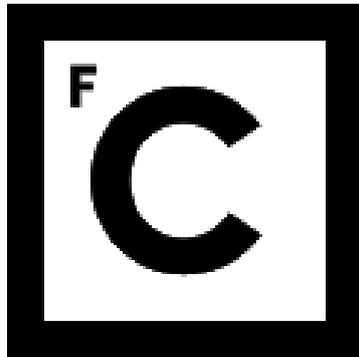


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Ciências
ULisboa

**Perfil genético de moduladores de metabolismo ósseo e
imunidade na metastização óssea do cancro da próstata
resistente à castração**

Matthew Salvador Janeiro

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:

Professor Doutor Ricardo Ribeiro (Universidade do Porto)

Professora Doutora Deodália Dias (Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa)

2022

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido finalizado sem a ajuda de várias pessoas. Em particular, eu gostaria de expressar a minha sincera gratidão:

Ao Professor Doutor Ricardo Ribeiro por ter aceitado neste projeto e pela sua ajuda e conhecimento que se revelaram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Professora Doutora Deodália Dias, por toda a simpatia demonstrada em todo o processo.

Ao Professor Doutor Manuel Bicho por me ter aceitado no seu espaço de trabalho e pela ajuda e conhecimento transmitidos principalmente na parte inicial do meu projeto.

Um especial obrigado à Doutora Ana Carolina Santos e à Doutora Andreia Matos por todo o apoio prestado desde o primeiro dia, tanto a nível laboratorial como no processo de escrita da tese, foi uma ajuda bastante valiosa e importante para a conclusão do trabalho.

Não podia deixar de agradecer a todos os meus amigos e familiares que estiveram do meu lado, que me apoiaram e me deram incentivo para concluir este projeto.

Obrigado à Inês e à Nami por todo amor, compreensão e força de vontade dada durante o período do trabalho.

Glossário

ADC – Arginine decarboxylase

AP-1 – Activator protein 1

AR – Recetor androgénio

ARGI – Arginase 1

ARGII – Arginase 2

ASL – Arginosuccinate lyase

ASS - Arginosuccinate synthase

BCL-2 – B-cell lymphoma 2

BPH - Hiperplasia benigna prostática

BRCA1 – Breast Cancer 1

BRCA2 – Breast Cancer 2

CaP – Cancro da próstata

CHC – Clathrin heavy chain

CRPC – Castrate resistant prostate cancer

DNA – Deoxyribonucleic Acid

E2F1 - E2F Transcription Factor 1

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid

ERO – Endoplasmic reticulum oxidoreductin

GCN2 – General control nonderepressible 2

GPRC6A – G protein coupled receptor class C group 6 member A

GRE – Glucocorticoid response elements

HMGB1 – High mobility group box 1

HMGB2 – High mobility group box 2

IL-6 – Interleukin 6

IL-8 – Interleukin 8

KAI1 – Cluster of differentiation 82 (also known as CD82)

mTOR – Mammalian target of rapamycin

NCOA2 – Nuclear receptor coactivator 2

NF-kB – Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells

NO – nitric oxide

NOS2 – Nitric oxide synthase 2

OC - Osteocalcin

OSE1 – Osteocalcin specific element 1

OSE2 – Osteocalcin specific element 2

PCa – Prostate Cancer

PCR – Polymerase chain reaction

PDE-5 – Phosphodiesterase type 5

PIN - Prostatic Intraepithelial Neoplasia

PSA – Prostate specific antigen

PTEN – Protein tyrosine Phosphatase

RM – Ressonância magnética

RUNX2 – Runt related transcription factor 2

TMPRSS2 – Transmembrane serine protease 2

TNM - Tumour Node Metastasis

VDRE – Vitamin D response element

VKORC1 – Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1

ZIP1 – Synaptonemal complex protein ZIP1

Abstract

Prostate cancer (PCa) is a male neoplasm with high incidence and prevalence in the elderly population from western countries. Androgen deprivation therapy (ADT) is a standard of care to patients with locally advanced or metastatic disease, despite most will eventually relapse becoming hormone-resistant, which is a bad prognosis event.

The aim of this project was to study the association of *NOS2* (rs944722), *GPRC6A* (rs2274911), *VKORC1* (rs2359612), *ARG I* (rs2781667) and *ARGII* (rs3742879) genetic polymorphisms in PCa, particularly to assess their predictive value for developing hormone resistance in subjects under androgen deprivation therapy (ADT).

One-hundred and nineteen males, aged between 67-76 years old were included in this study. Most presented with advanced stage PCa. Blood samples were collected, and DNA extracted. Genotyping was conducted using real time PCR with Taqman probes and PCR-RFLP.

The PCa patients with GG genotype of *NOS2* gene Intron 20 are at risk for stage T3-T4. Furthermore, the PCa patients either with CC genotype of the *ARG I* polymorphism, or AA genotype of the *VKORC1* polymorphism are at risk for PSA greater than 20 ng/mL. Finally, PCa patients with GG genotype of the gene *ARGII* is at risk for early diagnosis of the PCa.

The studied polymorphisms in *NOS2*, *VKORC* and *ARGI* genes were associated with aggressive features whereas *ARGII* impact the earlier onset of prostate cancer.

Keywords: Prostate cancer; Hormone resistance; Polymorphisms

Resumo

O Cancro da próstata (CaP) é uma neoplasia com alta incidência e prevalência na população mais velhas dos países ocidentais. Terapia de privação androgénica (ADT) é o padrão de tratamento para doentes com doença localmente avançada ou metastática, embora muitos irão ter uma recaída e tornar-se hormono-resistentes, o que é um mau prognóstico.

O objetivo deste estudo foi estudar as associações polimorfismo genéticos de *NOS2* (rs944722), *GPRC6A* (rs2274911), *VKORC1* (rs2359612), *ARG I* (rs2781667) e *ARGII* (rs3742879) no cancro da próstata, em particular para avaliar a possibilidade de desenvolverem hormono resistência nos doentes sob ADT.

Cento e dezanove homens, com idades entre 67-76 anos foram incluídos neste estudo. A maioria apresentava CaP em estadio avançado. Houve colheitas de sangue e extração de DNA. A genotipagem foi conduzida através de real time PCR com sondas *Taqman* e *PCR-RFLP*.

O genótipo GG é de risco para o estadio T3-T4 no gene *NOS2* Intrão 20, O genótipo CC do gene *ARGI* e o genótipo AA para o gene *VKORC1* são de risco para PSA superior a 20 ng/mL e o genótipo GG do gene *ARGII* é de risco para um diagnóstico precoce do CaP.

Os polimorfismos estudados nos genes *NOS2*, *VKORC1* e *ARGI* associados com características agressivas enquanto o do *ARGII* impacta o início precoce do CaP.

Palavras-chave: cancro da próstata; hormono resistência; polimorfismo; genética

Índice	
Glossário	3
Abstract	5
Resumo	6
Introdução	10
Cancro da Próstata	10
Fisiopatologia.....	11
Estadio, Classificação e Diagnóstico do Cancro da Próstata.....	13
Classificação de Gleason	15
Estadio	16
Cancro da Próstata resistente à castração hormonal	16
Moléculas Associadas	20
Vitamina K	20
Vitamina K e Cancro da Próstata.....	21
Arginina	24
Metabolismo da Arginina nas Células tumorais.....	26
Metabolismo Arginina no Microambiente tumoral	28
Osteocalcina.....	29
Objetivos.....	33
Material e Métodos.....	35
População.....	35
Extração de DNA	35
Quantificação DNA.....	36
Genotipagem	36
Análise Estatística.....	37
Resultados	39
Discussão.....	48
Conclusão	53
Referências	55

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do sistema de pontuação ou grau de Gleason.	17
Figura 2 - Representação esquemática do ciclo da vitamina K e respetiva interferência da redutase do epóxido de vitamina K (VKOR).....	25
Figura 3 - Gráfico Kaplan-Meier, demonstrando que os portadores do genótipo GG do polimorfismo <i>ARGII</i> tiveram cancro da próstata mais precocemente que os AA/AG	48

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Descrição da informação clinico-patológica dos doentes com cancro de próstata submetidos a hormonoterapia.....	42
Tabela 2 - Análise descritiva dos polimorfismos genéticos	43
Tabela 3 - Associação entre os polimorfismos no gene <i>NOS2</i> e as variáveis clinico-patológicas.....	44
Tabela 4 - Associação entre os polimorfismos nos genes <i>ARGI</i> e <i>ARGII</i> e variáveis clinico-patológicas.....	45
Tabela 5 - Associação entre os polimorfismos nos genes <i>VKORC1</i> e <i>GPRC6A</i> e variáveis clinico-patológicas.....	46
Tabela 6 - Resumo de análises de regressão logística uni e multivariada e interpretação de resultados.....	47

INTRODUÇÃO

Introdução

O Cancro é uma doença que se caracteriza por crescimento celular anormal, com potencial para invadir e metastizar outras regiões do corpo. As células tumorais distinguem-se de várias formas das células normais: capacidade descontrolada de crescimento celular descontrolado, redução da apoptose, capacidade de invadir e proliferar para regiões locoregionais e à distância e diminuir a imunovigilância, permitindo a sobrevivência das células tumorais. [1] É uma doença de base genética, sobretudo associada a mutações em genes de controlo do crescimento celular, apoptose e reparação de DNA. Estas alterações podem surgir devido a erros na divisão celular, danos na cadeia de DNA, falha da reparação dos erros DNA ou mesmo herdadas, transmitindo-se dos ascendentes familiares.

Praticamente em qualquer célula, ou qualquer órgão, do corpo humano pode-se iniciar e desenvolver uma neoplasia maligna. Os carcinomas são o tipo de neoplasia mais comum, com origem nas células epiteliais. Subdividem-se em adenocarcinomas, que produzem fluídos ou muco (p.e. cancro da mama, colon e próstata), células escamosas, basocelulares (p.e. pele). [2]

Cancro da Próstata

A próstata é uma glândula exócrina no sistema reprodutivo masculino, responsável pela produção e armazenamento do fluído prostático, componente do sémen.

O cancro da próstata (CaP) é a neoplasia maligna com maior prevalência no sexo masculino [3]. Em 2012 nos Estados Unidos da América (EUA) foram diagnosticados 165 000 novos casos e morreram cerca de 30 000 homens por CaP. No mesmo ano, na Europa, foram diagnosticados 420 000 CaP de novo [4]. Em Portugal (n=2465) [5], verificou-se que os doentes com CaP apresentavam idade entre os 50 e 96 anos, 50,1% com doença localizada (50,1%), 21.6% avançada e 10.1% metastização à distância. Esta neoplasia apresenta-se frequentemente sem sintomatologia, presentes apenas em fases

mais avançadas. A elevada incidência do CaP deve-se a causas multifatoriais, sendo a principal a idade, uma vez que 99% dos casos são em homens com > 50 anos [3]. Outras variáveis incluem o background genético, etnia ou ambiente [3].

A história familiar é um fator de risco associado a CaP. Homens que têm um parente de primeiro grau (pai ou irmão) com cancro de próstata têm risco 2x maior de desenvolver esta neoplasia e aqueles com dois parentes de primeiro grau afetados têm um risco cinco vezes maior em comparação com homens sem histórico familiar [6]. Esta neoplasia também afeta mais homens negros do que homens caucasianos ou hispânicos, sendo mais mortal nos negros. Por outro lado, as taxas de incidência e mortalidade para homens hispânicos são um terço mais baixas do que para caucasianos [7].

Encontra-se bem estabelecido que o cancro da próstata não possui um único gene responsável, vários genes diferentes parecem estar implicados. Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, importantes fatores de risco para cancro de ovário e cancro de mama em mulheres, também se encontram associados ao cancro de próstata [8]. Outros genes vinculados, incluem o gene hereditário do cancro de próstata 1 (*HPC1*), o recetor de andrógenos (*AR*) e o recetor de vitamina D (*VDR*). A fusão da família de genes *TMPRSS2-ETS*, especificamente *TMPRSS2-ERG* ou *TMPRSS2-ETV1/4*, promove o crescimento das células cancerígenas. Essas fusões podem surgir por meio de cadeias de rearranjo complexas designadas por cromoplexia [9].

Fisiopatologia

Devido à sua localização, as doenças da próstata podem afetar a micção e a ejaculação. O órgão é excretor e histologicamente contém muitas pequenas glândulas [10].

No cancro de próstata, são as células da componente glandular que malignizam. Estas células epiteliais que compõem as glândulas prostáticas utilizam hormonas masculinas, andrógenios, para funcionar. A testosterona é o principal

androgénio, produzida principalmente nas células de Leydig dos testículos (cerca de 95%), enquanto a dehidroepiandrosterona (DHEA) é produzida nas supra-renais. A di-hidrotestosterona (DHT) é convertida a partir de testosterona, através da atividade da enzima 5-alfa redutase, na própria próstata.

A larga maioria dos cancros de próstata são classificados histologicamente como adenocarcinomas, afetando a área glandular. Na próstata os adenocarcinomas são mais comuns na zona periférica.

Inicialmente, pequenos aglomerados de células cancerígenas permanecem confinados a glândulas prostáticas normais, uma condição conhecida como carcinoma in situ ou neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Em alguns casos,, estas células cancerígenas começam a multiplicar-se e espalhar-se para o tecido prostático circundante, desorganizando a organização glandular e formando um tumor. Eventualmente, pode progredir e invadir órgãos adjacentes, como as vesículas seminais ou gânglios linfáticos locoregionais, e/ou disseminar à distância através da corrente sanguínea e/ou sistema linfático. A metastização do cancro de próstata ocorre mais frequentemente para o osso e gânglios linfáticos, podendo raramente invadir o reto e a bexiga após progressão local.

