



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

SÉRGIO LOPES DA SILVA

Influência das células de Schwann na progressão do câncer de próstata

MACEIÓ

2022

SÉRGIO LOPES DA SILVA

Influência das células de Schwann na progressão do câncer de próstata

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas-UFAL, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof. Dr. Carlos Alberto de Carvalho Fraga

MACEIÓ

2022

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4/661

- S586i Silva, Sergio Lopes da.
Influência das células de Schwann na progressão do câncer de próstata / Sergio Lopes da Silva. – 2022
86 f., [36 f.] : il. color.
- Orientador: Carlos Alberto de Carvalho Fraga
Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Medicina, Maceió, 2022.
- Inclui produto educacional.
Bibliografia: f. 86-109.
1. Carcinogênese. 2. Câncer de próstata. 3. Metástase. 4. Células de Schwann.
I. Título.

CDU: 616-006.6

GRADECIMENTO

Aos meus pais (Anália e Expedito) por todo incentivo, apoio, dedicação e por acompanhar de perto mais uma etapa da minha formação acadêmica;

Ao meu Padrinho (Valmir) por sempre incentivar a buscar o melhor, me encorajando, apoiando e incentivando em todas as etapas do mestrado;

Ao meu orientador Professor Dr. Carlos Fraga, pela oportunidade em realizar o mestrado sobre sua orientação, a quem tenho profunda admiração pelo profissional e ser humano que é, e a quem agradeço por sua amizade e ensinamentos;

A Genilda, Helem e Rodger, por toda paciência em ensinar a manusear os programas de bioinformática e tirar as dúvidas durante a utilização;

Aos alunos de iniciação científica do laboratório que contribuíram direta e indiretamente com a elaboração desta dissertação de mestrado.

**“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”
(Cora Coralina)**

RESUMO

O fenômeno da carcinogênese é um processo complexo que ocorre por meio de múltiplos eventos genéticos que alteram as funções normais dos oncogenes e genes supressores de tumor. Estudos mostraram que as células de Schwann participam do microambiente tumoral, produzindo vários fatores que beneficiam as células cancerígenas. Durante esse processo, as células de Schwann são desdiferenciadas e auxiliam o processo de proliferação das células cancerígenas. Essas células então migram para a região próxima ao tecido tumoral e auxiliam o desenvolvimento da célula neoplásica. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência das células de Schwann sobre o câncer de próstata. Realizamos uma análise de bioinformática e observamos que a "interação neuroativo ligante-receptor" foi regulada positivamente no câncer de próstata. A "via de sinalização do p53" apresenta-se ativa, uma vez que o CCNE1, CDKN2A e PERP apresentam-se aumentados. miRNAs específicos inativam a via de "orientação dos axônios", visando os genes ROBO2 e SLIT2. Ambos os genes também estão associados à inibição da migração das células de Schwann. Além disso, o GFAP e o GAP43 são superexpressos, levando à desdiferenciação das células de Schwann. Tanto Schwann quanto as células neoplásicas são estimuladas via cascata de fosforilação para proliferar e migrar. Os resultados demonstram que a desdiferenciação e proliferação de células de Schwann são induzidas pelo tecido neoplásico; conseqüentemente, as células de Schwann produzem diferentes fatores que participam de vários processos de progressão tumoral. Esses processos também podem estar envolvidos na invasão do tumor no tecido perineural na neoplasia prostática.

Palavras-chave: Carcinogênese, Câncer de próstata; Metástase; Células de Schwann

ABSTRACT

The phenomenon of carcinogenesis is a complex process that occurs through multiple genetic events that alter the normal functions of oncogenes and tumor suppressor genes. Studies have shown that Schwann cells participate in the tumor microenvironment, producing several factors that benefit cancer cells. During this process, Schwann cells are dedifferentiated and help the cancer cell. During this process, Schwann cells are dedifferentiated and help the cancer cell to proliferate. These cells then migrate to the region close to the tumor tissue and aid the development of the neoplastic cell. In this context, the aim of the present study was to evaluate the influence of Schwann cells on prostate cancer. We performed a bioinformatics view and observed that the "neuroactive ligand-receptor interaction" was up-regulated in prostate cancer. The "p53 signaling pathway" is active, since CCNE1, CDKN2A and PERP are increased. Specific miRNAs inactivate the "axon guidance" pathway, targeting the ROBO2 and SLIT2 genes. Both genes are also associated with inhibition of Schwann cell migration. Furthermore, GFAP and GAP43 are overexpressed, leading to dedifferentiation of Schwann cells. Both Schwann and neoplastic cells are stimulated via a phosphorylation cascade to proliferate and migrate. The results demonstrate that dedifferentiation and proliferation of Schwann cells are induced by neoplastic tissue; consequently, Schwann cells produce different factors that will participate in various tumor progression processes. These processes may also be involved in tumor invasion of the perineural tissue in prostate cancer.

Keywords: Carcinogenesis, Prostate cancer; Metastasis; Schwann cells

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Câncer de Próstata	10
1.1.1. Epidemiologia	10
1.1.2. Fatores de risco	11
1.1.3. Diagnóstico	11
1.1.3.1. Diagnóstico histológico	13
1.1.4. Estadiamento clínico	15
1.1.5. Invasão perineural, Metástase e células de schwann	16
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. METODOLOGIA	21
4. PRODUTOS	22
4.1. Produto 1	22
4.2. Produto 2	75
5. REFERENCIAS:	118

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Próstata

1.1.1. Epidemiologia

O câncer de próstata é a neoplasia mais comum no sexo masculino, com alta taxa de incidência, excetuando-se os tumores de pele não-melanoma (WIWANITKIT, 2004). É considerado um problema de saúde pública devido ao crescente aumento da incidência e da mortalidade entre os homens, por apresentar um crescimento lento com poucos sinais e sintomas em seu estágio inicial e associada ao envelhecimento do indivíduo (CRAWFORD, 2003).

Há uma tendência para um aumento nas taxas de incidência e mortalidade, com um impacto desfavorável na sobrevivência e qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela doença. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) as estimativas, para o Brasil, são de 65.840 casos novos de câncer de próstata para cada ano do triênio 2020-2021 (INCA, 2019).

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez dos dez tipos de câncer mais incidentes (exceto de pele não melanoma) estimados para 2020 por sexo no Brasil.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Inca 2020

Na região nordeste há uma estimativa de 20.750 novos casos dessa patologia com risco estimado de 72,35/100 mil homens. Na projeção de dados para o estado de Alagoas 890 casos/100 mil homens e na capital, Maceió, 300/100 mil homens. (INCA, 2019).

Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez dos dez tipos de câncer mais incidentes (exceto de pele não melanoma) estimados para 2020 por sexo - região Nordeste.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	20.570	40,7%	Homens	Mulheres	Mama feminina	13.190	27,3%
Traqueia, brônquio e pulmão	3.120	6,2%			Colo do útero	5.250	10,9%
Estômago	3.000	5,9%			Cólon e reto	3.220	6,7%
Cólon e reto	2.540	5,0%			Traqueia, brônquio e pulmão	2.640	5,5%
Cavidade Oral	2.180	4,3%			Glândula tireoide	2.360	4,9%
Esôfago	1.580	3,1%			Estômago	2.090	4,3%
Leucemias	1.430	2,8%			Ovário	1.690	3,5%
Laringe	1.420	2,8%			Corpo do útero	1.520	3,1%
Sistema nervoso central	1.340	2,7%			Sistema nervoso central	1.250	2,6%
Linfoma não Hodgkin	1.120	2,2%			Leucemias	1.210	2,5%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Inca 2020

A etiologia do Câncer de próstata é multifatorial e, embora ainda não totalmente compreendida, as variações geográficas e étnicas sugerem que os fatores genéticos têm um papel fundamental, bem como os fatores ambientais e de estilo de vida. Até agora, os fatores de risco mais bem estabelecidos são idade, história familiar e etnia (BENAFIF; KOTE-JARAI; EELES, 2018).

1.1.2. Fatores de risco

É sabido que o câncer de próstata acomete principalmente os homens mais velhos. Cerca de 6 em cada 10 casos são diagnosticados em homens com mais de 65 anos, sendo raro antes dos 40 anos. A média de idade no momento do diagnóstico é de 66 anos. Foi demonstrado que além da idade avançada, outros fatores como: etnia, história familiar, alterações hormonais e doenças específicas, são fatores associados a neoplasia de próstata (TOURINHO-BARBOSA; POMPEO; GLINA, 2016, POURESMAEILI et al., 2014).

