11: 205-220.
- Whittemore AS, Lele C, Friedman GD, Stamey T, Vogelman JH, Orentreich N.** 1995. Prostate-specific antigen as predictor of prostate cancer in black men and white men. *J Natl Cancer Inst* 87: 354-360
- Whittemore AS, Lin IG, Oakley-Girvan I, Gallagher RP, Halpern J, Kolonel LN, Wu AH, Hsieh CL.** 1999. No evidence of linkage for chromosome 1q42.2-43 in prostate cancer. *Am J Hum Genet* 65: 254-256
- Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN.** 1995. Family history and prostate cancer risk in black, white and Asian men in the United States and Canada. *Am J Epidemiol* 141: 732-740.
- Willert K, Nusse R.** 1998. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 8: 95-102.
- Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Milchgrub S, Syed s, Lam S, Mackay B, Minna JD, Gazdar AF.** 1999. Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res* 59: 1973-1979.
- Xu J, Zheng SL, Chang B, Smith Jr, Carpten JD, Stine OC, Isaacs SD, Wiley KE.** 2001. Linkage of prostate cancer susceptibility loci to chromosome 1. *Hum Genet* 108: 335-345.
- Yeh S, Miyamoto H, NishimuraK, Kang H, Ludlow J, hsiao P, Wang C, Su C, Chang C.** 1998. Retinoblastoma, a tumor suppressor, is a coactivator for the androgen receptor in human prostate cancer DU145 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248E: 361-367.
- Wang M, Valenzuela L, Murphy G, Chu T.** 1979. Purification of human prostate specific antigen. *Invest Urol* 17: 159-63
- Woolf CM.** 1960. An investigation of the familial aspects of carcinoma of the prostate. *Cancer* 13: 739-744
- Zhao X, Gschwend JE, Powell CT, Foster RG, Day KC, Day ML.** 1997. retinoblastoma protein-dependent growth signal conflict and caspase activity are required for protein kinase C-signaled apoptosis of prostate epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272: 22751-22757.