A próstata é um órgão que produz citrato e acumula zinco, onde a proteína ZIP1 é responsável pelo transporte ativo do zinco dentro das células deste órgão. O zinco tem um papel fundamental em alterar o metabolismo da célula para produzir citrato, que é um dos componentes do sémen. Todos estes processos são ineficientes em energia. As células malignas da próstata são desprovidas em grande parte de zinco, permitindo que acumulem energia, que é usada para proliferar. [11] O silenciamento do gene que produz ZIP1 parece estar envolvido neste mecanismo. O ZIP1 é um supressor tumoral, uma vez que o zinco induz apoptose em células anormais. [11]

A perda dos genes supressores de cancro, no início da carcinogénese prostática, foi localizada nos cromossomas 8p, 10q, 13q e 16q. As mutações no *TP53* em CaP primário são relativamente baixas e mais frequentemente observadas em contextos metastáticos, assim sendo, as mutações de *TP53* são um evento tardio na história natural do CaP. As mutações no gene *ataxia-telangiectasia*

mutated (ATM) também estão associadas com o aumento do risco de cancro uma vez que o gene supressor tumoral *BRCA1* é um dos alvos do *ATM*. [12] As mutações encontradas no gene *BRCA2* também estão envolvidos no aumento do risco de cancro, sendo principalmente transmitido de modo hereditário. Outros genes supressores tumorais que desempenham um papel no CaP incluem o *PTEN* e *KAI1*. A frequência relativa de perda de E-caderina e CD44 também foi observada, tal como foi demonstrado que a perda da proteína retinoblastoma (RB) induz a desregulação do AR no CaP resistente à castração, ao desregular a expressão de *E2F1* [13]. Por outro lado, o gene *RUNX2* é um fator de transcrição que impede que as células cancerígenas sofram apoptose, contribuindo assim para o desenvolvimento de CaP [14]. A via de sinalização intracelular PI3K/Akt interage com a mediada por TGFb1/SMAD contribuindo para a sobrevivência das células malignas da próstata e inibindo a apoptose [15]. Admite-se que o inibidor da apoptose ligado ao X (*XIAP*) possa promover a sobrevivência e crescimento de células neoplásicas da próstata, sendo um potencial alvo terapêutico, pois a sua inibição terá impacto na apoptose prevenindo a proliferação desregulada das células malignas [16]. A citocina-1 inibidora de macrófagos (MIC-1) estimula a via de sinalização da quinase de adesão focal (FAK), que induz crescimento e sobrevivência das células prostáticas [17].

A ativação do recetor de androgénio (AR) contribui para a sobrevivência das células de cancro da próstata, continuando a ser alvo de muitos estudos. O antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), por ser muito expresso em células epiteliais de CaP, tem sido usado como marcador diagnóstico e alvo terapêutico, uma vez que contribui para o seu desenvolvimento, ao aumentar os níveis de folato para as células malignas sobreviverem, aumentando o folato disponível para uso pela hidrólise do folato glutamado [18].

Estadio, Classificação e Diagnóstico do Cancro da Próstata

O diagnóstico precoce do CaP está associado a melhor prognóstico e a tratamento mais eficaz. Entre as estratégias adotadas para deteção em estado

inicial, incluem-se medidas de educação e conhecimento da população no sentido de promover a importância e realização de avaliação urológica regular.

O rastreio envolve o exame digital retal e o doseamento sérico do Antígeno Específico da Próstata (PSA). O PSA é uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais dos ductos das glândulas prostáticas. Também se podem verificar elevadas concentrações de PSA em outras situações patológicas, mas este acaba por ser um dos mais importantes marcadores para a deteção e seguimento do CaP. Com o exame retal, alterações na concentração do PSA e ainda o recurso á imagiologia, avalia-se a elegibilidade para realização de biópsia prostática e subsequente análise histopatológica. Se houver suspeita de cancro, é sugerida uma biópsia. Durante uma biópsia, são colhidas amostras de próstata através de agulhas especiais (geralmente seis em cada lobo da próstata). Caso seja confirmado o diagnóstico de cancro da próstata na análise histológica, é importante conferir o estadio utilizando-se frequentemente a classificação *Tumour Node Metastasis* (TNM).

A ultrassonografia e a ressonância magnética (RM) são os dois principais métodos de imagem usados para estudo do cancro de próstata. A próstata pode ser dividida em quatro zonas anatomicas: estroma fibromuscular periférico, central, de transição e anterior. A zona periférica contém as porções posterior e lateral da próstata, bem como as porções inferiores da próstata [19]. O espaço central contém a porção superior da próstata, incluindo os aspetos mais proximais da uretra e do colo da bexiga. A zona de transição está localizada logo antes da central e inclui a uretra distal à uretra da glândula central. Os feixes neurovasculares percorrem a superfície da próstata póstero-lateral e penetram também na cápsula prostática.

A maior parte do tecido glandular é encontrada nas zonas periférica e central (zona periférica: 70-80% tecido glandular; zona central: 20% tecido glandular) [20]. Alguns são encontrados na zona de transição (5% do tecido glandular). Assim, a maioria dos cancros que se desenvolvem a partir de tecido glandular serão encontrados nas zonas periféricas e centrais, enquanto cerca de 5% é encontrado na zona de transição [21].

A partir de 2011, a ressonância magnética (RM) é usada para identificar alvos para biópsia da próstata usando a RM de fusão com ultrassonografia ou apenas orientação por ressonância magnética. Em homens com suspeita clínica de CaP, a biópsia de fusão guiada por RM detetou cancro clinicamente significativo em 38% em comparação com 26% no grupo padrão de biópsia [22]. Em homens candidatos à vigilância ativa, a biópsia da próstata guiada por RM ou ultrassonografia detetou 33% dos cancros, em comparação com 7% da biópsia guiada por ultrassonografia padrão [23].

Para classificar lesões suspeitas na RM da próstata, o PI-RADS (sistema de relatórios e dados de imagem da próstata) define padrões para ressonância magnética multiparamétrica (mpMRI), incluindo criação e geração de imagens. A pontuação do PI-RADS versão 2 mostrou uma especificidade e sensibilidade de 73% e 95%, respetivamente, para a deteção de CaP [24].

Classificação de Gleason

O sistema de classificação Gleason é usado para avaliar o prognóstico do CaP e ajuda a orientar a terapia. O grau de Gleason é atribuído à neoplasia com base na sua aparência arquitetónica. Uma pontuação mais alta associa-se a tumores mais agressivos e com pior prognóstico. Pode variar entre 2 e 10, com um número mais elevado indicando maiores riscos de recidiva e mortalidade [25]. Indica quanto o tecido do tumor difere do tecido normal da próstata e o grau de desdiferenciação. O sistema Gleason é usado para classificar os tumores da próstata de 2 a 10, atribuindo-se um número de 1 a 5 para o padrão mais comum observado ao microscópio (Figura 1) e, em seguida, faz o mesmo para o segundo padrão mais comum. A soma desses dois números é a pontuação de Gleason.

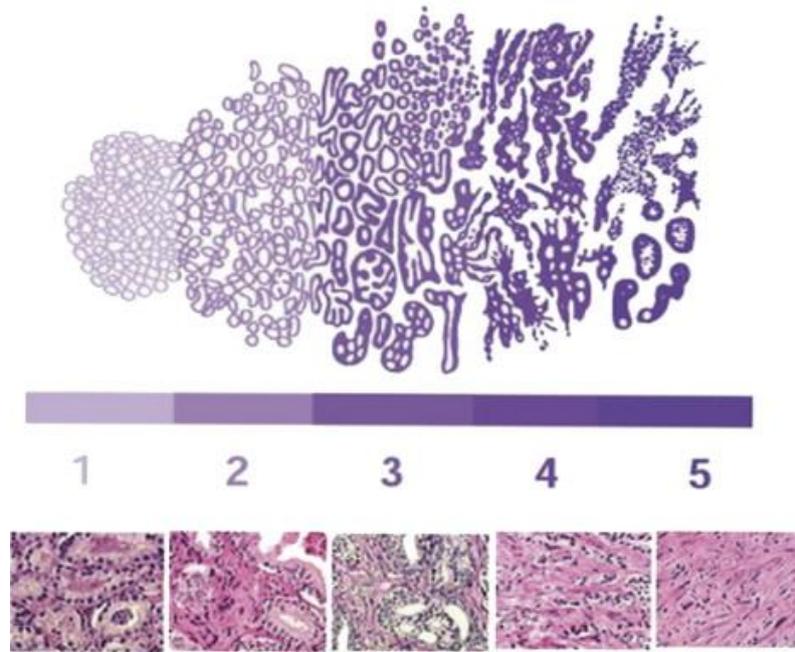


Figura 1 - Representação esquemática do sistema de pontuação ou grau de Gleason. Quanto maior o grau, maior o risco de complicações e pior prognóstico [25].

Estadio

Conhecer o estadio da doença ajuda a definir o prognóstico e é útil na tomada de decisão terapêutica. O sistema TNM (tumor / gânglios / metástases). inclui o tamanho do tumor, o número de gânglios linfáticos envolvidos e a presença de metástases à distância. No sistema TNM os estadios T1 e T2 correspondem a doença confinada à próstata, enquanto nos T3 e T4 a doença tem extensão locoregional ou extra-prostática. Não existe atualmente recomendação para usar tomografia por emissão de prótons (PET), tomografia axial computadorizada (TAC) ou cintigrafia óssea quando a neoplasia se encontra confinada a um estadio precoce, com baixo risco de metástases [26].

Cancro da Próstata resistente à castração hormonal

Embora grande parte do foco recente no CaP esteja relacionado ao diagnóstico excessivo e ao tratamento excessivo dessa doença, a cada ano aproximadamente 30.000 homens ainda morrem de CaP avançado nos Estados Unidos, tornando-a a segunda causa mais comum de cancro da próstata e de morte por cancro em homens americanos [27]. A terapia de privação androgénica é o tratamento sistêmico mais eficaz para o CaP recorrente. No entanto, a grande maioria desses doentes acabará por desenvolver resistência a abordagens hormonais, necessitando de outras formas de terapia. Em 2004 dois ensaios clínicos de fase III relataram uma vantagem de sobrevivência com o uso da quimioterapia com docetaxel em homens com CRPC metastático [28]. No entanto, embora o docetaxel seja ao mesmo tempo paliativo e associado à sobrevida, não é a resposta definitiva para doentes com CRPC, pois praticamente todos os homens desenvolvem resistência a esse agente quimioterápico ou são incapazes de tolerar os seus efeitos a longo prazo.

Essa necessidade clínica não atendida foi preenchida em 2010, quando uma fase aleatória do estudo TROPIC mostrou uma vantagem de sobrevivência para um novo taxano, cabazitaxel, sobre mitoxantrona em homens com CRPC metastático que progrediram após terapia anterior com docetaxel [29]. Com base nesses resultados, o cabazitaxel foi aprovado para o segundo tratamento de linha de CRPC metastático. No mesmo ano, um agente oral com a capacidade de suprimir a síntese de andrógenos, a abiraterona, também foi aprovado para melhorar a sobrevida quando avaliado contra placebo em homens com CRPC metastático refratário ao docetaxel [29]. Finalmente, um produto de imunoterapia autóloga, o sipuleucel-T, foi aprovado pelo FDA em abril de 2010 para o tratamento de CRPC metastático minimamente sintomático, com base nos resultados de um estudo aleatorizado de fase III comparando esse agente com placebo [30].

A ativação do recetor intracelular de androgenios (AR) por androgenios estimula a proliferação celular enquanto inibe a apoptose em células cancerígenas da próstata, resultando em crescimento e progressão tumoral. Na ausência de androgenios, o AR é ligado a proteínas de choque térmico (por exemplo, HSP90) e permanece principalmente no citoplasma. Após a ativação por androgenios, a AR dissocia-se das proteínas de choque térmico e transloca-se para o núcleo,

onde se liga (com co-ativadores e corepressores) aos elementos de resposta androgénica do DNA para induzir a ativação transcricional dos genes-alvo. Durante a progressão para a resistência à castração induzida pela supressão persistente de androgenio, a sinalização do AR é mantida através de uma variedade de mecanismos, incluindo aumento da expressão da amplificação do gene AR e alterações estruturais na AR causadas por mutações genéticas [31] ou variantes de reparação de mRNA [32].

O aumento da expressão, maior estabilidade e localização nuclear da AR na CRPC são todos indicativos de uma AR hiperativa, que pode ser estimulada por concentrações mínimas de androgenios circulantes [33]. Experiências em animais mostraram que a -expressão aumentada do AR é necessária e suficiente para o crescimento de muitas células cancerígenas da próstata na configuração dos níveis séricos de androgenio na castração [34]. Da mesma forma, em doentes com CRPC, foi encontrada transcrição aumentada do gene *AR* e persistência da proteína AR em células cancerígenas isoladas de amostras de tecido metastático [35]. Além da amplificação do gene *AR* do tipo selvagem, o aumento da quantidade de AR no CRPC pode ser causado por uma maior estabilização e rotatividade mais lenta da AR [36]. Além disso, enquanto a AR do tipo selvagem é ativada apenas por androgenios, a especificidade da ligação ao ligando pode ser ampliada por mutações somáticas geralmente ocorrendo no domínio de ligação ao ligante do AR [37]. Essas mutações podem levar à diminuição da especificidade e à ativação inadequada do recetor. por não-androgenios, resultando em um fenótipo promíscuo de AR que pode levar à ativação por estrogénios, progestinas, tirosina-quinases e outras moléculas de sinalização oncogénicas. Por fim, o estado resistente à castração pode promover o *splicing* alternativo do gene AR, produzindo transcritos variantes de mRNA sem o domínio de ligação ao ligante, que são tipicamente ativos [38]. Assim, existem vários mecanismos de resistência ao androgenio mediados por AR terapia de privação, cada uma das quais pode ser antecipada para exigir diferentes abordagens terapêuticas.