Histórico familiar positivo para câncer de próstata, pai ou irmão, antes dos 60 anos de idade é fator relevante que pode aumentar o risco de 3 a 10 vezes em relação à população em geral e refletir o comportamento genético ou fatores sócio ambientais compartilhados (INCA, 2002).

Na revisão publicado por KHEIRANDISH; CHINEGWUNDOH, 2011; comparando a incidência de Câncer de próstata entre homens negros e brancos foi observado que homens negros têm 2,4 vezes mais probabilidade de morrer de câncer de próstata do que homens brancos da mesma idade.

1.1.3. Diagnóstico

Um fator importante para o aumento do diagnóstico do câncer de próstata foi a descoberta da molécula do antígeno prostático específico (PSA), uma glicoproteína de 34

Da produzida pelas células epiteliais prostáticas colunares e ductais com a finalidade de liquefação do sêmen. É usado como biomarcador no diagnóstico, estadiamento e monitoramento de pacientes com câncer de próstata, por ser uma molécula produzida exclusivamente pela próstata (KHEIRANDISH; CHINEGWUNDOH, 2011).

No rastreamento do câncer de próstata o exame digito prostático e a dosagem do PSA, apresentam limitações relacionadas à sensibilidade e especificidade e ao baixo valor preditivo positivo. Em função disso, os benefícios e os riscos do rastreamento para este câncer têm sido amplamente debatidos na literatura e não há consenso em relação às diretrizes para sua utilização em nível populacional. (ABRAHAMSSON et al., 2009; BRYANT; HAMDY, 2008; CRAWFORD, 2003; GREENE et al., 2009)

O rastreio do câncer de próstata baseado em PSA é controverso e não tem uma padronização mundial. O rastreamento baseado na dosagem dessa proteína apontou uma redução na taxa de morte por câncer de próstata em 20%, porém foi associado ao aumento do sobrediagnóstico (SCHRÖDER et al., 2009). A Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) recomenda que homens a partir de 50 anos devem procurar avaliação individualizada. E aqueles com fatores de risco como: raça negra, parentes de primeiro grau com câncer de próstata devem começar aos 45 anos. O rastreamento deve ser realizado após análise dos potenciais riscos.

Na prática, o que tem sido observado em diferentes países é a realização dos exames de rastreamento por uma elevada proporção de indivíduos, com repercussões significativas na saúde pública, como super diagnóstico e super tratamento (BOYLE; BRAWLEY, 2009; SMITH et al., 2013). O PSA é uma proteína específica da próstata, mas não é específico do câncer de próstata, pois encontra-se elevações no nível de PSA em outras condições, como grande hiperplasia benigna da próstata, prostatite, manipulações da próstata e ejaculação recente em 24 horas (LOJANAPIWAT et al., 2014)

O exame dígito prostático, associado ao PSA é importante na propedêutica urológica, influenciado por fatores culturais entre diferentes populações. A triagem é uma ação secundária de prevenção para a detecção da doença em fases anteriores. De modo geral, é preconizado que os médicos discutam a realização do rastreamento e suas possibilidades diagnósticas e terapêuticas com os pacientes de 50 anos ou mais, para que

seja tomada, individualmente, uma decisão informada (ABRAHAMSSON et al., 2009; SMITH et al., 2013; TOURINHO-BARBOSA; POMPEO; GLINA, 2016).

Quando há discordância entre o valor do PSA e o exame digito-prostático, a biópsia transretal de próstata guiada por ultrassonografia, tem um valor fundamental na confirmação diagnóstica do câncer de próstata, pois permite coletar fragmentos de áreas suspeitas. No entanto, as biópsias com retirada de seis fragmentos, correspondem aproximadamente cerca de 1% do volume da glândula, e carregava o risco de perder pequenos tumores em glândulas de grande volume e aqueles na zona periférica anterolateral, zona de transição anterior e ápice. A zona periférica representa até 75% dos cânceres e a biópsia padrão com retirada de 6 fragmentos perde até 30% das neoplasias clinicamente significativas, razão pela qual o número de fragmentos foi posteriormente aumentado para 8, 12 e 14 com melhora resultante na detecção de câncer (CHING et al., 2009; DAS et al., 2019)(BONEKAMP et al., 2011; CHING et al., 2009; DAS et al., 2019)

1.1.3.1. Diagnóstico histológico

A obtenção de fragmentos de todas as zonas prostáticas, com inclusão das zonas suspeitas é de fundamental importância na realização do estudo histológico da doença e correlação com a classificação de Gleason (WELCH et al., 2007). Tradicionalmente, um PSA sérico de 4 ng/ml tem sido usado como o corte para a realização da biópsia da próstata; no entanto, com o decorrer do tempo, o valor de corte para biópsia diminuiu para 2,5 ng/ml, o que causou um aumento do número de biópsias resultando em morbidade adicional por incluir infecção, hematúria, hematospermia, dor, disfunção erétil, infecções do trato urinário, maior detecção de câncer clinicamente insignificante e ansiedade (MERRICK et al., 2020). No entanto, os níveis de PSA aumentam com o avançar da idade e com aumento do volume prostático, mesmo na ausência de malignidade. Para homens na faixa dos 40 anos, 0 a 2,5 ng/mL; dos 50 anos, 0 a 4,0 ng/mL, faixa dos 60 anos, 0 a 4,5 ng/mL e para homens na faixa dos 70 anos, 0 a 5,5 ng/mL (ARMY et al., 1996; DAS et al., 2019; WELCH; SCHWARTZ; WOLOSHIN, 2005).

O sistema de classificação Gleason baseia-se inteiramente no padrão histológico do arranjo celular no tecido prostático corados com hematoxilina e eosina com magnificação baixa (x10-40) pela extensão da diferenciação glandular e pelo padrão de crescimento do tumor no estroma prostático (EPSTEIN, 2010; HUMPHREY, 2004,

2017). No sistema Gleason, os padrões histológicos são categorizados em cinco padrões de grau básico pela extensão da diferenciação glandular e pelo padrão de crescimento do tumor no estroma prostático (figura 3). Estes cinco padrões de grau básico são usados para gerar uma pontuação histológica, que pode variar de 2 a 10, adicionando os padrões de grau primário e o padrão de grau secundário. O padrão primário é o que é predominante na área em inspeção visual simples. O padrão secundário é o segundo padrão mais comum. Esses dois padrões são somados para obter o escore de Gleason. Se apenas um grau estiver presente na amostra de tecido, então esse grau é multiplicado por dois para se obter o escore (HUMPHREY, 2017; ICZKOWSKI; VAN LEENDERS; VAN DER KWAST, 2021).

Atualmente a escala da ISUP (International Society of Urological Pathology), A escala ISUP varia de 1 a 5. Os tumores ISUP 1 (escore de Gleason 6 – 3+3) são tumores de crescimento bastante lento, e muitas vezes não requerem nenhum tratamento, somente a observação. Os tumores ISUP 2 (escore de Gleason 7- 3+4) e 3 (escore de Gleason 7 – 4+3) têm crescimento intermediário, ao passo que os tumores ISUP 4 (escore de Gleason 8 – 4+4) e 5 (escore de Gleason 9 ou 10) são de crescimento e progressão mais rápidas e com maior possibilidade de doença avançada (MONTIRONI et al., 2016).

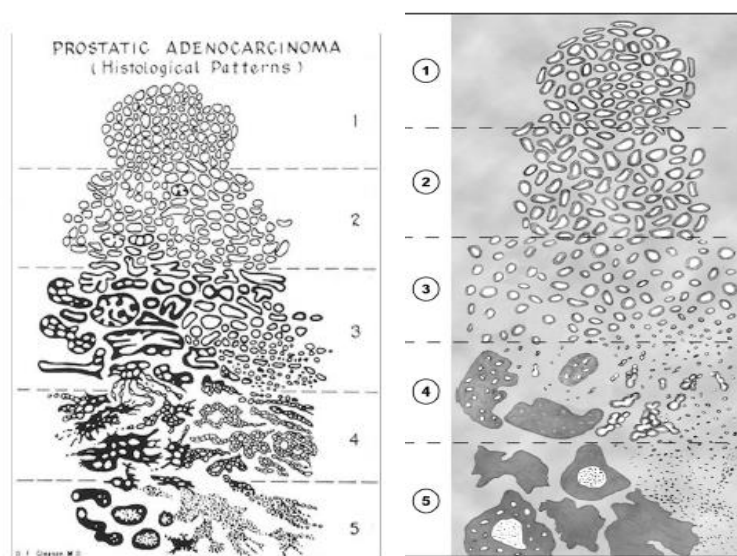


Figura 3 – Comparação entre as escalas de Gleason e a escala de Gleason modificada. Observa a presença de glandular cribriformes estão presentes nos padrões 4 e 5. in EPSTEIN, 2010

1.1.4. Estadiamento clínico

A graduação histológica do adenocarcinoma da próstata, incluindo o uso dos graus ISUP, é um dos indicadores de prognóstico mais relevantes para câncer de próstata clinicamente localizado, e é um dos fatores mais críticos na determinação do manejo desses pacientes. Na prática clínica, quando a doença é suspeita, a biópsia é planejada e se confirmada a suspeita clínica, a neoplasia é classificada em baixo, intermediário ou alto risco de recidiva após tratamento radical (método cirúrgico ou radioterapia externa), considerando o nível sérico de PSA, o padrão histológico e o estágio clínico TNM de acordo com a classificação de risco D'Amico (TAFURI et al., 2020).