Embora a terapia de privação de androgenio (usando agonistas ou antagonistas da hormona libertadora de hormona luteinizante) diminua os níveis séricos totais de testosterona em aproximadamente 95%, essa intervenção inibe

principalmente a síntese de androgenio gonadal e não afeta os androgenios extra-gonadais. Está agora estabelecido que, no CRPC, há produção contínua de androgenios pelas glândulas suprarrenais e pelas próprias células tumorais [39]. Além disso, no estado castrado, as concentrações intraprostáticas de testosterona e di-hidrotestosterona permanecem suficientes para estimular o AR. Os principais mecanismos pelos quais o CRPC é capaz de superar os baixos níveis circulantes de androgenio são a conversão local de androgenios adrenais (por exemplo, androstenediona) em testosterona e a síntese intratumoral de androgenios de novo através da expressão aumentada de enzimas esteroidogénicas como o citocromo P450 17 (CYP17). Essa enzima é alvo de vários novos fármacos para a CRPC [40].

Os co-ativadores (e co-repressores) funcionam como adjuvantes de sinalização para a transcrição mediada por AR, facilitando ou inibindo a ligação e a ativação do AR aos elementos de resposta androgénica nas regiões promotoras e potenciadoras do DNA. Entre os cor-reguladores transcricionais mais importantes no CaP está a família p160 de co-ativadores de recetores de esteroides nucleares [41]. Experiências e estudos pré-clínicos de tumores de próstata humanos sugerem fortemente que o aumento de expressão desses co-ativadores de recetores de esteroides é importante no surgimento da castração. Além disso, recentemente foi relatado que outro coativador de recetor nuclear, *NCOA2*, funciona como um oncogene no CaP [42]. Finalmente, também pode estar envolvida no desenvolvimento a regulação negativa de corepressores relacionados com o AR de CRPC [43].

A resistência à castração também pode ser causada pela ativação de outras vias de sobrevivência oncogénicas por meio da ativação promíscua de AR por não-androgénios (por exemplo, estrógenos, progestinas, anti-androgénios, tirosina-quinases recetoras) ou por mecanismos alternativos, incluindo a ativação de vias de sinalização compensatórias [44]. Por exemplo, foi demonstrado que a sinalização, que normalmente é dependente do AR, pode ser desencadeada na CRPC mesmo em níveis indetetáveis de androgenio pela ativação de outros recetores tirosina-kinases (por exemplo, recetor do fator de crescimento insulínico-1, recetor do fator de crescimento epidérmico, recetor do fator de crescimento endotelial vascular) e suas vias de transmissão de sinal associadas

(por exemplo, fosfoinosítido 3-cinase / Akt / alvo de mamíferos da via da rapamicina, proteína quinase ativada por Ras / Raf / proteína ativada por mitogénio / via cinase regulada por sinal extracelular) [45]. Além disso, foi observada diafonia entre a tirosina-quinase da superfície celular HER2 / neu e / ou HER3 e a AR intracelular no CRPC, resultando em AR ativado por HER2 / neu na ausência de androgénios [46]. A ativação de outros recetores e suas vias (por exemplo, recetor do fator de crescimento tumoral-b, Wnt / b-catenina, Src quinase e recetor da interleucina-6) também está implicada na interferência com o AR [47].

Outro mecanismo potencial de resistência à castração envolve a ativação de vias antiapoptóticas associadas à sobrevivência. Em seres humanos e em modelos animais de CaP avançado, verificou-se que a sobreexpressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 confere resistência à supressão de androgénios [48]. Além disso, outros fatores antiapoptóticos relacionados ao Bcl-2, como o Bcl-XL e a survivina, também são frequentemente sobreexpressos no CRPC, mas não na doença respondedora a hormonas [49].

Moléculas Associadas

Existem várias moléculas associadas ao CaP, por serem marcadores para a sua deteção ou por estarem mecanisticamente implicadas. Algumas destas moléculas estão associadas com a osteocalcina e o seu recetor, vitamina K e arginase na forma de arginase I e arginase II.

Vitamina K

Esta vitamina desempenha um papel importante na coagulação, além de ser favorável na osteoporose, doenças cardiovasculares e cancro. Estudos recentes revelaram o potencial anticancerígeno desempenhado pela vitamina K e seus derivados (Figura 2) como um tratamento promissor para CaP [50,51]. A vitamina K é uma vitamina lipossolúvel, importante para a função de inúmeras proteínas dentro do organismo, como os fatores de coagulação (II, VII, IX, X e proteínas C

e S), osteocalcina (uma proteína formadora de ossos) e MGP (uma proteína anticalcica) [52,53,54]. A vitamina K é um grupo de moléculas estruturalmente relacionadas que possuem um anel 2-metil-1,4-naftoquinona e uma cadeia alifática variável. A cadeia alifática variável diferencia naturalmente a vitamina K em duas formas que ocorrem: vitamina K1 (filoquinona) e vitamina K2 (menaquinona). A Forma sintética da vitamina K sem a cadeia alifática é denominada vitamina K3 ou menadiona, usada como provitamina [55].

Após absorção intestinal, as vitaminas K1 e K2 são transportadas para o fígado por lipoproteína rica em LDL [56,57]. A vitamina K2 é transportada das lipoproteínas de baixa densidade aos tecidos enquanto a vitamina K1 é excretada pelo organismo humano. Altos níveis de vitamina K2 são acumulados nos tecidos periféricos e são detetados no cérebro, aorta e pâncreas, e baixos níveis estão presentes no fígado [56,57].

Vitamina K e Cancro da Próstata

Num estudo realizado no ano de 2003 por Nelson et al. [58]. sugeriram que as taxas de mortalidade devido à maior prevalência de CaP são mais elevadas nos países ocidentais e europeus quando comparados aos países asiáticos por causa da dieta e outras razões relacionadas ao estilo de vida. Com base nos dados disponíveis, estima-se que menos de 5% de todo os casos de CaP seja hereditário. No entanto, um estudo caso-controlo de base populacional mostrou que o risco de CaP aumenta em indivíduos com história familiar [59]. O CaP parece resultar da acumulação de vários eventos mutacionais genéticos uni- ou poligénicos. Um dos principais eventos reporta-se à perda de genes supressores tumorais, como o p53, que sofre mutação em até 64% dos tumores e p21 em até 55%. Também foi identificado o gene supressor tumoral p73 que possui homologia com o p53. No CaP, o MMAC1/p10 foi descrito como o gene supressor tumoral com maior taxa mutacional, que contribui para a aquisição do fenótipo metastático [60]. A expressão excessiva do p53 mutante, a família de proteínas bcl-2 e a amplificação do AR parece estar relacionada com um fenótipo refratário a tratamento hormonal [61]. Estudos epidemiológicos conduzidos por Nimptsch et al. [62] sugeriram que a ingestão alimentar de menaquinonas é especialmente benéfica na prevenção de CaP fatal. Esses estudos são ainda

suportados por um estudo Fase I/II, usando uma terapia baseada em vitamina K3 (Apatone), na qual os doentes apresentaram progressão bioquímica retardada [63], sugerindo que os tratamentos baseados em vitamina K são promissores para doentes com CaP em estadio avançado.

Por outro lado, estudos in vitro demonstraram que a vitamina K2 é impedida a transformação maligna de células epiteliais normais da próstata (RWPE-1), através da expressão do fator de crescimento derivado do hepatoma (HDGF) e modulando a via de sinalização da apoptose [64]. Estudos experimentais também provaram que a vitamina K2 é eficaz contra os tipos de CaP androgenio-dependentes e -independentes [65]. Além disso, é demonstrado que a vitamina K2 tem como alvo preferencial o crescimento de células malignas VCaP resistentes à castração que possuem AR de tipo selvagem, enquanto nenhum efeito tóxico foi encontrado quando as células prostáticas benignas (células RWPE) foram tratadas com vitamina K2 nas mesmas doses do tratamento das células de CRPC VCaP [66]. Os resultados deste estudo também indicaram que a vitamina K2 pode ser um inibidor muito potente da invasão, crescimento e metastização de células CaP resistentes à castração. Tomados em conjunto, esses estudos apoiam o uso da vitamina K2 como agente preventivo e terapêutico da CaP. No contexto clínico, o PSA é considerado um marcador importante usado no diagnóstico e monitorização de vários resultados do tratamento. O fato de a vitamina K2 ter a capacidade de suprimir a expressão de PSA em células de CaP dependentes de androgenios e resistentes à castração [65,66] sugerem que a vitamina K2 poderia ser uma terapia com potencial visando a via de sinalização. Foi demonstrado ainda que a vitamina K2 inibe de forma potente o crescimento tumoral dependente e independente de hormonas em um modelo de rato [65]. Com base em várias abordagens experimentais, verificou-se que a vitamina K2 evita efetivamente as propriedades malignas das células VCaP CRPC, visando especificamente a apoptose mediada por ROS e a progressão do ciclo celular [66]. Este estudo também sugeriu que a vitamina K2 impedia as metástases por inibir as principais moléculas de sinalização. Da mesma forma, outro estudo mostrou que a vitamina K4, um análogo da menadiona é eficaz contra células CaP metastáticas ósseas PC-3 através do direcionamento da proteína antiapoptótica Bcl-2 [67].

Para verificar os resultados desses achados *in vitro*, certamente são necessários mais estudos *in vivo* para investigar os efeitos terapêuticos do tratamento de células CRPC com vitamina K2. Mecanicamente, a vitamina K2 demonstrou direcionar genes relacionados à inflamação, como *HMGB1*, *RAGE*, *IL6* e *IL8*, em células CaP, além de inibir as expressões de *VEGFA* e *AR* [65]. A pesquisa de acompanhamento deste estudo mostrou que a vitamina K2 pode realmente inibir os principais marcadores antiapoptóticos e de células estaminais (Bcl-2, Survivin, Mcl-1, Akt, c-Myc, Vimentin, HMGB1 e HMGB2) em Células VCaP [66]. Um estudo *in vivo* anterior realizado por Taper et al. defendiam o uso de uma combinação de tratamento com K3 e vitamina C para o CaP. O seu estudo foi desenvolvido para avaliar o efeito combinado da vitamina C e vitamina K3 na vida útil de ratinhos com crescimento de tumor de próstata derivado da linha DU 145. Neste estudo, ratinhos nude implantados com células DU 145, viveram significativamente mais quando tratados com a combinação de vitamina C e K3, do que os controlos portadores do tumor DU 145 que não receberam o tratamento. Esta terapia combinada parece ser um tratamento seguro, uma vez que ratinhos sob tratamento com vitamina C e K3 não exibiram toxicidade. O mecanismo anticancerígeno subjacente deste tratamento combinado é mediado por morte celular [68], também de acordo com resultados de outros estudos *in vitro* [69,70].

considerada como um alvo potencial para terapias anticancerígenas. Esse conceito de um nutriente (ou seja, arginina) sendo direcionado como terapia para o cancro não é novidade, no entanto, nos últimos anos, dados crescentes continuaram a revelar que o metabolismo das células tumorais pode ser uma área importante e inexplorada que pode ser usada em combinação com outras terapias contra o cancro. Na análise a seguir, discutiremos o efeito *Warburg* e alguns dos conceitos em evolução no metabolismo das células cancerígenas que poderiam ser potencialmente explorados para fins terapêuticos. Após essa discussão geral sobre o metabolismo das células cancerígenas, examinaremos as evidências *in vitro* e *in vivo* que apoiam um papel da arginina como um alvo metabólico potencial para a terapia anticancerígena, incluindo o metabolismo celular da arginina e o papel do microambiente nas metástases e no crescimento de tumores. Destacamos os estudos atuais que verificaram se a suplementação ou privação de arginina poderia ou não fornecer terapias metabólicas eficazes para doentes com cancro.

A arginina é um aminoácido condicionalmente essencial, o que significa que o corpo pode sintetizar quantidades suficientes de arginina para atender às necessidades metabólicas basais, em tempos de stresse ou crescimento rápido (por exemplo, trauma, infecção, desenvolvimento neonatal), no entanto, os requisitos de arginina estão elevados e a disponibilidade torna-se limitante. Nos mamíferos, a arginina é sintetizada através de duas principais vias. O primeiro é referido como o "Eixo Intestinal-Renal", no qual os aminoácidos da dieta (isto é, prolina, glutamato e glutamina) são convertidos em citrulina nos enterócitos intestinais. A citrulina recém-sintetizada é então liberada na circulação portal hepática. A depuração hepática da citrulina é praticamente nula e, portanto, toda a citrulina plasmática recircula da circulação portal para a circulação sistêmica. Uma vez na circulação sistêmica, a maioria da citrulina é convertida em arginina pelo rim, que expressa duas enzimas-chave do ciclo da uréia citosólica. Essas enzimas são argininosuccinato sintase (ASS) e argininosuccinato liase (ASL). Bioquimicamente, a arginina celular pode ser sintetizada dependendo da expressão dessas enzimas metabolizadoras da arginina ou degradada se a célula expressar arginase ou outras enzimas degradadoras da arginina. A segunda via da biossíntese da arginina, que é semelhante ao eixo intestino-renal,

é referida como o “ciclo da citrulina-óxido nítrico” e também se baseia na expressão dessas mesmas enzimas [72]. O ciclo da citrulina-NO existe nas células imunes como um mecanismo postulado para garantir um suprimento constante de arginina nos linfócitos para a síntese de NO, um participante essencial na resposta imune do hospedeiro. Nesta via, a arginina é convertida em NO e citrulina. Mais uma vez, ASS e ASL interconvertem a citrulina citosólica dentro da célula imune em arginina para produção contínua de NO conforme necessário para a defesa do hospedeiro.

Metabolismo da Arginina nas Células tumorais

Em termos de crescimento e proliferação tumoral, a capacidade de sintetizar a arginina endógena a partir de precursores metabólicos está associada expressão de ASS. Curiosamente, nenhum estudo demonstrou tumores nulos para o ASL [73]. No entanto, os tumores podem ser convenientemente agrupados naqueles que expressam ASS e naqueles que não expressam ASS. O mecanismo do motivo pelo qual essa dicotomização da expressão ocorre com o ASS, mas não com o ASL, é desconhecido. A ASS é considerada um gene de manutenção em células normais e uma enzima biossintética com limitação de taxa em hepatócitos e células endoteliais. Como mencionado, muitas linhas de células tumorais não expressam ASS [74] e, portanto, têm uma dependência crítica da arginina exógena. Assim, o ASS tumoral é um potencial biomarcador prognóstico e preditor de sensibilidade à terapia de privação de arginina [75]. As células tumorais que perderam ou não têm a capacidade de sintetizar arginina de novo são consideradas auxotróficas para a arginina [76]. Várias células tumorais humanas, incluindo as de melanoma, de carcinoma hepatocelular e de carcinoma da próstata, são frequentemente deficientes em ASS [77]. O mecanismo pelo qual o ASS é silenciado nos tumores não é completamente compreendido. Trabalhos anteriores em linhas celulares de linfoma demonstram silenciamento transcricional dependente da metilação da AS, enquanto células de melanoma reprimem o promotor da ASS através do fator-1alfa induzível por hipoxia (HIF1 α) [75]. Evidências adicionais demonstraram o silenciamento transcricional de EA em tumores devido à hipermetilação genética das sequências promotora [78] ou outros mecanismos de silenciamento [79], embora

os mecanismos moleculares completos ainda precisam ser elucidados. Devido ao papel crítico do AS na biologia do tumor, esse evento de silenciamento do ASS pode funcionar como um supressor de tumor. Consistente com essa ideia, estudos em linhas de células de sarcoma e carcinoma de bexiga demonstraram que o ASS reduz a capacidade de formação de colônias, proliferação e invasão de células tumorais e anula o crescimento de xenoinxertos tumorais em modelos de ratos [80].

A segunda enzima chave na biossíntese da arginina é a argininosuccinato liase (ASL), que atua imediatamente a jusante da ASS e catalisa a conversão do argininosuccinato em arginina e fumarato. O ASL é crítico na canalização da arginina para a produção de NO através do ciclo da NO-citrulina. A função da ASL no cancro parece depender do tipo de tumor, e é necessário mais trabalho para entender as implicações da expressão de ASL no cancro humano. Verificou-se que o ASL é regulado no carcinoma hepatocelular e associado à agressividade mediada por sinalização de NO e ciclina A2 [81]. Estudos demonstraram que o ASL metilado contribui para a auxotrofia da arginina do glioblastoma multiforme, com a perda de AS e ASL conferindo maior sensibilidade ao ADI-PEG20, um composto que demonstrou diminuir significativamente os níveis de arginina no soro [82]. Existem numerosos estudos mostrando que a arginina é necessária para o crescimento de células tumorais *in vitro*, consistente com a ideia de que muitos tumores são auxotróficos para a arginina. Scott e colaboradores [83] realizaram uma triagem de inanição por arginina de 26 linhas celulares humanas ou murinas diferentes e mostraram que, com inanição por arginina, menos de 10% sobreviveram por mais de 5 dias. Nas células que permanecem viáveis, no entanto, a inanição por arginina é reversível com a reposição de arginina. É importante notar, especialmente do ponto de vista terapêutico do cancro, que a inanição por arginina não apenas interrompe o crescimento celular, mas na verdade induz a morte celular em algumas linhas celulares. Ao nível molecular, os mecanismos exatos de indução da morte celular não são completamente elucidados. No entanto, a inanição por arginina tem sido associada à indução de autofagia [84], bem como à apoptose. Consistente com esta ligação à apoptose, as células auxotróficas da arginina na ausência de arginina sofrem uma ativação da proteína X associada ao Bcl-2 (BAX) que

provavelmente inicia a cascata apoptótica. A indução conhecida de autofagia em resposta à inanição por arginina é consistente com o crescente vínculo entre autofagia e apoptose de células cancerígenas. A Autofagia e a detecção de nutrientes são fortemente ligada a mTOR e GCN2 quinase [85]. Por exemplo, células cancerígenas colorretais in vitro esgotam rapidamente as reservas intracelulares de arginina, que são conhecidas por desencadear a ativação da via mediada por GCN2 e a inibição da sinalização de mTOR [86]. Em células tumorais em que se inibiram a expressão do AS, a depleção de arginina exógena ativa vias de sinalização relacionadas com stresse que também podem resultar em morte celular. A sinalização do mTOR-C1 é inibida quando a privação de arginina é detetada, resultando em disfunção do retículo mitocondrial e endoplasmático, quebra do DNA nuclear e autofagia da cromatina / célula [73]. Se a síntese proteica não for restaurada pelo transporte exógeno de aminoácidos, ocorre a morte celular. Atualmente, esse fenômeno é o objetivo de vários estudos para explorar vias relacionadas com stresse como uma terapia contra o cancro usando três abordagens diferentes; privação nutricional de arginina, inibição do transporte de arginina e degradação enzimática da arginina.

Metabolismo Arginina no Microambiente tumoral

A interação dinâmica entre a célula tumoral e o hospedeiro é complexa porque cada uma pode afetar significativamente a outra. Ou seja, as células tumorais interagem com as células circundantes para criar um microambiente tumoral que é permissivo para o crescimento e proliferação do próprio tumor. Os tumores manipulam células hospedeiras não transformadas para criar um microambiente de suporte e proteção, esgotando os nutrientes essenciais e acumulando metabólitos imunossupressores. Um exemplo é o esgotamento local da arginina pela expressão de arginase ou óxido nítrico sintase indutível (iNOS), resultando na supressão das respostas das células T específicas do tumor [87]. Os tumores ativam a arginase expressando a ciclo-oxigenase-2, cuja concentração é elevada no microambiente do tumor. Essa expressão da ciclooxigenase também ajuda na supressão da ativação das células T [88]. Além disso, macrófagos, granulócitos e células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs) que se co-

localizam dentro do microambiente tumoral também pode expressar arginase e iNOS para exacerbar ainda mais esse ambiente imunossupressor local. Esse subconjunto de células mielomonocíticas, altamente eficiente na supressão de células T ativadas, promove crescimento e metástase de tumores. Com essa supressão de células T, a resposta imune adaptativa específica do tumor é enfraquecida, bem como a resposta imune em geral [87]. Estudos recentes em modelos de cancro de mama em ratos mostraram que a suplementação com arginina prolongou a sobrevivência do hospedeiro e inibiu o crescimento do tumor devido ao aprimoramento das respostas imunes inatas e adaptativas [89].

Osteocalcina

A osteocalcina (OC) é a principal proteína da matriz óssea não colágena expressa no osso [90]. A expressão de OC é regulada transcricionalmente pela vitamina D e limitada exclusivamente às células da linhagem de osteoblastos [91]. O OC é sintetizado, secretado e depositado por osteoblastos maduros no momento da mineralização óssea. Serve como marcador fenotípico para osteoblastos maduros [92]. Apesar de sua especificidade de expressão bem caracterizada em ratos transgênicos [93], a função precisa da OC na remodelação óssea permanece incerta. A localização do OC nas superfícies de formação óssea [94] e o aumento da mineralização óssea observada nos ratos knockout do gene OC [95] apoiam um papel do OC na supressão da mineralização óssea. Devido à sua especificidade tecidual, a regulação da expressão de OC tem sido extensivamente estudada em células ósseas. Muitos elementos reguladores foram identificados na região proximal de 800 pb dos promotores. Isso inclui OSE1, OSE2, AP-1 / VDRE e GRE. OSE1 e OSE2 foram identificados no promotor OC (mOC) de ratos e são responsáveis pela sua atividade específica do tecido nos osteoblastos. Ambos os elementos cis são ocupados por fatores de transcrição específicos para osteoblastos, *Osf1* e *Runx2*, respectivamente [96]. O *Runx2* pertence à família de fatores de transcrição do domínio runt [97] e tem papel indispensável na diferenciação, maturação e formação óssea dos osteoblastos [98]. Demonstrou-se que *Runx2* se liga ao local OSE2 e regula o promotor de mOC de maneira específica de

tecido [99]. Ao contrário do promotor mOC [100], o promotor hOC é altamente induzível pela vitamina D3 [101]. Como resultado, os estudos enfatizaram sua regulação pela vitamina D3 nas células ósseas [102]. Pouco se sabe sobre a regulação basal do gene. O elemento de resposta à vitamina D (VDRE) foi mapeado para o promotor proximal e é contíguo a um local de AP-1 [103]. Estudos sugerem que vários fatores de AP-1 ocupam esse local em diferentes estágios do desenvolvimento dos osteoblastos e regulam fortemente as interações entre o receptor de vitamina D (VDR) e seus locais de ligação conhecida. Nos osteoblastos em proliferação, a ligação dos heterodímeros c-Fos e c-Jun ao local AP-1 suprime a atividade do promotor OC (rOC) de rato, enquanto a associação de Fra-2 e JunD nos osteoblastos pós-proliferação facilita o VDR / retinóide A ligação do receptor X ao promotor rOC e induz sua atividade [104].

O cancro de próstata é a segunda principal causa de morte por cancro nos homens da América do Norte. Apesar de sua ocorrência comum, os mecanismos moleculares responsáveis pelo crescimento do cancro de próstata, a progressão independente do androgênio (AI) e a aquisição do potencial metastático ósseo são pouco caracterizados. As proteínas da matriz óssea, como OC, sialoproteínas ósseas e osteopontina, são expressas em altos níveis em amostras primárias e metastáticas de cancro de próstata. Existia anteriormente a hipótese de que o cancro de próstata adquirisse "propriedades ósseas" para prosperar e crescer no microambiente ósseo [105]. O objetivo deste estudo, portanto, é entender melhor as propriedades osteomiméticas das células do cancro de próstata, estudando a regulação da expressão do gene hOC em uma linha celular de cancro de próstata da AI, PC3. As células PC3 foram estabelecidas a partir de lesões metastáticas ósseas de um doente com cancro de próstata. É considerada uma linha celular AI altamente agressiva que não expressa nem AR nem PSA, e não requer andrógeno para crescimento ou sobrevivência. Quando injetadas por via intracardíaca em ratos atímicos, as células PC3 têm alta propensão a metastizar nos ossos. Neste estudo, estabeleceram a hierarquia funcional de três elementos reguladores, OSE1, OSE2 e AP-1 / VDRE, na regulação da atividade do promotor hOC em células PC3 (OSE1 AP-1 / VDRE OSE2). Além disso, através da EMSA, identificaram

Runx2, JunD / Fra-2 e Sp1 como os fatores de transcrição que regulam OSE2, AP-1 / VDRE e OSE1, respectivamente. Ao expressar Runx2 tipo fator específico para os osteoblastos e ativar seletivamente o fator Ap1 Fra-2, o PC3 é capaz de se comportar como um osteoblasto maduro na ativação da expressão de OC. Com base nestes resultados, um modelo foi construído para explicar como as células de CaP se podem tornar osteomiméticas. Essa alteração bioquímica pode contribuir para o fenótipo osteoblástico das células cancerígenas da próstata frequentemente observadas em lesões esqueléticas metastáticas.

OBJETIVOS

Objetivos

Este estudo tem como principais objetivos:

- Avaliar a associação de polimorfismos nos genes da redutase do epóxido de vitamina K (VKORC1), do recetor da osteocalcina (G protein-coupled receptor class C Group 6 Member A, GPRC6A), da arginase I (ARGI), da arginase II (ARGII) e do óxido nítrico sintetase-2 (NOS2) com a resistência à castração hormonal e tempo até metastização óssea, em doentes com CaP hormonotratados;
- Verificar se estes polimorfismos têm associação com doença avançada e fenótipo mais agressivo nos doentes com CaP.

MATERIAL E MÉTODOS

Material e Métodos

População

Participaram neste estudo 119 indivíduos do sexo masculino, com idades entre os 67 e 76 anos, com a maioria em estadios avançados, sob ou pós tratamento hormonal.

Extração de DNA

A extração do DNA genómico foi efetuada a partir das amostras de sangue total que foram colhidas por venipunção do antebraço de indivíduos com cancro da próstata, pelo método adaptado de *salting-out* [106]. O sangue colhido em tubo com EDTA, era misturado num tubo Falcon com 1ml de TKM X-100 por ml de sangue, adicionando 25µl de IPGEPAL CA 630 por cada ml de sangue e homogeneizado. Após centrifugação a 2200rpm, 4°C durante 15 minutos, foi rejeitado o sobrenadante, adicionando-se em seguida 1ml de tampão TKM 1 por cada ml de sangue, centrifugando-se a 1600rpm, a 4°C, por 10 minutos. Após as lavagens repetidas por 3 vezes, ressuspendeu-se o pellet (através de uso de um vortex) em solução TKM 2, numa proporção de 160µl por ml de sangue, adicionando-se em seguida 10µl de SDS 10% por ml de sangue. Posteriormente, ressuspendeu-se com auxílio de uma micropipeta e incubou-se a 55°C por 10 minutos.

Terminada a incubação, foi transferido o conteúdo para um eppendorf de 2,5ml juntando-se 60µl de NaCl saturado por cada ml de sangue, com agitação. De seguida centrifugar a 12000rpm, à temperatura ambiente, durante 30. Após a centrifugação, verter o sobrenadante para um tubo de 5ml, adicionar 2 volumes de etanol absoluto gelado (-20°C) e misturar por inversão. Por fim, colocar 200µl de TE num eppendorf devidamente identificado e recapturar o DNA precipitado nos tubos com etanol absoluto gelado e colocar nos eppendorfs identificados.

Quantificação DNA

A quantidade e pureza do DNA foram avaliadas por espectrofotometria, através da leitura de absorvância a 260 e 280 nm e razão entre as absorvâncias 260/280nm (NanoDrop® ND-2000, Thermo Scientific), usando como branco o tampão de eluição.

Genotipagem

Foi selecionado um polimorfismo de um nucleótido (SNP) para cada um dos seguintes genes: *NOS2*, *GPRC6A*, *VKORC1*, *ARG I* e *ARG II*.