O sistema TNM, preconizado pela União Internacional para o Controle do Câncer (UICC), de Classificação dos Tumores Malignos. Baseia-se no comprometimento local, levando em conta as características do tumor primário (T), as cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases a distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente. No câncer de próstata esse sistema é baseado nas condições clínicas, exame digito prostático, biópsia da próstata e quaisquer exames de imagem realizados conforme representado no quadro abaixo (quadro 1) (HUMPHREY, 2004; ICZKOWSKI; VAN LEENDERS; VAN DER KWAST, 2021; MOTTET N; CORNFORD P; VAN DEN BERGH RCN, 2021).

Com o estadiamento e a localização precisa do câncer de próstata, as terapias minimamente invasivas podem fornecer resultados oncológicos precisos e com comorbidades. As opções de tratamento para pacientes com câncer de próstata incluem prostatectomia (para doença T1 e T2 confinada ao órgão) e ablação hormonal e radioterapia (para doença T3 e T4 extraprostática avançada). As opções de terapia local e minimamente invasiva para câncer de próstata confinado ao órgão incluem crioablação, ablação por radiofrequência, braquiterapia, terapia fotodinâmica e ultrassonografia focalizada de alta intensidade (HIFU); no entanto, essas terapias requerem a localização exata do câncer, por meio da ressonância magnética da pelve. Em certas situações, a conduta expectante é uma escolha legítima para pacientes com doença de baixo volume, baixo grau e baixo risco.(BONEKAMP et al., 2011).

Quadro 1: Classificação TNM Câncer de Próstata

T - Tumor primário (estágio baseado no exame retal digital [DRE] apenas)	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor clinicamente inaparente que não é palpável
	T1a Achado histológico incidental de tumor em 5% ou menos do tecido ressecado
	T1b Achado histológico incidental de tumor em mais de 5% do tecido ressecado
	T1c Tumor identificado por biópsia de agulha (por exemplo, devido ao elevado antígeno específico da próstata [PSA])
T2	Tumor que é palpável e confinado na próstata
	T2a O tumor envolve metade de um lóbulo ou menos
	T2b O tumor envolve mais da metade de um lóbulo, mas não os dois lóbulos
	T2c O tumor envolve ambos os lobos
T3	O tumor se estende através da cápsula prostática
	T3a Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral)
	T3b O tumor invade as vesículas seminais
T4	O tumor está fixo ou invade estruturas adjacentes que não sejam as vesículas seminais: esfíncter externo, reto, músculos elevadores e / ou parede pélvica
N - Linfonodos Regionais (pélvicos)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase de linfonodo regional
N1	Metástase de linfonodo regional
M - Metástase à distância	
M0	Sem metástase distante
M1	Metástase distante
	M1a Linfonodo (s) não regionais
	M1b Osso (s)
	M1c Outro (s) sítios (s)

Fonte: MOTTET N; CORNFORD P; VAN DEN BERGH RCN. EAU-ESTRO-ESURSIOG guide- lines on prostate cancer. **European Association of Urology 2021 (Update 2021).**, 2021.

1.1.5. Invasão perineural, Metástase e células de schwann

A invasão perineural, é um processo complexo de invasão de células tumorais ao longo dos nervos, é uma entidade patológica distinta que pode ser observada na ausência de invasão linfática ou vascular. É um importante mecanismo para a propagação à distância do câncer de próstata. As células tumorais migram e invadem ao longo de todos

os componentes estruturais dos nervos prostáticos (perineuro, epineuro e bainha endoneuro). Clinicamente a invasão perineural é um indicador prognóstico independente e significativo para a presença de extensão celular tumoral além da próstata. (AYALA et al., 2004; LIEBIG et al., 2009; SROKA et al., 2010).

O câncer de próstata confinado ao órgão pode ser efetivamente controlado, a doença metastática, originária da extensão extracapsular é inevitavelmente incurável. Um determinante importante do comportamento tumoral é a capacidade de alcançar as membranas basal e se espalhar além dos limites do órgão de origem. A neoplasia de próstata tem a propriedade de invadir e crescer ao longo dos nervos prostáticos, dessa forma o microambiente do espaço perineural, é utilizado para promover o crescimento e propagação das células tumorais (ZAREBA et al., 2017)

A invasão perineural é relatada em 85% dos pacientes com câncer de próstata, pelo menos 50% dos casos envolvendo extensão extracapsular ocorreram pela disseminação do câncer dentro dos espaços perineurais, implicando que a motilidade e a invasividade das células tumorais ao longo dos nervos não é um processo de células tumorais autônomas, mas uma relação recíproca entre nervos e células tumorais (AYALA et al., 2004; LIEBIG et al., 2009; SROKA et al., 2010; ZHANG et al., 2018).

A mortalidade em pacientes com câncer de próstata é geralmente atribuída à propagação extracapsular, o que muitas vezes resulta em falha no tratamento e é associada com prognóstico ruim e pode ser um fator para a recidiva bioquímica do câncer de próstata. (ZHANG et al., 2018)

O fenômeno da carcinogênese é um processo complexo que ocorre através de múltiplos eventos genéticos que alteram as funções normais dos oncogenes e dos genes supressores de tumor. Dependendo das características do tumor primário, do estroma e da capacidade intrínseca de células tumorais metastáticas a se adaptarem em um novo local, as células malignas usam mecanismos distintos na proliferação, sobrevivência e disseminação (NAJI *et al.*, 2019. DU; CHENG; SU, 2019).

Essas células frequentemente reativam a expressão de genes que são empregados por células normais durante o processo de embriogênese (THOMAS; RADHAKRISHNAN, 2019; LO; ZHANG, 2018; NOGUTI *et al.*, 2012). Para deixar o tumor primário e disseminar em órgãos distantes, as células metastáticas perdem a habilidade de aderência às células adjacentes, potencializando a capacidade migratória e invasiva. Esse mecanismo é acompanhado por várias modificações na expressão de

genes, como por exemplo, perda da expressão de receptores epiteliais e aumento da expressão de marcadores mesenquimais, fenômeno também conhecido como transição epitélio-mesenquimal (AIELLO *et al.*, 2018; LARNE *et al.*, 2015).

A matriz extracelular desempenha um papel crítico no microambiente tumoral. Durante a formação tumoral, as células neoplásicas se ligam a moléculas presentes na matriz extracelular, o que facilita a comunicação com outras células, tais como neutrófilos, fibroblastos, macrófagos e linfócitos (MCCUBREY *et al.*, 2007). A matriz extracelular é especialmente importante na formação e invasão tumoral à medida que as células respondem e se adaptam ao microambiente local. Isto envolve tanto a proliferação desregulada de células tumorais como a modificação do ambiente imediato para favorecer a sobrevivência celular, a angiogênese e o crescimento tumoral (KOGURE; KOSAKA; OCHIYA, 2019).

Estudos têm demonstrado que as células de Schwann atuam em vários processos durante a cancerização (FURLANA; ADAMEYKO, 2018; BUNIMOVICH *et al.*, 2016). As células neoplásicas parecem produzir fatores que mimetizam o processo de resposta dos axônios periféricos à lesão. Dessa forma, as células de Schwann podem se desdiferenciar, migrando para a região próxima às células neoplásicas e, estas sendo carregadas para a região perineural, já nos estágios iniciais da carcinogênese (AIELLO *et al.*, 2018; LO; ZHANG, 2018; PASTUSHENKO *et al.*, 2018).

As células de Schwann expressam metaloproteinases da matriz tipo 2 e 9 (MMP2 e MMP9), que são gelatinases fundamentais no processo de degradação da matriz, além de expressarem moléculas de adesão celular neural 1 (NCAM1), indicando uma possível direta contribuição na invasão tumoral (DEBORDE *et al.*, 2016; GOKEY *et al.*, 2012; NAPOLI *et al.*, 2012; WEBBER *et al.*, 2011). Levando em consideração que células imunes podem infiltrar um nicho tumoral e modular a invasão neoplásica, vale ressaltar que diante do estímulo de lesão nervosa, as células de Schwann também recrutam macrófagos (ROSS; PAWLINA, 2016; JESSEN; MIRSKY; LLOYD, 2015).