Para os genes *GPRC6A* (receptor da osteocalcina, rs2274911), *VKORC1* (redutase do epóxido de vitamina K, rs2359612), *ARG I* (arginase 1, rs2781667), *ARG II* (arginase 2, rs3742879) e *NOS2* (Oxido Nítrico Sintase 2, rs944722) foram determinados por *endpoint analysis*, esta utiliza duas sondas de hidrólise marcadas de maneira diferente, que se ligam a um alelo para um gene específico de interesse. Durante a amplificação, cada sonda será incorporada num *amplicon* contendo o alelo específico, enquanto liberta fluorescência no seu comprimento de onda específico. As proporções de fluorescência são analisadas para determinar a que alelo as sondas de hidrólise estavam ligadas. Foram, então, aplicadas sondas específicas para os polimorfismos em estudo, de forma a se identificar que tipo de alelo as amostras continham, neste processo foi usado uma placa de 96 poços, onde em cada poço é colocado 6,75µl de cada amostra que contém DNA de cada indivíduo, mais 8,25µl que é a junção de 7,5µl de TaqMan Genotyping Master mix e 0,75µl de sonda, cada uma sendo diferente para cada tipo de polimorfismo estudado. Depois de ter a placa pronta, esta correu num aparelho de PCR em tempo real (LightCycler® 480 Instrument II, Roche Life Science)

Análise Estatística

As frequências genóticas observadas foram analisadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) com o teste Qui-quadrado e por gráfico de Kaplan-Meier. Este teste foi utilizado para avaliar as diferenças de proporções entre estratificações de doença e a distribuição genotípica. Utilizou-se o *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) como medida de risco para doença mais agressiva regressão logística binária. Foram analisadas curvas de Kaplan-Meier como forma de avaliar a associação dos polimorfismos genéticos com os outcomes clínicos.

A análise estatística foi realizada no programa SPSS 21.0, tendo-se considerado $p < 0.05$ como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Resultados

A descrição da população pode ser observada na tabela 1, onde podemos verificar que esta população é sobretudo idosa, uma vez que a mediana da idade dos indivíduos é 72 anos. A idade elevada também está associada com os níveis de PSA e o estadio da doença, uma vez que mais de metade dos indivíduos apresenta um cancro num estadio bastante avançado e agressivo, podendo observar que alguns destes são resistentes á castração hormonal. Nesta tabela também é apresentado o tempo de follow-up dos doentes desde o diagnóstico da doença, este que varia entre os 44 meses (3 anos e 8 meses) e 97 meses (8 anos e 1 mês), o que é considerado um bom tempo de acompanhamento do individuo com a doença. Também realçar que destes 119 indivíduos do sexo masculino, onde todos foram sujeitos a terapia hormonal, cerca de 42% são hormono-resistentes.

Tabela 1. Descrição da informação clínico-patológica dos doentes participantes no estudo com cancro de próstata submetidos a hormonoterapia. Frequência (percentagem)

Variável	N (%)
Idade, anos	72.2 (66.9-75.9) *
Altura, cm	167.0 (163.0-172.0) *
Peso, kg	73.0 (65.0-82.0) *
IMC, kg.m ⁻²	26.1 (24.1-28.4) *
IMC, OMS	
<25	40 (33.6)
25 – 30	60 (50.4)
≥ 30	19 (16.0)
<i>Consumo de tabaco</i>	
Nunca	59 (49.6)
Ex-fumador	47 (39.5)
Activo	11 (9.2)
Sem informação	2 (1.7)
<i>Cut off de PSA 20, ng.mL⁻¹</i>	
<20	61 (51.3)
≥ 20	58 (48.7)
<i>Grau de Gleason</i>	
≤ 6	37 (31.1)
7	31 (26.1)
≥ 8	31 (26.1)
Sem informação	20 (16.8)
<i>Estadio da doença, TNM</i>	
T1-T2	49 (41.2)
T3-T4	70 (58.8)
<i>Metástases ao diagnóstico</i>	
No	78 (65.5)
Yes	41 (34.5)
Tratamento definitivo	
Não	103 (86.6)
PR/RT	16 (13.4)
Tipo de hormonoterapia	
aLHRH	16 (13.4)
BAT	103 (86.6)
PSA, ng.mL ⁻¹	19.0 (7.3-43.8) *
Tempo de follow-up, meses	70.7 (44.6-96.9) *

* Mediana (Intervalo inter-quartil). IMC, índice de massa corporal; PR/RT, prostatectomia radical/radioterapia; aLHRH, agonista da hormona libertadora de hormona luteinizante; BAT, bloqueio androgénico total; PSA, antígeno específico da próstata

Na tabela 2 é possível observar a descrição dos polimorfismos associados a este cancro e que foram analisados durante esta experiência, como também a sua distribuição genotípica e alélica.

Tabela 2. Análise descritiva dos polimorfismos genéticos, com apresentação da sua distribuição genotípica e alélica segundo os modelos genéticos na população de doentes com CaP.

	<i>NOS2</i> exão16	<i>NOS2</i> intrão16	<i>NOS2</i> intrão20	<i>ARG1</i>	<i>ARG2</i>	<i>VKORC1</i>	<i>GPRC6A</i>
	rs9282801	rs229518	rs944722	rs2781667	rs3742879	rs2359612	rs2274911
Modelo genético	A > G	G > T	G > A	T > C	A > G	A > G	A > G
Aditivo							
Ancestral	65 (60.7)	46 (42.2)	28 (25.9)	16 (15.2)	63 (55.3)	16 (14.4)	57 (62.6)
Heterozigótico	29 (27.1)	44 (40.4)	55 (50.9)	39 (37.1)	43 (37.7)	55 (49.5)	29 (31.9)
Variante	13 (12.1)	19 (17.4)	25 (23.1)	50 (47.6)	8 (7.0)	40 (36.0)	5 (5.5)
Dominante							
Ancestral	65 (60.7)	46 (42.2)	28 (25.9)	16 (15.2)	63 (55.3)	16 (14.4)	57 (62.6)
Heterozigótico/Variante	42 (39.3)	63 (57.8)	80 (74.1)	89 (84.8)	51 (44.7)	95 (85.6)	34 (37.4)
Recessivo							
Ancestral/Heterozigótico	94 (87.9)	90 (82.6)	83 (76.9)	55 (52.4)	106 (93.0)	71 (64.0)	86 (94.5)
Variante	13 (12.1)	19 (17.4)	25 (23.1)	50 (47.6)	8 (7.0)	40 (36.0)	5 (5.5)
Alelos							
Ancestral	79.5 (74.0)	68 (62.0)	55.5 (51.0)	35.5 (34.0)	84.5 (74.0)	43.5 (39.0)	71.5 (79.0)
Variante	27.5 (26.0)	41 (38.0)	52.5 (49.0)	69.5 (66.0)	29.5 (26.0)	67.5 (61.0)	19.5 (21.0)

O alelo ancestral corresponde ao nucleótido substituído. O alelo ancestral foi determinado de acordo com *Ensembl* (<https://www.ensembl.org/>).

Como resumo da análise da regressão logística univariada e multivariada é possível perceber que no caso do genótipo GA/AA da NOS2 intrão 20 dominante existe um risco menor de 60% para estadios T3-T4 quando feito a análise univariada. Na multivariada esse risco passa para 70% menor, ou seja, doentes com este genótipo têm menos probabilidade de estar nestes estadios avançados e maior proteção contra os mesmos, sendo o genótipo de risco o GG (Tabela 3).

Tabela 3. Associação entre os polimorfismos no gene NOS2 e as variáveis clinico-patológicas

Modelo genético	NOS2 exão 16			NOS2 intrão 16			NOS2 intrão 20		
	Aditivo	Dominante	Recessivo	Aditivo	Dominante	Recessivo	Aditivo	Dominante	Recessivo
Idade, tempo até doença ^a	0.877 *	0.964 *	0.661 *	0.819 *	0.548 *	0.680 *	0.068 *	0.542 *	0.080 *
IMC, EP/OB, cut off >25 ^b	0.580 **	1.5 (0.6-3.5)	0.6 (0.1-1.2)	0.232 **	1.5 (0.7-3.5)	0.3 (0.1-1.2)	0.406 **	0.5 (0.2-1.4)	1.5 (0.6-3.7)
Valor de P		0.347	0.347		0.305	0.095		0.202	0.418
IMC, OB, cut off >30 ^b	0.722 **	0.9 (0.3-2.7)	2.3 (0.3-19.5)	0.937 **	1.2 (0.4-3.6)	0.9 (0.2-3.6)	0.857 **	1.0 (0.3-3.4)	1.4 (0.4-5.6)
Valor de P		0.851	0.435		0.720	0.904		0.994	0.601
PSA, cut off > 20 ^b	0.981 **	0.9 (0.4-2.0)	1.1 (0.3-3.5)	0.907 **	0.9 (0.4-2.0)	1.2 (0.5-3.4)	0.552 **	0.6 (0.2-1.5)	1.2 (0.5-3.0)
Valor de P		0.850	0.902		0.803	0.666		0.276	0.692
Gleason, alto grau > 8 ^b	0.518 **	1.5 (0.6-3.7)	1.2 (0.3-5.1)	0.602 **	1.4 (0.5-3.5)	1.0 (0.2-1.8)	0.709 **	1.6 (0.5-4.7)	0.8 (0.3-2.5)
Valor de P		0.396	0.766		0.509	0.340		0.408	0.767
Estadio avançado, T3-T4 ^b	0.619 **	1.3 (0.6-2.9)	1.3 (0.4-4.4)	0.633 **	1.0 (0.4-2.2)	1.6 (0.6-4.3)	0.092 **	0.4 (0.1-1.0)	2.2 (0.8-5.8)
Valor de P		0.539	0.685		0.988	0.376		0.052	0.115
Metástases ao diagnóstico ^b	0.831 **	1.3 (0.6-3.0)	0.8 (0.2-2.9)	0.504 **	1.4 (0.6-3.3)	1.3 (0.4-4.1)	0.826 **	0.8 (0.3-2.0)	1.2 (0.4-3.4)
Valor de P		0.543	0.791		0.432	0.617		0.566	0.698

^a análise de curvas Kaplan-Meier, usando o teste Log Rank (* valor de P); ^b regressão logística binária, com ajustamento para a idade (como variável contínua) – resultados expressos como odds ratio e intervalo de confiança 95%, (** valor de P da tendência linear). IMC, índice de massa corporal; EP/OB, excesso de peso/obeso; OB, obeso, PSA, antígeno específico da próstata.

No caso da *ARGI* Recessivo, ou seja o genótipo CC, verifica-se um risco 2,6 vezes superior para a existência de um nível de PSA superior a 20 ng/ml segundo a análise univariada, mantendo-se na análise multivariada, sendo o genótipo de risco o mesmo apresentado (CC) (Tabela 4). *ARGII* Recessivo está relacionado com o diagnóstico precoce da doença, tendo o genótipo GG e este sendo o genótipo de risco (Tabela 4).

Tabela 4. Associação entre os polimorfismos nos genes *ARGI* e *ARGII* e variáveis clinico-patológicas

	<i>ARGI</i>			<i>ARGII</i>		
	Aditivo	Dominante	Recessivo	Aditivo	Dominante	Recessivo
Idade, tempo até doença ^a	0.313 *	0.153 *	0.891 *	0.059 *	0.103 *	0.040 *
IMC, EP/OB, >25 ^b	0.551 **	1.6 (0.7-3.6)	1.4 (0.4-4.8)	0.200 **	0.5 (0.2-1.1)	0.8 (0.2-3.6)
Valor de P		0.277	0.588		0.076	0.771
IMC, OB, >30 ^b	0.910 **	0.9 (0.3-2.5)	1.2 (0.3-4.9)	0.741 **	1.0 (0.4-2.7)	1.9 (0.3-10.2)
Valor de P		0.862	0.767		0.947	0.476
PSA, cut off > 20 ^b	0.055 **	2.8 (0.8-9.7)	2.6 (1.1-5.8)	0.792 **	1.1 (0.5-2.3)	1.7 (0.4-7.5)
Valor de P		0.097	0.023		0.845	0.494
Gleason, alto grau >8 ^b	0.764 **	1.4 (0.5-3.6)	1.4 (0.4-4.8)	0.663 **	0.5 (0.2-1.4)	NC
Valor de P		0.512	0.569		0.196	
Estadio avançado, T3-T4 ^b	0.755 **	0.9 (0.4-2.0)	0.6 (0.2-2.0)	0.573 **	0.8 (0.4-1.8)	1.9 (0.4-10.2)
Valor de P		0.771	0.453		0.619	0.456
Metástases ao diagnóstico ^b	0.854 **	0.8 (0.4-1.9)	0.7 (0.2-2.6)	0.734 **	1.0 (0.5-2.4)	1.8 (0.4-7.9)
Valor de P		0.661	0.621		0.908	0.439

^a análise de curvas Kaplan-Meier, usando o teste Log Rank (* valor de P); ^b regressão logística binária, com ajustamento para a idade (como variável contínua) – resultados expressos como odds ratio e intervalo de confiança 95%, (** valor de P da tendência linear). IMC, índice de massa corporal; EP/OB, excesso de peso/obeso; OB, obeso, PSA, antígeno específico da próstata. NC, não calculado (presença de pelo menos uma célula com zero eventos).

No caso do *VKORC1* como modelo dominante, o genótipo AG/GG associa-se a risco menor (70% menor risco) para um nível de PSA superior a 20 ng/ml na análise univariada, enquanto na multivariada esse risco passa para 80% menor, ou seja, doentes com este genótipo têm menos probabilidade de estar com níveis de PSA tão elevados, sendo o genótipo de risco o AA.