A invasão neoplásica é um evento que envolve ação de células presentes no microambiente tumoral, que promovem a progressão tumoral através da biointeração com as células neoplásicas circundantes (AZAM; PECOT, 2016; NAPOLI *et al.*, 2012). Quando se trata de uma invasão neoplásica num tecido nervoso, as células nervosas constituem o microambiente tumoral inteiro (WANG *et al.*, 2017). Células cancerosas e

células nervosas se misturam e, em alguns casos, há uma perda completa dos elementos neurais (BOCKMAN; BÜCHLER; BEGER, 1994). No contexto de uma progressão tumoral, apesar de vários tipos celulares nervosos poderem contribuir para sua evolução, estudos recentes indicam que as células de Schwann estão profundamente associadas com a interação das células cancerígenas nos nichos tumorais em que há presença de tecido nervoso periférico (DEBORDE; WONG, 2017; BUNIMOVICH *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Identificar marcadores moleculares associados às células de Schwann e amostras de Câncer de Próstata.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar, através da bioinformática, a expressão diferencial de genes em amostras de células de Schwann tratadas com fatores de crescimento produzidos por células neoplásicas;
- Comparar a expressão dos genes em células de Schwann e amostras de câncer de próstata;
- Identificar as vias moleculares dos genes com expressão diferenciadas;
- Compreender o mecanismo pela qual as células de Schwann auxiliam na proliferação, motilidade, apoptose e viabilidade da célula neoplásica.

3. METODOLOGIA

- Este trabalho foi descrito sob a forma de artigo científico, cuja metodologia e discussão encontram-se descritas, em sua totalidade, no texto do artigo a ser submetido à publicação em periódico indexado.
- **Perineural invasion on prostate cancer is associated with Schwann cells and circadian rhythm-related genes disruption: a bioinformatic approach**
- Solicitação de pedido de patente de Painel genético no prognóstico e predição de neoplasia de próstata. Conforme normas do INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

O artigo foi estruturado com base nas normas de publicação do periódico. Após a apresentação dos dois produtos, seguir-se-ão as considerações finais, bem como as referências relacionadas à dissertação em geral.

4. PRODUTOS

4.1. Produto 1

Perineural invasion on prostate cancer is associated with Schwann cells and circadian rhythm-related genes disruption: a bioinformatic approach

Sérgio Lopes Silva¹, Hellem Cristina dos Santos Lima¹, Genilda Castro de Omena Neta¹, Rodger Marcel Lima Rocha¹, Ana Kelly Fernandes Duarte¹, Alexandre Wendell Araujo Moura¹, Carlos Alberto de Carvalho Fraga^{1*}

¹ Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca. Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, Arapiraca, AL 57309-005, Brazil.

*Corresponding author: Carlos Alberto de Carvalho Fraga. Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, Arapiraca, AL 57309-005, Brazil Tel. +55 82 991931405; E-mail: carlos.fraga@arapiraca.ufal.br

Abstract

Studies have shown that Schwann cells participate in the tumor microenvironment, producing several factors that benefit cancer cells. During this process, Schwann cells are dedifferentiated and help the process of cancer cellular proliferation. These cells then migrate to the region close to the tumor tissue and assist the development of the neoplastic cell. In this context, the aim of the present study was to evaluate the influence of Schwann cells over prostate cancers. We investigated the association between Schwann cells and prostate cancer often associated with perineural invasion. Initially, we used the GEO DataSets platform from the GEO repository to identify a database reporting gene expression in Schwann cells in a neoplastic context. Briefly, the database contains the expression results from experiments in which two factors produced by tumor cells were added into cell cultures. Comparisons were made between samples from the first and third passages. We then used these data to perform differential gene expression analysis and crossed data from upregulated genes with differential expression data from negative and positive perineural invasion prostate cancers. We observed that the “axon guidance” pathway was upregulated in negative perineural invasion prostate cancers. Meanwhile, upregulated mRNAs activate the “axon guidance” and, together with *ROBO1* and *MPZ* upregulation, inhibits perineural invasion pathways. Both genes are also associated with Schwann cells migration inhibition. *PER3*, *NR3C1*, *PPARGC1A*, *TIMP3*, *ID2*, *PDE6B* and *CAVIN1* were upregulated in negative perineural tumors, while *SLC25A10* was upregulated. We also observed upregulated genes in positive perineural invasion: *PPARGC1A*, *TIMP3*, *S100A8*, *ID2*, *DEFB1*, *AQP3*, *ASS1*, *PDE6B*, *NEFH* and *CAVIN1*. *AQP3* and *NEFH* were upregulated only in positive perineural invasion tumors and *PER3* and *NR3C1* were upregulated only in negative perineural invasion samples. We believe that Circadian rhythm and/or melatonin disruption could be associated with Schwann cells dedifferentiation; consequently, Schwann cells produce different factors that will participate in various processes of tumor progression. These processes may also be involved in tumor invasion into the perineural tissue in prostate cancer.

Keywords: bioinformatic; prostate adenocarcinoma; clock-related genes; Schwann

Introduction

The phenomenon of carcinogenesis is a complex process that occurs through multiple genetic and epigenetic events altering the normal functions of oncogenes and tumor suppressor genes [1]. Such changes may result in an increased production of growth factors or transcription factors, or an increased number of cell surface receptors and intracellular flags [2]. The loss of tumor suppressor activity leads to a cellular phenotype capable of increasing cell proliferation and loss of cell adhesion, enabling such mutated cells to infiltrate local tissues and to spread to distant sites. Metastasis is the cause of 90% of cancer deaths and results in a diverse set of clinical manifestations [3]. Metastases occur when malignant neoplastic cells leave the primary site and travel via blood and lymph vessels to new sites in the body where they disseminate new colonies. Cancer cells then employ various strategies to aid adaptation and subsequent expansion and progression in new sites. Formation and progression of cancer is a multisystemic process, involving the immune system, vascularization, and dissemination [4]. Metastatic training is characterized by tumor growth, invasion of the basement membrane into submucosal tissues, vascular and lymphatic formation, perineural and systemic tissue invasion, and subsequent progression [5,6].

The extracellular matrix plays a critical role in tumor microenvironment. During tumor formation, neoplastic cells bind to molecules present in the extracellular matrix, which facilitates communication with other cells, such as neutrophils, fibroblasts, macrophages, lymphocytes, and peripheral nervous system cells [7–9]. The extracellular matrix is especially important in tumor formation and invasion as cells respond and adapt to the local microenvironment. This involves both the unregulated proliferation of tumor cells and the modification of the immediate environment to favor cell survival, angiogenesis, and tumor growth. Factors that can degrade the extracellular matrix also facilitate tumor formation and invasion [10]. For example, matrix metalloproteinases (MMPs) have been associated with the degradation of basement membranes and extracellular matrix, facilitating the invasion and metastasis of tumor cells, as well as promoting cell proliferation, metastasis, and angiogenesis [8,11,12]. In addition to the degradation of the matrix, another important aspect in the formation and invasion of the tumor is the process called epithelial-mesenchymal transition. The epithelial-mesenchymal transition allows the tumors' epithelial cells to produce factors generally found in the extracellular matrix [13].

Studies have shown that circadian entertainment disruption is associated with Schwann cells dedifferentiation [14,15]. We suppose that clock genes deregulation [16] and could participate in the tumor microenvironment together with Schwann cells [17], controlling several factors that benefit cancer cells. During this process, Schwann cells are dedifferentiated and help the process of cancer cellular proliferation [10,18,19]. These cells then migrate to the region close to the tumor tissue and assist the development of the neoplastic cell [18]. In this context, the aim of the present study was to evaluate the perineural invasion in prostate cancers, associating with Schwann cells-related genes.

Methods

Gene list collection

We performed gene list collection by using Entrez Gene from NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) and GeneCards (<https://www.genecards.org/>), which were used as the identifiers for perineural invasion-related genes. The gene list and downregulated/ upregulated DEGs of the gene expression profiles were combined and identified with a Venn Diagram 2.1.0 (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) [15,20].

RNA-seq and clinical information data from The Cancer Genome Atlas (TCGA)

We used TCGAbiolinks, an R/Bioconductor software (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/TCGAbiolinks.html>) and the interphase TCGAbiolinksGUI to download genomic and clinical data of both normal and solid tumor tissues for two different types of cancer from TCGA. Selected cancer type was Prostate Adenocarcinoma (PRAD). We retrieved level data for raw count mRNA and miRNA expression (Illumina HiSeq 2000). Co-expressed upregulated and downregulated DEGs from the gene expression profiles were combined and identified with a Venn Diagram 2.1.0 (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>). An adj. $P < 0.05$ and a $\log_{2}FC \geq 1$ were set as the cut-off criteria [21,22].