Tabela 5. Associação entre os polimorfismos nos genes *VKORC1* e *GPRC6A* e variáveis clínico-patológicas

	<i>VKORC1</i>			<i>GPRC6A</i>		
	Aditivo	Dominante	Recessivo	Aditivo	Dominante	Recessivo
Idade, tempo até doença ^a	0.356 *	0.231 *	0.688 *	0.859 *	0.967 *	0.617 *
IMC, EP/OB, >25 ^b	0.535 **	0.7 (0.3-1.6)	0.8 (0.3-2.5)	0.318 **	0.5 (0.2-1.2)	1.3 (0.2-8.3)
Valor de P		0.377	0.706		0.133	0.780
IMC, OB, >30 ^b	0.822 **	1.3 (0.4-4.1)	1.2 (0.3-6.0)	0.731 **	0.7 (0.2-2.5)	0.7 (0.1-6.4)
Valor de P		0.641	0.802		0.574	0.718
PSA, cut off > 20 ^b	0.114 **	0.3 (0.1-0.9)	0.7 (0.3-1.6)	0.248 **	2.1 (0.9-5.1)	0.6 (0.1-3.6)
Valor de P		0.038	0.388		0.096	0.537
Gleason, alto grau >8 ^b	0.802 **	1.4 (0.5-3.5)	1.0 (0.3-3.5)	0.999 **	0.8 (0.3-2.4)	NC
Valor de P		0.524	0.986		0.731	
Estadio avançado, T3-T4 ^b	0.672 **	1.0 (0.4-2.3)	0.6 (0.2-1.9)	0.234 **	1.2 (0.5-3.1)	5.9 (0.5-69.0)
Valor de P		0.994	0.397		0.648	0.157
Metástases ao diagnóstico ^b	0.599 **	0.7 (0.3-1.7)	0.8 (0.3-2.4)	0.060 **	2.5 (0.9-6.4)	NC
Valor de P		0.468	0.658		0.065	

^a análise de curvas Kaplan-Meier, usando o teste Log Rank (* valor de P); ^b regressão logística binária, com ajustamento para a idade (como variável contínua) – resultados expressos como odds ratio e intervalo de confiança 95%, (** valor de P da tendência linear). IMC, índice de massa corporal; EP/OB, excesso de peso/obeso; OB, obeso, PSA, antígeno específico da próstata. NC, não calculado (presença de pelo menos uma célula com zero eventos).

Os SNPs que se revelaram significativos após a regressão logística, ajustando para a idade de diagnóstico, foram adicionalmente submetidos a análise multivariada adicionando a terapia definitiva à idade, como covariáveis (tabela 6).

Tabela 6. Resumo de análises de regressão logística uni e multivariada e interpretação de resultados

	Genótipo	Regressão Log *	Regressão Log **	Associação c/ fenótipo	Genótipo de risco
		OR (IC95)	OR (IC95)		
<i>NOS2</i> intrão 20 Dominante	GA/AA	0.4 (0.1-1.0)	0.3 (0.1-0.9)	EstadioT3-T4	GG
		0.052	0.037		
<i>ARG1</i> Recessivo	CC	2.6 (1.1-5.8)	2.6 (1.1-6.1)	PSA > 20	CC
		0.023	0.024		
<i>ARG2</i> Recessivo	GG	0.040 ^a	--	Diagnóstico precoce	GG
<i>VKORC1</i> Dominante	AG/GG	0.3 (0.1-0.9)	0.2 (0.1-0.9)	PSA > 20	AA
		0.038	0.034		

* com ajustamento para a idade de diagnóstico; ** com ajustamento para a idade e tratamento definitivo (prostatectomia radical/radioterapia versus sem tratamento definitivo). ^a Valor de P (análise Kaplan-Meier com teste Log-Rank).

Foi efetuada análise univariada de Kaplan-Meier para todos os modelos genéticos de cada polimorfismo, não se tendo verificado associação dos SNPs estudados com o desenvolvimento de hormono-resistência ($P > 0.1$), nem com a sobrevivência global ($P > 0.1$). Apenas a variante no exão 16 do polimorfismo da *NOS* exibiu associação com tempo até à morte [AA, 123.2 (107.4-139.0) meses e AG/GG, 94.7 (80.4-108.9) meses, $P = 0.085$], no entanto, após análise multivariada por regressão de Cox, perdeu significância (HR=1.6, IC95=0.9-3.1, $P = 0.139$).

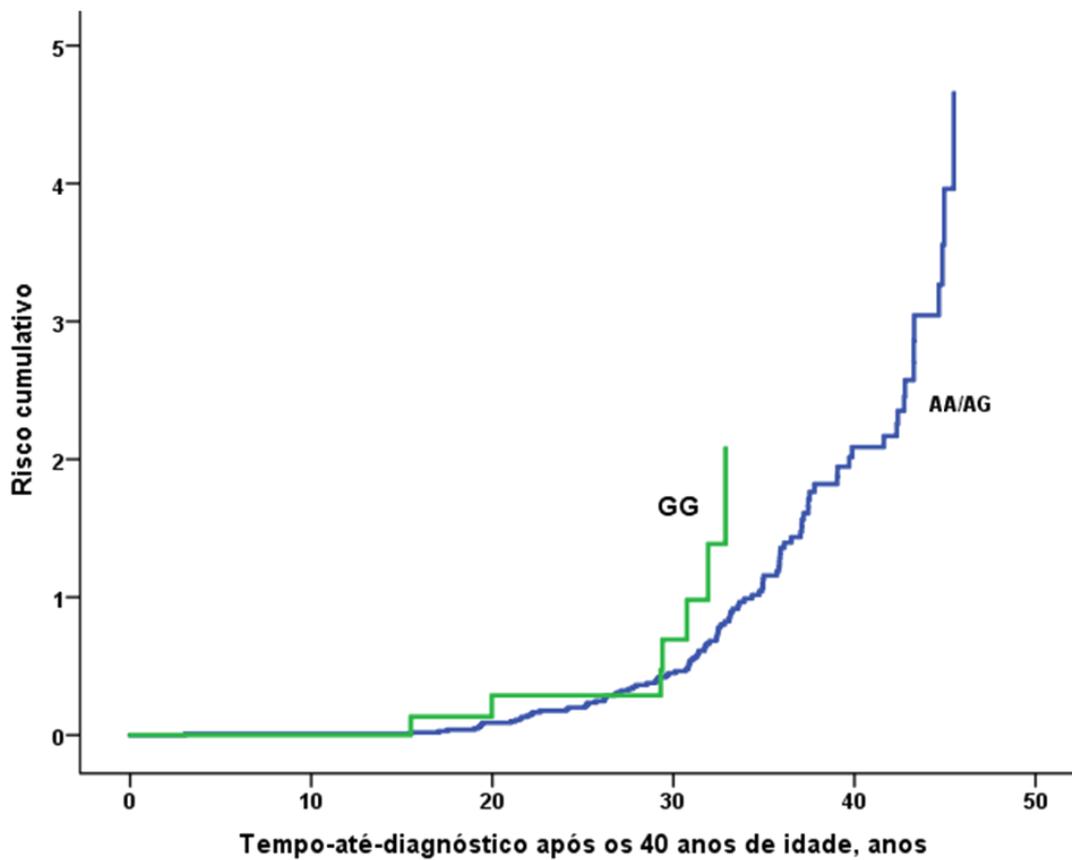


Figura 3 – Gráfico Kaplan-Meier, demonstrando que os portadores do genótipo GG do polimorfismo *ARG11* (mediana de 69.4 anos, IC95%=67.4-71.4) tiveram cancro da próstata mais precocemente que os AA/AG (mediana de 72.4 anos, IC95%=71.2-73.5) (P=0.040) .

DISCUSSÃO

Discussão

Os polimorfismos utilizados neste estudo tiveram como racional de seleção as possíveis interações e correlações com cancro da próstata e resistência à terapia hormonal.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora que desempenha um papel fundamental na patogénese da inflamação. Tem um efeito ambíguo, uma vez que em concentrações baixas pode promover o cancro enquanto em níveis altos pode agir como proteção contra o mesmo. [107]

O óxido nítrico desempenha também vários papéis importantes na BPH e seus efeitos associados. O NOS encontra-se nas fibras nervosas varicosas delgadas do feixe de músculo liso da próstata e é um mediador chave da função da próstata [108]. Um estudo revelou que os inibidores da Fosfodiesterase-5 (PDE-5) podem aumentar o risco de recorrência bioquímica após a prostatectomia radical para o tratamento do cancro da próstata, sugerindo que o aumento dos níveis de NO tem efeitos adversos nos resultados do cancro da próstata [109].

Baltaci et al. exploraram o papel desempenhado por NOS1 no cancro da próstata, BHP e neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Ambas as amostras de PIN e cancro da próstata em estadió avançado demonstraram uma elevada quantidade de NOS2 em comparação com amostras de estadió menos avançado, sendo assim um indicador de um potencial aumento na expressão de NOS2 durante a carcinogénese da próstata [110]. O óxido nítrico derivado da inflamação também desempenha um papel na progressão do tumor, por exemplo, facilitando a permeabilidade vascular, apoiando assim o rápido crescimento do tumor, dependendo da sua concentração [111]. Demonstrou-se que as células PC-3 do cancro da próstata adquirem maior sobrevivência, proliferação, migração e invasão quando recebem terapia fotodinâmica, através da regulação positiva de NOS2 e subsequente liberação de NO [112].

Como mencionado anteriormente, NOS2 é expresso em maior quantidade em tumores de próstata do que em patologias não neoplásicas [113], Baltaci et al encontraram-no elevado em amostras de cancro da próstata em comparação

com PIN ou BPH. Aaltoma et al. encontraram uma associação entre NOS2, o estadió do tumor, escala de Gleason mais avançada, aneuploidia de DNA e infiltração perineural [114]. A expressão de NOS2 no cancro da próstata pode estar interligada com o desenvolvimento de cancro da próstata independente de androgénio, pois o NO inibe a ativação do recetor de androgénio (AR) [115].

O aumento do NO intracelular em células de cancro da próstata AR-positivas leva à s-nitrosilação e inativação do AR no resíduo C601 presente no domínio de ligação ao DNA do AR, inibindo assim sua capacidade de responder ao andrógeno [116]. O NO também pode promover a migração celular em células de cancro da próstata por s-nitrosilação de $\alpha 6$ -integrina em Cys86, o que aumenta sua heterodimerização com $\alpha 1$ -integrina. Além disso, a s-nitrosilação da $\alpha 6$ -integrina resultou na diminuição da capacidade de aderir à laminina-1 [117]. Esta modificação pós-transducional resulta em uma mudança na interação de $\alpha 6$ -integrina com $\beta 4$ integrina para uma interação com $\beta 1$ integrina [117]. Isso é frequentemente visto na transição para o cancro da próstata e resulta na interrupção da adesão das células da próstata à laminina por meio de estruturas hemidesmossómicas altamente adesivas. Isso permite que as células migrem para a laminina, que é crítica no contexto de promover a metástase do cancro da próstata no microambiente ósseo rico em laminina, que é o principal local alvo para metástases distantes do cancro da próstata [118].

Considerando os estudos apresentados acima e os resultados obtidos neste estudo, em que o genótipo GG do polimorfismo da *NOS2* Intron 20 foi de risco para estádios avançados, poderá levantar a hipótese de que existe uma correlação entre NOS2 e estádios avançados do cancro da próstata, que também desempenha um papel importante na metástase desse cancro. Esta relação varia dependendo da concentração de NO encontrada em cada neoplasia, uma vez que este pode ter um efeito pré-cancerígeno ou no sentido de proteger as células e também do polimorfismo que foi estudado, uma vez que tal como observado nos resultados, o alelo dominante parece conferir um risco menor de cancro da próstata do que o alelo recessivo.

Por outro lado, o aumento da expressão e atividade de *ARG* tem sido relatado em vários tumores, como cabeça, pescoço, rim, mama, hepatocelular e próstata [119]. Na doença prostática, o metabolismo da arginina e atividade de *ARG* surgem como vias de interesse elevado, uma vez que a expressão de *ARG* e a síntese de poliaminas foram encontradas num número elevado no cancro da próstata, estando associadas à diferenciação tumoral [120]. Poucos estudos observaram atividade relevante de *ARG* no cancro da próstata e em outros cancros, sendo a exceção o tecido [121]. A expressão de *ARGI* e *ARGII* em células do cancro da próstata são mediadas por androgénios, ou seja, privação de androgénio ou terapia de privação androgénica (ADT) reduz a expressão de *ARG2 in vitro* e nos tumores em estadio inicial em doentes com cancro da próstata. Quando existe uma inibição da sua expressão proteica, causa um decréscimo na proliferação celular e no potencial de imunossupressão [122]. Tal como referido, as células do cancro da próstata expressam tanto *ARGI* como *ARGII*, apesar de *ARGII* ser preferencialmente expresso pelas células hormono sensíveis do cancro da próstata e por tecido da próstata não-maligno. Assim como *ARGII*, a inibição de *ARGI* leva a decréscimo da proliferação de células tumorais, reduz o metabolismo da arginina e o seu potencial imunossupressivo. Mesmo assim, alguns estudos apontam que o *ARGII* seja mais influente na atividade de arginase em células de cancro da próstata do que o *ARGI* [123].

Considerando os resultados deste estudo, que mostram que o genótipo CC do polimorfismo da *ARGI* esteve associado a PSA superior a 20 ng/ml e o genótipo GG do polimorfismo da *ARGII* associado a diagnóstico precoce do cancro da próstata, revelando que o potencial envolvimento da arginase no cancro da próstata, com possível impacto em várias fases do seu desenvolvimento e diagnóstico. É possível observar que tanto no polimorfismo da *ARGI* como no polimorfismo da *ARGII*, o alelo recessivo está diretamente ligado a altos níveis de PSA e diagnóstico do cancro da próstata de forma mais precoce. É possível pensar que a *ARGII* possa ser considerado um marcador para a doença do cancro da próstata uma vez que a expressão da enzima é maior em tumores de estadio mais baixo, perdendo a sua expressão à medida que o tumor se torna menos diferenciado [122].

Estudos anteriores demonstraram que a vitamina K e o ciclo da vitamina K estão envolvidos no crescimento celular, inflamação, apoptose e metabolismo de Ca^{2+} e estão associados a doenças que incluem osteoporose, cancro, diabetes e calcificação vascular [124].