Collection and inclusion criteria of studies

We previously searched the GEO database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) for publicly available gene expression profiling studies associating Schwann cells and cancer. After a systematic review, only one gene expression profiles (GSE4030) was downloaded from the GEO database. GEO2R was applied to compare gene expression profiles in passage 1 and passage 3 human Schwann cells exposed to the growth factors heregulin and forskolin. Because both groups in this comparison have been exposed to mitogens, differences in gene expression profiles will be interpreted as indicative of changes caused by prolonged versus short term exposure to mitogens. GEO2R (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) is an interactive web tool for comparing two groups of data that can analyze any GEO series. The adjusted p-values using Benjamini and Hochberg false discovery rate method by default were applied to correct the

occurrence of false positive results. An adj. $P < 0.05$ and a $\log_{2}FC \geq 1$ were set as the cut-off criteria [23].

The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) is an integrated database resource for biological interpretation of genome sequences and other high-throughput data . KEGG analyses were available at the DAVID database (<https://david.ncifcrf.gov/>), a data resource composed of an integrated biology knowledge base and analysis tools to extract meaningful biological information from large quantities of genes and protein collections. A p -value < 0.05 was set as the cut-off criterion [24].

Prostate cancer expression analyses

Several other web resources were used as source of information while some more were used as analysis tools for prostate cancer expression studies: Immunohistochemistry image-based protein data for both normal and cancer samples are available at the Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>). NA methylation analyses were performed using MEXPRESS dataset (<https://mexpress.be/?ref=labworm>). The cancer dataset, consisting of DNA methylation data (Illumina Infinium Human Methylation 450 K Bead array, Illumina, USA) and the β value, was considered as significantly hypermethylated only if the value was found in more than 5% of the tumors. Copy number alteration analysis was performed using the cBio Cancer Genomics Portal (<http://cbioportal.org>). Survival analysis of the TCGA data was performed using the Survival module of the Tumor Immune Estimation Resource (TIMER). Kaplan–Meier plots were drawn using TIMER to explore the association between clinical outcome and gene expression, and to visualize survival differences [25].

Results

Identification of differentially expressed genes (DEGs), gene ontology enrichment, and functional classification

We obtained gene expression data belonging to specimens across prostate adenocarcinoma from TCGA; these data were preprocessed using standard methods. We performed a differentially expressed gene analysis in perineural invasion positive and negative patients. According to DAVID analysis, Cell adhesion molecules (CAMs), Pathways in cancer, Melanogenesis, Gap junction, Circadian entrainment, Fc gamma R-mediated phagocytosis, Gastric acid secretion, Axon guidance, Histidine metabolism, Viral myocarditis, Serotonergic synapse, Small cell lung cancer, Long-term depression, Glutamatergic synapse and Leukocyte transendothelial migration were upregulated pathways only in perineural invasion negative tumors. Chemical carcinogenesis, Calcium signaling pathway, Oxytocin signaling pathway, TGF-beta signaling pathway, Tryptophan metabolism, Amoebiasis and Cardiac muscle contraction migration were upregulated only in perineural invasion positive tumors (Supplementary Tables 1-4).

We previously selected dataset from the GEO database containing gene expression profile of both early and late passage human Schwann cells exposed to cancer growth factors heregulin and forskolin. These expression profiles were used to identify DEGs with the aid of the online tool GEO2R. GEO2R was applied to compare gene expression profiles in passage 1 and passage 3 human Schwann cells exposed to the growth factors heregulin and forskolin. Because both groups in this comparison have been exposed to mitogens, differences in gene expression profiles will be interpreted as indicative of changes caused by prolonged versus short term exposure to mitogens. Upregulated DEG enrichment included Neuroactive ligand-receptor interaction, Maturity onset diabetes of the young and Tyrosine metabolism, while Pathways in cancer, Focal adhesion, Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC), Adherens junction, Basal cell carcinoma, p53 signaling pathway, Colorectal cancer, Progesterone-mediated oocyte maturation, Oocyte meiosis, Hedgehog signaling pathway, ECM-receptor interaction, Melanogenesis, Calcium signaling pathway, Dilated cardiomyopathy, Cell cycle and Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) were enriched for downregulated DEGs.

Overview of the cancer transcriptomic analysis

We conducted a systematic and integrative analysis to explore cancer type-specific and Schwann cell specific DEGs, to construct a cancer network. We first determined DEGs by comparing gene expression levels between tumor and normal samples. A Venn diagram was then constructed to visualize the overlap between DEG genes, both upregulated and downregulated, from both cancer and Schwann cells. Among upregulated genes from negative and positive perineural invasion samples, we identified 166 and 142 co-expressed DEGs with Schwann cells, respectively.

We also performed a KEGG analysis to investigate pathways with major expression changes in schwann cell lines and negative/positive perineural invasion tumors, based on previously identified upregulated DEGs. The analysis revealed that MicroRNAs in cancer, Complement and coagulation cascades, Hippo signaling pathway and Transcriptional misregulation in cancer were activated pathways only in intersected Schwann cells and negative perineural samples common DEGs, while regulation of actin cytoskeleton was activated only in upregulated intersected Schwann cells and positive perineural samples common DEGs (Supplementary Table 5-6).

Hallmarks of cancer analysis

In order to understand the mechanism by which Schwann cells aid in neoplastic development, we analyzed the behavior of genes associated with cell differentiation processes (*GATA3*, *CDH1*, and *CDH2*), apoptosis (*CASP3*, *CASP9*, *BAX*, and *BCL2*), motility (*CXCR2*, *CXCL5*, *MMP9*, and *CCL12*), and cell proliferation (*MKI67*). In perineural negative tumors, *GATA3*, *BCL2* and *CXCR2* were upregulated, while *GATA3* was upregulated, and *MMP9* was downregulated in positive perineural invasion samples (Figure 1 A-B).

Analysis of genes involved in dedifferentiation of Schwann cells

Schwann cells produce cell differentiation maintenance proteins (*SOX10*, *S100*, *EGR2*, *MBP*, *ROBO1*, *ROBO2*, *SLIT2* and *MPZ*) that, after nerve damage, diminish their expression, provoking cellular dedifferentiation. Immediately after injury, the cell body initiates a series of metabolic responses, cytoplasmic reorganization and specific changes in gene expression (upregulation of *SOX10*, *GAP43*, *S100*, *NCAM1*, *NGFR1*, and *GFAP*), known as neuronal reaction [18,26,27]. We observed increased expression of *NCAM1* and *NGFR* genes in both negative and positive perineural invasion cancers, whereas

ROBO1 and *MPZ* was upregulated only in negative perineural tumors (Figure 1 A-B).

Analysis of clock-related genes

Since circadian entertainment is an upregulated pathway in positive perineural prostate tumors, we associated DEGs to clock-related gene list. *PER3*, *NR3C1*, *PPARGC1A*, *TIMP3*, *ID2*, *PDE6B*, *SLC25A10* and *CAVIN1* were upregulated in negative perineural tumors. We also observed upregulated genes in positive perineural invasion: *PPARGC1A*, *TIMP3*, *S100A8*, *ID2*, *DEFB1*, *AQP3*, *ASS1*, *PDE6B*, *NEFH* and *CAVIN1*. *AQP3* and *NEFH* were upregulated only in positive perineural invasion tumors and *PER3* and *NR3C1* were upregulated only in negative perineural invasion samples (Figure 1 C-D). The DEG analyses are supported by immunohistochemistry analysis (Figure 2).

Methylation and copy number alteration

Methylation analysis of the *GATA3*, *BCL2*, *CXCR2*, *MMP9*, *NCAM1*, *NGFR*, *ROBO1*, *AQP3*, *NEFH* and *PER3* genes from tumor samples demonstrated that all of them were methylated in their promoter regions unlike those from normal tissues (data not shown). However, there was a positive correlation between methylation and *MPZ* and *NR3C1* gene expression (Figures 3-4, respectively). Copy number alteration data demonstrated that *CDH1*, *CDH2*, *GFAP*, *PERP*, and *ROBO2* had a higher mRNA expression than normal tissues; increased expression was associated with gain or amplification alterations in PRAD samples (Figure 5).

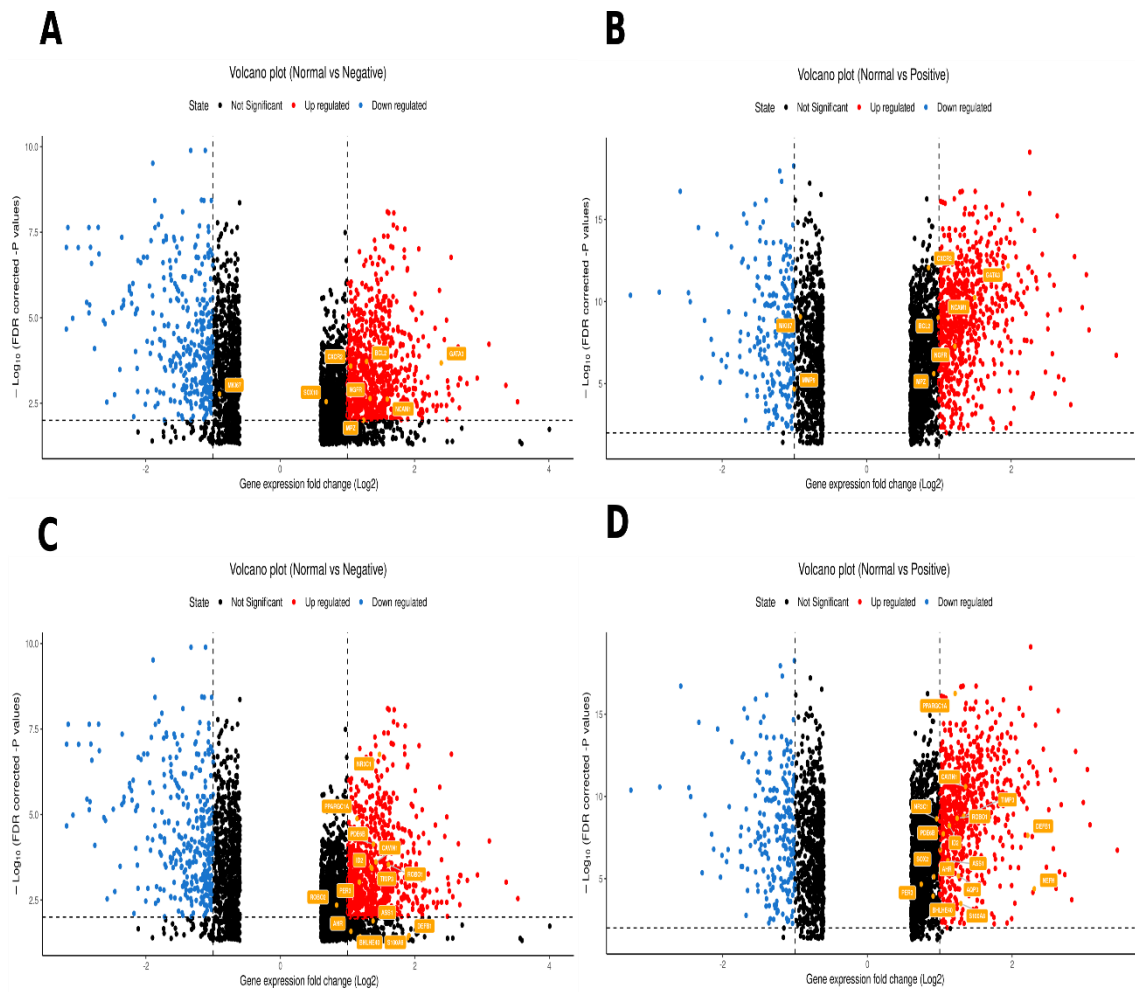


Figure 1-Representative immunohistochemical staining characteristics of ARNTL2 expressions in normal and cancer patients. Data are extracted from The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>).

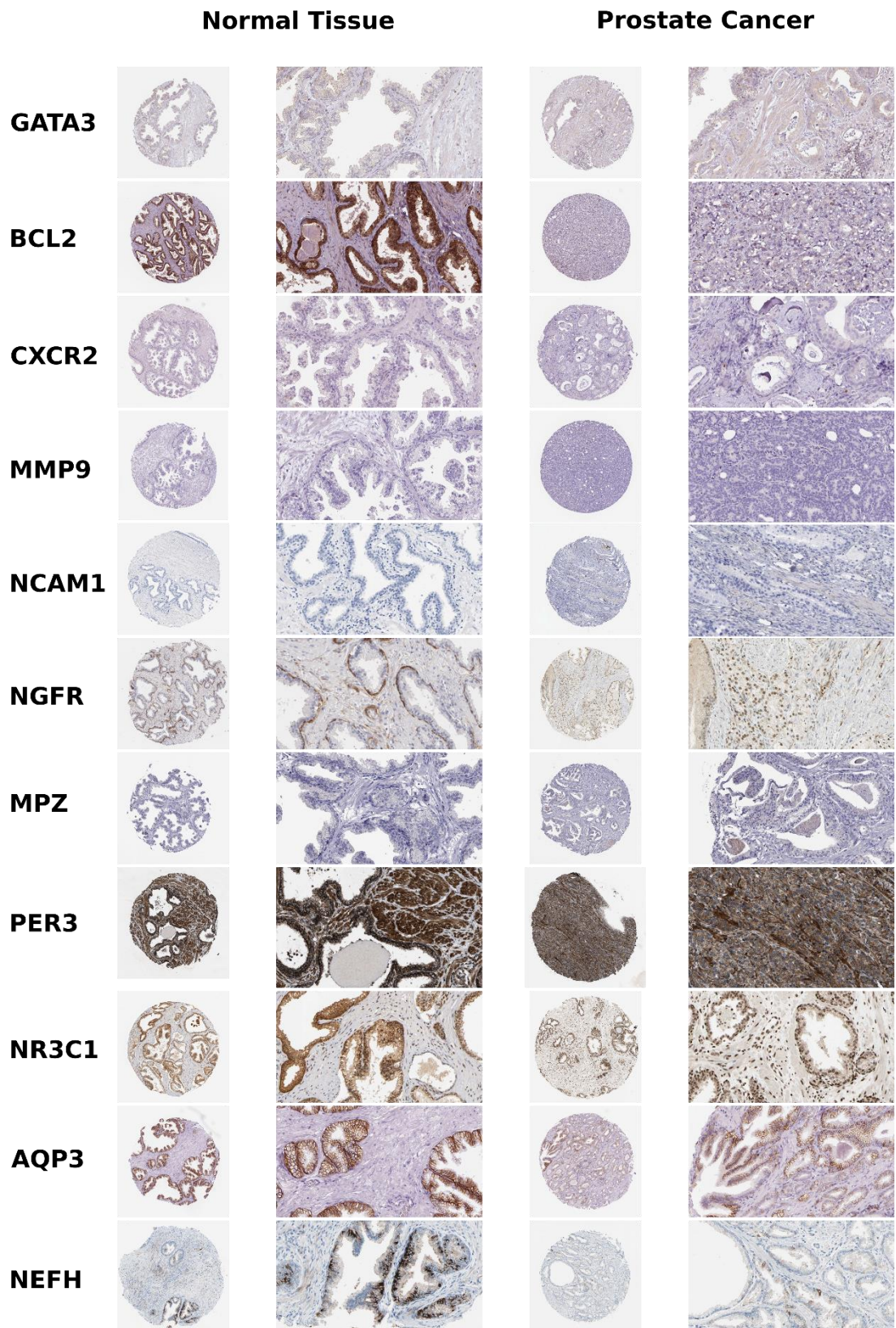


Figure 2- Representative immunohistochemical staining characteristics of GATA3, BCL2, CXCR2, MMP9, NCAM1, NGFR, ROBO1, MPZ, AQP3, NEFH, PER3 and NR3C1 expressions in normal and cancer patients. Data are extracted from The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>)