Fortes evidências indicam que o uso de varfarina a longo prazo está associado a uma diminuição do risco de diagnóstico de cancro da próstata. A expressão de VKORC em tecido benigno da próstata sugere que tem potencial para mediar os efeitos quimioprotetores da varfarina. Em contraste, a quase ausência de expressão de VKORC em PIN e cancros primários, independentemente do grau, sugere que é improvável que a varfarina seja útil para controlar o crescimento de cancros uma vez que se desenvolvam, pelo menos usando um mecanismo mediado pela VKORC. Tagalakis et al. demonstraram que, ao contrário da associação da varfarina com a redução do risco de diagnóstico de cancro da próstata, homens tratados com varfarina após o diagnóstico de cancro da próstata têm pior sobrevida específica e global de cancro da próstata [125]. Os dados de expressão de VKORC se ajustam a um modelo, em que VKORC medeia os efeitos quimioprotetores da varfarina, mas não influencia os efeitos da varfarina no crescimento de cancros estabelecidos. Tew BY et al. demonstraram que o alelo C do SNP rs2359612 no gene *VKORC* é encontrado em uma taxa mais alta em séries prospetivas de doentes com cancro da próstata do que seria esperado na população geral [71], apesar do resultado deste trabalho mostrar que o genótipo AA do polimorfismo da *VKORC1*, que neste caso é recessivo, é de risco para PSA superior a 20 ng/mL Também existe uma relação entre menadionas e o risco de cancro da próstata, ou seja, uma ingestão de menadionas está ligado a um risco mais baixo de cancro da próstata [62]

É desafiador imaginar a varfarina como uma estratégia adequada para prevenir o cancro da próstata, pois, na população idosa que desenvolve cancro da próstata, os riscos de hemorragia associados à varfarina provavelmente superam qualquer benefício preventivo. No entanto, entender a conexão entre o uso de varfarina e o risco de cancro da próstata pode permitir separar os efeitos sobre o cancro dos efeitos sobre a coagulação.

Em suma, é possível verificar que os polimorfismos do *NOS2* intrão 20 com genótipo recessivo, *ARG1* com genótipo recessivo, *ARGII* com genótipo recessivo e *VKORC1* com genótipo recessivo parecem ter um papel importante em neoplasias avançadas ou um diagnóstico mais precoce das mesmas. Todos os resultados obtidos durante este estudo e que possam ser considerados relevantes corroboram o que já está descrito na literatura, mas também abrem novas questões sobre os possíveis benefícios para o diagnóstico e terapia do cancro da próstata a partir de alguns dos polimorfismos estudados neste trabalho. Apesar destes resultados apoiarem estudos anteriores, a área da oncologia, em especial a que está ligada ao cancro da próstata, é uma área que ainda necessita de maiores avanços a nível tanto tecnológico como ao nível da compreensão, uma vez que mesmo havendo imensos casos por ano, ainda é algo que mal se compreende e como todas as outras neoplasias, continua sem cura.

Conclusão

O Genótipo GG do polimorfismo da NOS2 Intrão 20 é de risco para paciente avançado (T3-T4).

O genótipo CC do polimorfismo da ARG I e o genótipo AA do polimorfismo da VKORC1 são de risco para PSA superior a 20 ng/mL.

Os portadores do genótipo GG do polimorfismo *ARGII* têm risco para diagnóstico precoce de cancro da próstata.

Permanecem por esclarecer as implicações funcionais dos polimorfismos estudados e que demonstraram associação com a doença. Estudos futuros deverão estabelecer a relação genótipo-fenótipo para os polimorfismos que se revelaram mais relevantes no cancro da próstata.

REFERÊNCIAS

Referências

1. Croce CM. "Oncogenes and cancer". *The New England Journal of Medicine*. 2008 Jan 31; 358(5):502-11.
2. Bailar JC, Gornik HL. "Cancer undefeated". *The New England Journal of Medicine*. 1997 May 29; 336(22):1569-74.
3. Rawla P. "Epidemiology of prostate cancer". *World Journal of Oncology*. 2019;10(2):63–89
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. "Global cancer statistics, 2012". *A Cancer Journal for Clinicians*. 2015; 65:87–108
5. Nunes P., Pimentel F., Pina F., Rolo F. "Registo Nacional de Cancro da Próstata em Portugal". *Acta Urológica*. 2010; 3: 39-45.
6. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. "Family history and the risk of prostate cancer". *The Prostate*. 1990; 17(4): 337–47
7. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland". *The New England Journal of Medicine*. 2000 Jul 13; 343(2): 78–85.
8. Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, et al. "The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews". *The New England Journal of Medicine*. 1997 May 15; 336 (20): 1401–8.
9. Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y, et al. "Punctuated evolution of prostate cancer genomes". *Cell*. 2013 Apr 25; 153 (3): 666–77.
10. Steive H. "Männliche Genitalorgane". *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Vol. VII Part 2. Berlin: Springer. 1930; 1–399
11. Costello, Leslie C.; Franklin, Renty B. "The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: Connecting the dots". *Molecular Cancer*. 2006 May 15; 5: 17.
12. Lavin MF, Delia D, Chessa L. "ATM and the DNA damage response. Workshop on ataxia-telangiectasia and related syndromes". *EMBO Reports*. 2006 Feb; 7(2):154-60.

13. Sharma, Ankur; Yeow, Wen-Shuz; Ertel, Adam; Coleman, Ilsa; Clegg, Nigel; Thangavel, Chellappagounder; Morrissey, Colm; Zhang, Xiaotun; Comstock, Clay E. S.; Witkiewicz, Agnieszka K.; Gomella, Leonard. "The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression". *The Journal of Clinical Investigation*. 2010 Dec; 120(12): 4478–4492
14. Leav I, Plescia J, Goel HL, Li J, Jiang Z, Cohen RJ, et al. "Cytoprotective mitochondrial chaperone TRAP-1 as a novel molecular target in localized and metastatic prostate cancer". *The American Journal of Pathology*. 2010 Jan; 176 (1): 393–401.
15. Zha J, Huang YF. "TGF-beta/Smad in prostate cancer: an update". *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology (in Chinese)*. 2009 Sep; 15 (9): 840–3.
16. Watanabe S, Miyata Y, Kanda S, Iwata T, Hayashi T, Kanetake H, Sakai H. "Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human prostate cancer specimens with and without neo-adjuvant hormonal therapy". *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2010 May; 136 (5): 787–93.
17. Senapati S, Rachagani S, Chaudhary K, Johansson SL, Singh RK, Batra SK. "Overexpression of macrophage inhibitory cytokine-1 induces metastasis of human prostate cancer cells through the FAK-RhoA signaling pathway". *Oncogene*. 2010 Mar 4; 29(9): 1293–302
18. Yao V, Berkman CE, Choi JK, O'Keefe DS, Bacich DJ. "Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA), increases cell folate uptake and proliferation and suggests a novel role for PSMA in the uptake of the non-polyglutamated folate, folic acid". *The Prostate*. 2010 Feb 15; 70 (3): 305–16.
19. McNeal JE. "Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH". *Progress in Clinical and Biological Research*. 1984; 145: 27–53
20. Oh, William K.; Hurwitz, Mark; D'Amico, Anthony V.; Richie, Jerome P.; Kantoff, Philip W. "Biology of Prostate Cancer". *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th Edition. 2003

21. Reissigl, A.; Pointner, J.; Strasser, H.; Ennemoser, O.; Klocker, H.; Bartsch, G. "Frequency and clinical significance of transition zone cancer in prostate cancer screening". *The Prostate*. 1997 Feb 1; 30 (2): 130–135.
22. Kasivisvanathan V, Rannikko AS, Borghi M, Panebianco V, Mynderse LA, Vaarala MH, et al. "MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis". *The New England Journal of Medicine*. 2018 May; 378 (19): 1767–1777.
23. Natarajan S, Marks LS, Margolis DJ, Huang J, Macairan ML, Lieu P, Fenster A. "Clinical application of a 3D ultrasound-guided prostate biopsy system". *Urologic Oncology*. 2011 May; 29 (3): 334–42
24. Wang X, Bao J, Ping X, Hu C, Hou J, Dong F, Guo L. "The diagnostic value of PI-RADS V1 and V2 using multiparametric MRI in transition zone prostate clinical cancer". *Oncology Letters*. 2018 Sep; 16 (3): 3201–3206.
25. Kauder DH, Lange PH, Gleason DF. "Endometrial carcinoma of prostatic utricle". *Urology* 1977; 10(3): 272-275,
26. Makarov DV, Desai RA, Yu JB, Sharma R, Abraham N, Albertsen PC, et al. "The population level prevalence and correlates of appropriate and inappropriate imaging to stage incident prostate cancer in the medicare population". *The Journal of Urology*. 2012 Jan; 187 (1): 97–102.
27. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. and Ward, E. "Cancer Statistics, 2010". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2010 Sep; 60: 277-300.
28. Tannock IF, De Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. "Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer". *The New England Journal of Medicine*. 2004; 351(15):1502–12.
29. Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, et al. "Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial". *The Lancet*. 376 (9747): 1147–54
30. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer". *The New England Journal of Medicine*. 2010 Jul; 363 (5): 411–22

31. Taplin ME, Bublely GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, et al. "Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer". *The New England Journal of Medicine*. 1995; 332:1393–8.
32. Sun S, Sprenger C.C.T, Vessella R.L, Haugk K, Soriano K, Mostaghel E.A, Page S.T, Coleman I.M, Nguyen H.M, Sun H, et al. "Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant". *The Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120: 2715-2730
33. Nupponen N, Visakorpi T. "Molecular biology of progression of prostate cancer". *European Urology*. 1999; 35: 351–354.
34. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R et al. "Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy". *Nature Medicine*. 2004; 10: 33–39.
35. Tamura K, Furihata M, Tsunoda T, Ashida S, Takata R, Obara W et al. "Molecular features of hormone-refractory prostate cancer cells by genome-wide gene expression profiles". *Cancer Research*. 2007; 67: 5117–5125.
36. Gregory CW, Johnson Jr RT, Mohler JL, French FS, Wilson EM. "Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen". *Cancer Research*. 2001; 61: 2892–2898.
37. Brooke GN, Bevan CL. "The role of androgen receptor mutations in prostate cancer progression". *Current Genomics*. 2009; 10: 18–25.
38. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E et al. "Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer". *Cancer Research*. 2009; 69: 16–22.
39. Mostaghel EA, Page ST, Lin DW, Fazli L, Coleman IM, True LD et al. "Intraprostatic androgens and androgen-regulated gene expression persist after testosterone suppression: therapeutic implications for castration-resistant prostate cancer". *Cancer Research*. 2007; 67: 5033–5041.

40. Reid AH, Attard G, Barrie E, de Bono JS. "CYP17 inhibition as a hormonal strategy for prostate cancer". *Nature Clinical Practice Urology*. 2008; 5: 610–620.
41. Zhou HJ, Yan J, Luo W, Ayala G, Lin SH, Erdem H et al. "SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival". *Cancer Research*. 2005; 65: 7976–7983.
42. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS et al. "Integrative genomic profiling of human prostate cancer". *Cancer Cell*. 2010; 18: 11–22.
43. Lakshmikanthan V, Zou L, Kim JI, Michal A, Nie Z, Messias NC et al. "Identification of betaArrestin2 as a corepressor of androgen receptor signaling in prostate cancer". *PNAS*. 2009; 106: 9379–9384.
44. Attar RM, Takimoto CH, Gottardis MM. "Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes". *Clinical Cancer Research*. 2009; 15: 3251–3255.
45. Zhu ML, Kyprianou N. "Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells". *Endocrine-Related Cancer*. 2008; 15: 841–849.
46. Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. "A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase". *Nature Medicine*. 1999; 5: 280–285.
47. Wang G, Wang J, Sadar MD. "Crosstalk between the androgen receptor and beta-catenin in castrate-resistant prostate cancer". *Cancer Research*. 2008; 68: 9918–9927.
48. Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. "Overexpression of Bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo". *Cancer Research*. 1995; 55: 4438–4445.
49. Yang CC, Lin HP, Chen CS, Yang YT, Tseng PH, Rangnekar VM et al. "Bcl-xL mediates a survival mechanism independent of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer cells". *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 25872–25878.

50. Dasari, S., Ali, S.M., Zheng, G., Chen, A., Dontaraju, V.S., Bosland, M.C., et al. "Vitamin K and its analogs: potential avenues for prostate cancer management". *Oncotarget*. 2017; 8, 57782-57799.
51. Schwalfenberg, G.K. "Vitamins K1 and K2: the emerging group of vitamins required for human health". *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2017; 2017: 6254836.
52. Booth, S.L. "Roles for vitamin K beyond coagulation". *Annual Review of Nutrition*. 2009; 29: 89-110.
53. Booth, S.L., Suttie, J.W. "Dietary intake and adequacy of vitamin K". *The Journal of Nutrition*. 1998; 128: 785-788.
54. Krueger, T., Westenfeld, R., Schurgers, L., Brandenburg, V. "Coagulation meets calcification: the vitamin K system". *The International Journal of Artificial Organs*. 2009; 32: 67-74.
55. Lamson, D.W., Plaza, S.M. "The anticancer effects of vitamin K". *Alternative Medicine Review*. 2003; 8: 303-318.
56. Schurgers, L.J., Vermeer, C. "Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects". *Biochimica et Biophysica Acta*. 2022; 1570(1): 27-32.
57. Shearer, M.J., Bach, A., Kohlmeier, M. "Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health". *The Journal of Nutrition*. 1996; 126: 1181S-1186S.
58. Nelson, W.G., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B. "Prostate cancer". *The New England Journal of Medicine*. 2003; 349: 366-381
59. Hayes, R.B., Liff, J.M., Pottner, L.M., Greenberg, R.S., Schoenberg, J.B., Schwartz, A. G., et al. "Prostate cancer risk in U.S. blacks and whites with a family history of cancer". *International Journal of Cancer*. 1995; 60: 361-364.
60. Burton, J.L., Oakley, N., Anderson, J.B. "Recent advances in the histopathology and molecular biology of prostate cancer." *BJU International*. 2000; 85: 87-94.
61. Apakama, I., Robinson, M.C., Walter, N.M., Charlton, R.G., Royds, J.A., Fuller, C.E., et al. "Bcl-2 overexpression combined with p53 protein