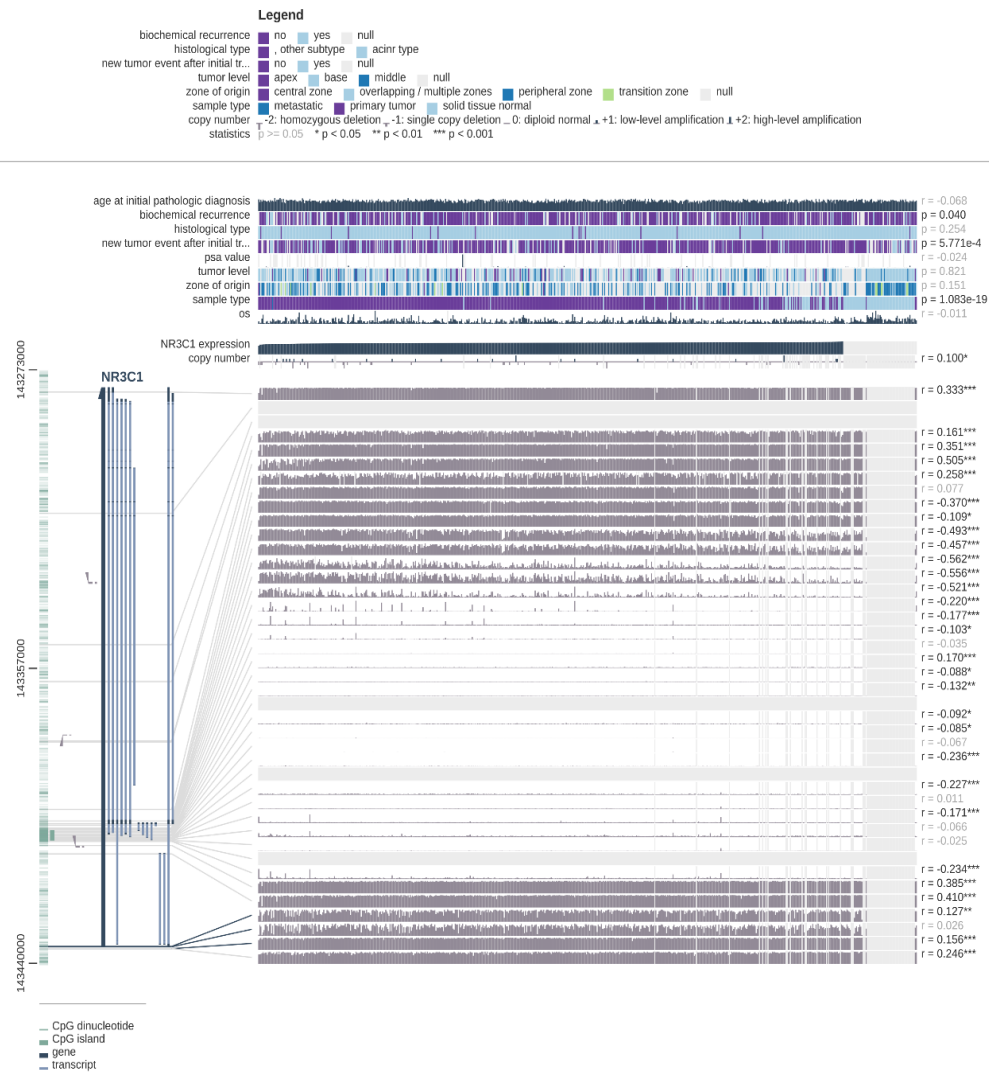


Figure 3-Methylation analysis of MPZ gene in prostate adenocarcinoma. The highlighted probes are promoter gene region.

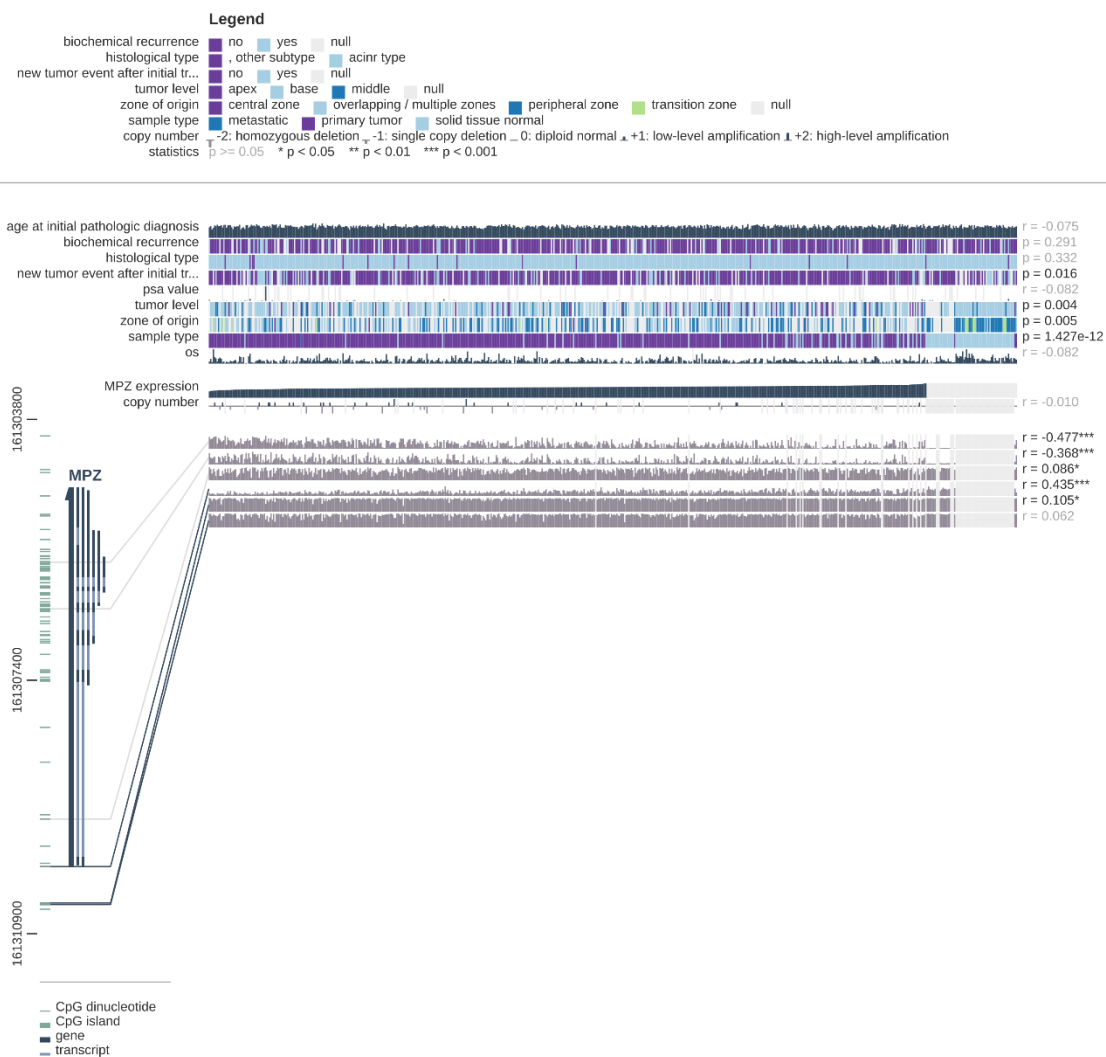


Figure 4- Methylation analysis of NR3C1 gene in prostate. The highlighted probes are promoter gene region.