- accumulation correlates with hormone-refractory prostate cancer". *British Journal of Cancer*. 1996; 74: 1258-1262.
62. Nimptsch K, Rohrmann S, Linseisen J. "Dietary intake of vitamin K and risk of prostate cancer in the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg)". *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008 Apr; 87(4): 985-92.
63. Tareen, B., Summers, J.L., Jamison, J.M., Neal, D.R., McGuire, K., Gerson, L., et al. "A 12 week, open label, phase I/IIa study using apatone for the treatment of prostate cancer patients who have failed standard therapy". *International Journal of Medical Sciences*. 2008; 5: 62-67.
64. Shetty, A., Dasari, S., Banerjee, S., Gheewala, T., Zheng, G., Chen, A., et al. "Hepatoma-derived growth factor: a survival-related protein in prostate oncogenesis and a potential target for vitamin K2". *Urologic Oncology*. 2016; 34: 483.e1-483.e8.
65. Samykutty, A., Shetty, A.V., Dakshinamoorthy, G., Kalyanasundaram, R., Zheng, G., Chen, A., et al. "Vitamin k2, a naturally occurring menaquinone, exerts therapeutic effects on both hormone-dependent and hormone independent prostate cancer cells". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013: 287358.
66. Dasari, S., Samy, A., Kajdacsy-Balla, A., Bosland, M.C., Munirathinam, G. "Vitamin K2, a menaquinone present in dairy products targets castration-resistant prostate cancer cell-line by activating apoptosis signaling". *Food and Chemical Toxicology*. 2018; 115: 218-227.
67. Jiang, Y., Yang, J., Yang, C., Meng, F., Zhou, Y., Yu, B., et al. "Vitamin K4 induces tumor cytotoxicity in human prostate carcinoma PC-3 cells via the mitochondria-related apoptotic pathway". *Pharmazie*. 2013; 68: 442-448.
68. Gilloteaux, J., Jamison, J.M., Neal, D.R., Summers, J.L. "Cell death by autophagy in TRAMP prostate carcinoma cells as a result of treatment by ascorbate: menadione combination". *Ultrastructural Pathology*. 2005; 29: 221-235.
69. Gilloteaux, J., Jamison, J.M., Neal, D., Summers, J.L. "Synergistic antitumor cytotoxic actions of ascorbate and menadione on human

- prostate (DU145) cancer cells in vitro: nucleus and other injuries preceding cell death by autoschizis". *Ultrastructural Pathology*. 2014; 38: 116-140.
70. Gilloteaux, J., Jamison, J.M., Summers, J.L. "Pro-oxidant treatment of human prostate carcinoma (DU145) induces autoschizis cell death: autophagosomes build up out of injured endomembranes and mitochondria". *Ultrastructural Pathology*. 2014; 38: 315-328.
71. Tew BY, Pal SK, He M, Tong T, Wu H, Hsu J, Liu X, Neuhausen SL, Jones JO. "Vitamin K epoxide reductase expression and prostate cancer risk". *Urologic Oncology*. 2017 Mar; 35(3): 112.e13-112.e18.
72. Husson A, Brasse Lagnel C, Fairand A, et al. "Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline–NO cycle". *European Journal of Biochemistry* 2003; 270: 1887–1899.
73. Fultang L, Vardon A, De Santo C, et al. "Molecular basis and current strategies of therapeutic arginine depletion for cancer". *International Journal of Cancer*. 2016; 139: 501–509.
74. Szlosarek PW, Klabatsa A, Pallaska A, et al. "In vivo loss of expression of argininosuccinate synthetase in malignant pleural mesothelioma is a biomarker for susceptibility to arginine depletion". *Clinical Cancer Research*. 2006; 12: 7126–7131.
75. Delage B, Fennell DA, Nicholson L, et al. "Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer". *International Journal of Cancer*. 2010; 126:2762–2772.
76. Feun L, You M, Wu CJ, et al. "Arginine deprivation as a targeted therapy for cancer". *Current Pharmaceutical Design*. 2008; 14:1049–1057.
77. Dillon BJ, Prieto VG, Curley SA, et al. "Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers". *Cancer*. 2004; 100:826–833.
78. Lan J, Tai H-C, Lee S-W, et al. "Deficiency in expression and epigenetic DNA Methylation of ASS1". *Tumor Biology* 2013; 35:161–169.
79. Cheon DJ, Walts AE, Beach JA, et al. "Differential expression of argininosuccinate synthetase in serous and non-serous ovarian carcinomas". *The Journal of Pathology Clinical Research*. 2015; 1:41–53.

80. Kobayashi E, Masuda M, Nakayama R, et al. "Reduced argininosuccinate synthetase is a predictive biomarker for the development of pulmonary metastasis in patients with osteosarcoma". *Molecular Cancer Therapeutics*. 2010; 9:535–544.
81. Huang HL, Hsu HP, Shieh SC, et al. "Attenuation of argininosuccinate lyase inhibits cancer growth via cyclin A2 and nitric oxide". *Molecular Cancer Therapeutics*. 2013; 12:2505–2516.
82. Syed N, Langer J, Janczar K, et al. "Epigenetic status of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase modulates autophagy and cell death in glioblastoma". *Cell Death Disease*. 2013; 4: e458.
83. Scott L, Lamb J, Smith S, et al. "Single amino acid (arginine) deprivation: Rapid and selective death of cultured transformed and malignant cells". *British Journal of Cancer*. 2000; 83:800–810.
84. Changou CA, Chen Y-R, Xing L, et al. "Arginine starvation associated atypical cellular death involves mitochondrial dysfunction, nuclear DNA leakage, and chromatin autophagy". *PNAS*. 2014; 111:14147–14152.
85. Jewell JL, Guan K-L "Nutrient signaling to mTOR and cell growth". *Trends Biochemical Sciences*. 2013; 38:233–242.
86. Vynnytska-Myronovska BO, Kurlishchuk Y, Chen O, et al. "Arginine starvation in colorectal carcinoma cells: Sensing, impact on translation control and cell cycle distribution". *Experimental Cell Research*. 2016; 341:67–74.
87. Bronte V, Zanovello P. "Regulation of immune responses by Larginine metabolism". *Nature Review Immunology*. 2005; 5:641–654.
88. Becker JC, Andersen MH, Schrama D, et al. "Immune suppressive properties of the tumor microenvironment". *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2013; 62:1137–1148.
89. Cao Y, Feng Y, Zhang Y, et al. "L-Arginine supplementation inhibits the growth of breast cancer by enhancing innate and adaptive immune responses mediated by suppression of MDSCs in vivo". *BMC Cancer*. 2016; 16:343.

90. Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. "Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone". PNAS. 1976 May; 73(5):1447-51.
91. Nakase T, Takaoka K, Hirakawa K, Hirota S, Takemura T, Onoue H, Takebayashi K, Kitamura Y, Nomura S. "Alterations in the expression of osteonectin, osteopontin and osteocalcin mRNAs during the development of skeletal tissues in vivo". Bone and Mineral. 1994; 26: 109–122.
92. Gundberg CM, Lian JB, Gallop PM, Steinberg JJ. "Urinary gamma-carboxyglutamic acid and serum osteocalcin as bone markers: studies in osteoporosis and Paget's disease". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1983 Dec; 57(6):1221-1225
93. R A Kesterson, L Stanley, F DeMayo, M Finegold, J W Pike. "The human osteocalcin promoter directs bone-specific vitamin D-regulatable gene expression in transgenic mice". Molecular Endocrinology. 1993; 7(3): 462–467
94. Roach HI. "Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption". Cell Biology International. 1994 Jun; 18(6):617-628.
95. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. "Increased bone formation in osteocalcin deficient mice". Nature. 1996 Aug 1;38 (6590):448-52.
96. Schinke, T., and Karsenty, G. "Characterization of Osf1, an Osteoblast-specific Transcription Factor Binding to a Critical cis-acting Element in the MouseOsteocalcin Promoters". Journal of Biological Chemistry. 1999; 274:30182–30189
97. Ogawa, E., Maruyama, M., Kagoshima, H., Inuzuka, M., Lu, J., Satake, M., Shigesada, K., and Ito, Y. "PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene". PNAS. 1993; 90:6859–6863
98. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R.,

- Kitamura, Y., Yoshiki, S., and Kishimoto, T. "Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts". *Cell*. 1997; 89:755–764
99. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., and Karsenty, G. "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation". *Cell*. 1997; 89: 747–754
100. Zhang, R., Ducy, P., and Karsenty, G. "1,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits Osteocalcin Expression in Mouse through an Indirect Mechanism". *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 110–116
101. Sims, N. A., White, C. P., Sunn, K. L., Thomas, G. P., Drummond, M. L., Morrison, N. A., Eisman, J. A., and Gardiner, E. M. "Human and murine osteocalcin gene expression: conserved tissue restricted expression and divergent responses to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in vivo". *Molecular Endocrinology*. 1997; 11: 1695–1708
102. Morrison, N. A., Shine, J., Fragonas, J. C., Verkest, V., McMenemy, M. L., and Eisman, J. A. "1, 25-dihydroxyvitamin D-responsive element and glucocorticoid repression in the osteocalcin gene". *Science*. 1989; 246: 1158–1161
103. Goldberg D, Polly P, Eisman JA, Morrison NA. "Identification of an osteocalcin gene promoter sequence that binds AP1". *Journal of Cellular Biochemistry*. 1996 Mar; 60(4):447-457
104. Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. "Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation". *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*. 1998; 30-31:62-72.
105. Koeneman KS, Yeung F, Chung LW. "Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment". *Prostate*. 1999 Jun 1; 39(4):246-61
106. Nasiri, H., Forouzandeh, M., Rasaei, M. J., & Rahbarizadeh, F. "Modified salting-out method: High-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent". *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2005; 19(6): 229–232.

107. Soni Y, Softness K, Arora H, Ramasamy R. "The Yin Yang Role of Nitric Oxide in Prostate Cancer". *American Journal of Men's Health*. 2020; 14(1):1557988320903191.
108. Uckert S, Waldkirch ES, Merseburger AS, Kuczyk MA, Oelke M, Hedlund P. "Phosphodiesterase type 5 (PDE5) is co-localized with key proteins of the nitric oxide/cyclic GMP signaling in the human prostate". *World Journal of Urology*. 2013; 31: 609-14.
109. Michl U, Molfenter F, Graefen M, Tennstedt P, Ahyai S, Beyer B, Budaus L, Haese A, Heinzer H, Oh SJ, Salomon G, Schlomm T, Steuber T, Thederan I, Huland H, Tilki D. "Use of phosphodiesterase type 5 inhibitors may adversely impact biochemical recurrence after radical prostatectomy". *Journal of Urology*. 2015; 193: 479-83.
110. Baltaci S, Orhan D, Gogus C, Turkolmez K, Tulunay O, Gogus O. "Inducible nitric oxide synthase expression in benign prostatic hyperplasia, low- and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma". *BJU International*. 2001; 88: 100-3.
111. Maeda H, Akaike T. "Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry*". 1998; 63: 854-65.
112. Fahey JM, Girotti AW. "Accelerated migration and invasion of prostate cancer cells after a photodynamic therapy-like challenge: Role of nitric oxide". *Nitric Oxide*. 2015; 49: 47-55.
113. Klotz T, Bloch W, Volberg C, Engelmann U, Addicks K. "Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma". *Cancer*. 1998; 82: 1897-903.
114. Aaltoma SH, Lipponen PK, Kosma VM. "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer". *Anticancer Research*. 2001; 21: 3101-6.
115. Cronauer MV, Ince Y, Engers R, Rinnab L, Weidemann W, Suschek CV, Burchardt M, Kleinert H, Wiedenmann J, Sies H, Ackermann R, Kroncke KD. "Nitric oxide-mediated inhibition of androgen receptor activity: possible implications for prostate cancer progression". *Oncogene*. 2007; 26: 1875-84.

116. Qin Y, Dey A, Purayil HT, Daaka Y. "Maintenance of androgen receptor inactivation by S-nitrosylation". *Cancer Research*. 2013; 73: 6690-9.
117. Isaac J, Tarapore P, Zhang X, Lam YW, Ho SM. "Site-specific S-nitrosylation of integrin alpha6 increases the extent of prostate cancer cell migration by enhancing integrin beta1 association and weakening adherence to laminin-1". *Biochemistry*. 2012; 51: 9689-97.
118. Sroka IC, Anderson TA, McDaniel KM, Nagle RB, Gretzer MB, Cress AE. "The laminin binding integrin alpha6beta1 in prostate cancer perineural invasion". *Journal of Cellular Physiology*. 2010; 224: 283-8.
119. Mao H, Gao W, Lu G, Fang F, Teng L. "Clinicopathological and prognostic implications of arginase expression in hepatocellular carcinoma". *Clinical laboratory*. 2013; 59(1-2):37-43
120. Bronte V, Kasic T, Gri G, Gallana K, Borsellino G, Marigo I, Battistini L, Iafrate M, Prayer-Galetti T, Pagano F et al. "Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers". *The Journal of Experimental Medicine*. 2005; 201(8):1257-1268.
121. Elgun S, Keskinoglu A, Yilmaz E, Baltaci S, Beduk Y. "Evaluation of serum arginase activity in benign prostatic hypertrophy and prostatic cancer". *International Urology and Nephrology*. 1999; 31(1):95-99.
122. Mumenthaler SM, Yu H, Tze S, Cederbaum SD, Pegg AE, Seligson DB, Grody WW. "Expression of arginase II in prostate cancer". *International Journal of Oncology*. 2008; 32(2):357-365.
123. Gannon PO, Godin-Ethier J, Hassler M, Delvoye N, Aversa M, Poisson AO, Peant B, Alam Fahmy M, Saad F, Lapointe R et al. "Androgen-regulated expression of arginase 1, arginase 2 and interleukin-8 in human prostate cancer". *PLOS One*. 2010; 5(8):e12107.
124. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. "Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein". *Nature*. 1997; 386:78–81.
125. Tagalakis, V., Tamim, H., Blotstein, M. et al. "Risk of prostate cancer death in long-term users of warfarin: a population-based case-control study". *Cancer Causes Control*. 2013; 24: 1079–1085.