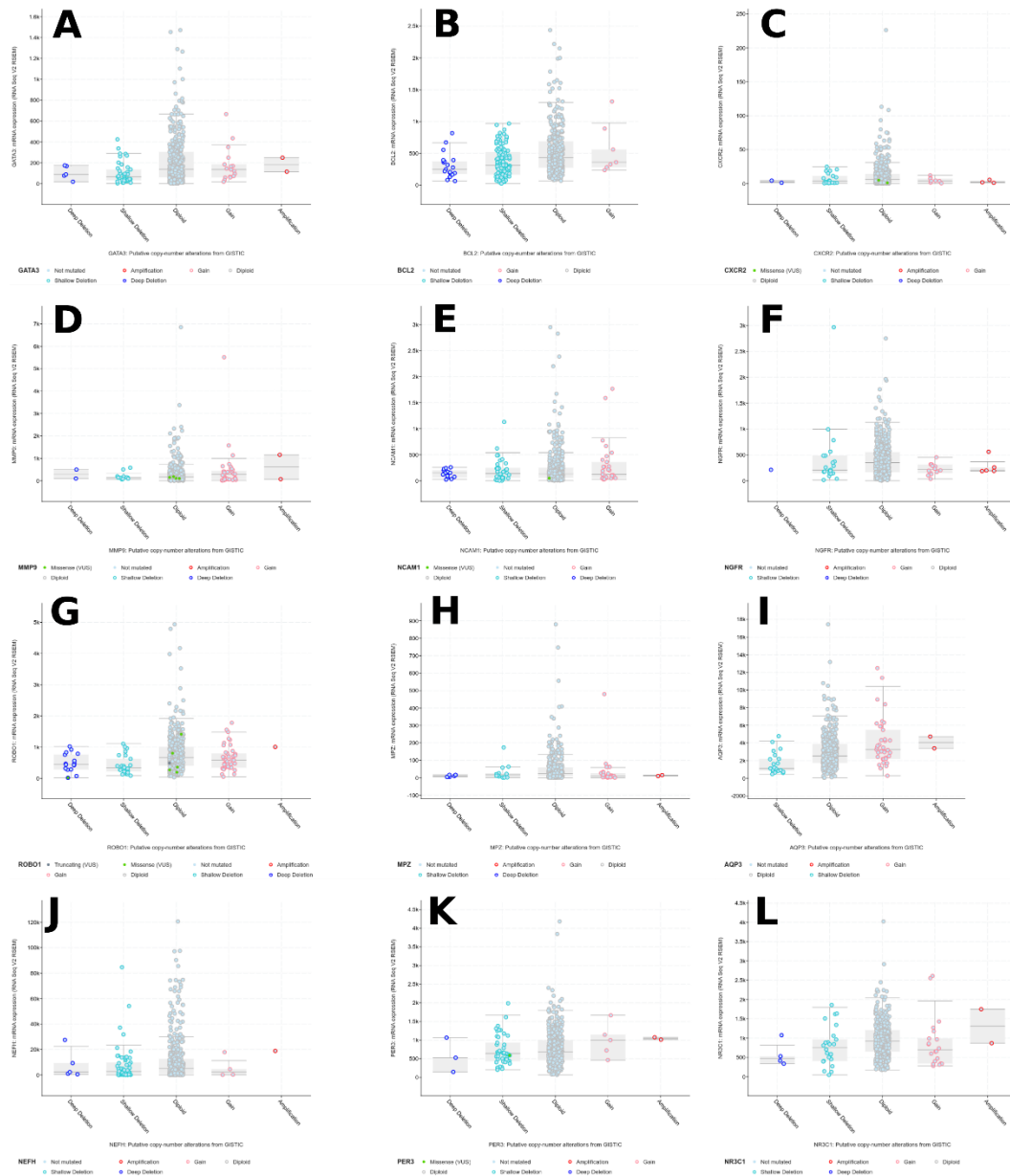


Figure 5- Copy number alteration and mRNA expression analysis of GATA3 (A), BCL2 (B), CXCR2 (C), MMP9 (D), NCAM1 (E), NGFR (F), ROBO1 (G), MPZ (H), AQP3 (I), NEFH (J), PER3 (K) and NR3C1 (L) genes in prostate adenocarcinoma.

Correlation and Prognostic analyses

In order to analyze the pathway by which Schwann cells induce neoplastic and their own cell proliferation and migration, we evaluated the expression of AKT (PRAS40_pT246, AKT_pT308 and AKT_pS473) and MAPK (MAPK_pT202Y204) proteins. We observed a positive correlation between AKT and MAPK protein phosphorylation (data not shown). TIMER gene module analysis was performed to select and visualize the correlation of gene expression levels. We observed correlation between *ROBO1* and *MPZ*, and *NCAM1* and *NGFR* levels with *AQP3*, *NEFH*, *PER3* and *NR3C1* gene expressions. We observed a positive correlation between all gene expression levels analysis (Supplementary Figure 1-16). Survival analyses showed that Chemical carcinogenesis, Calcium signaling, Oxytocin signaling, Circadian entrainment, Fc gamma R-mediated phagocytosis, Gastric acid secretion and Axon guidance-related genes, *GATA3*, *BCL2*, *CXCR2*, *MMP9*, *NCAM1*, *NGFR*, *ROBO1*, *MPZ*, *AQP3*, *NEFH*, *PER3* and *NR3C1* were not associated with tumor outcomes (Supplementary Figure 17-28).

Discussion

Cells surrounding a tumor form a molecular microenvironment known as stroma. Stroma formation is influenced by tumor cells and, in turn, it influences tumor growth, migration, and invasion [28–31]. Depending on the characteristics of the primary tumor, the stroma, and the intrinsic ability of metastatic tumor cells to adapt to a new location, malignant cells use distinct mechanisms for proliferation, survival, and dissemination. These cells often reactivate the expression of genes employed during embryogenesis [30]. In order to leave the primary tumor and disseminate to distant organs, metastatic cells lose the ability to adhere to adjacent cells, enhancing their migratory and invasive capacity. This mechanism is accompanied by several modifications in the expression of genes, such as loss of epithelial receptor expression and increased expression of mesenchymal markers, a phenomenon also known as epithelial-mesenchymal transition [32].

We investigated the association between clock-related genes, Schwann cells and prostate cancer with perineural invasion. Initially, we used the GEO DataSets platform from the GEO repository to identify a database reporting gene expression in Schwann cells in a neoplastic context [23]. Briefly, the database contains the expression results from experiments in which two factors produced by tumor cells were added into cell cultures. Comparisons were made between samples from the first and third passages. We then used these data to perform differential gene expression analysis and crossed data from upregulated genes with differential expression data from negative and positive perineural invasion prostate cancers. After identifying the genes in common, we ran several analysis tools to identify molecular pathways associated to these genes. Interestingly, we noted that the “axon guidance” pathway was active in negative perineural invasion prostate samples. Studies have demonstrated the association between axon guidance in the control of Schwann cell differentiation as well as in neoplastic cell proliferation. Besides, *MPZ* gene is associated with differentiated Schwann cells maintenance and was observed to be upregulated in negative perineural invasion samples.

In these context, it has also been demonstrated that axon guidance pathway is inactivated during Wallerian degeneration of peripheral nerves. Together with macrophages, Schwann cells remove axon and myelin debris, and clear a path for subsequent axonal regrowth and nerve regeneration [26]. Tumor cells benefit from nerve

regeneration machinery to promote cell proliferation, migration, and invasion. It has been reported that Schwann cells are induced to migrate to the region close to the tumor at the beginning of the carcinogenic process. It was also suggested that Schwann cells promote neoplastic invasion by direct contact with cancer cells, since paracrine signaling and matrix remodeling are not yet sufficient to induce the migration process. Cell-cell contact between Schwann cells and tumor tissue is necessary to potentiate the ability of neoplastic cells to penetrate into the underlying tissue [9,33,34]. After contact, the degradation of the extracellular matrix by Schwann cells provokes the formation of tunnels or bands coated with laminin, due to Schwann cells' capacity to express matrix metalloproteins, especially MMP2 and MMP9. The mechanism of extracellular matrix degradation that promotes neoplastic migration also depends on the production of NCAM1 and N-cadherin (*CDH2*) by Schwann cells [31].

In the present study, we analyzed the expression of genes associated with the hallmark of cancer. The importance of analyzing these genes derives from the hypothesis that there may be a correlation between the presence of Schwann cells and the aggressiveness of the neoplastic cell. Decreased E-cadherin protein expression after contact of Schwann cells with the tumor resembles the mechanism followed by cells during axonal repair process. The loss of E-cadherin during the epithelial-mesenchymal transition in cancer is associated with a positive regulation of *NCAM1* and *CDH2* [31,35–37]. When E-cadherin is suppressed, *NCAM1* and *CDH2* are upregulated; they associate with the p59fyn protein, whose subsequent activation leads to inhibition of focal adhesion and an increase in cell migration. A study using oncogenic *K-RAS* pancreatic cancer cell lines identified increased levels of polysialylated *NCAM1* expression, which interacts with E-cadherin to create steric hindrance of homophilic binding and decrease cell adhesion. In our study, we observed upregulation of *NCAM1* in both negative and positive perineural invasion cancers [38,39].

Differentiation of myelinating Schwann cells may undergo interference from inhibitory pathways that negatively control the expression of genes responsible for myelin sheath formation. NOTCH1 and JUN stand out among the negative regulators of the myelination program, in the same way as SOX-2 and PAX-3 [9,18,34]. The myelinating phenotype also involves the inactivation of a number of genes linked to the production of immature Schwann cell markers. Some transcription factors are responsible for ensuring proper maturation in Schwann cells. SOX-10 acts synergistically with a second factor,

OCT-6, resulting in the expression of *KROX-20*. In turn, *KROX-20* is a key inducer of expression of myelin genes, such as *MBP*, *MPZ* and *PRX* proteins. The maintenance of the myelinating phenotype therefore requires the continuous expression of *KROX-20* and *SOX-10*, considering that inactivation of both proteins results in dedifferentiation of Schwann cells [17,18,40,41].

Previous studies have shown that Schwann cells induce cellular aggressiveness in prostate cancer. During dedifferentiation, Schwann cells express proteins initially lost during the myelination process. Among these proteins are *GAP43*, *NCAM1*, *P75^{ntr}* (*NGFR*), *GFAP* and *SOX-2* [10,19]. Data from our study showed that *Ngfr1* gene expression is increased in both negative and positive perineural invasion prostate cancers. It is likely that Schwann cells in these tissues are dedifferentiated, aiding tumors in their mechanisms of cell proliferation, migration, and tissue invasion.

During the process of carcinogenesis, there is an inactivation of the *SLIT2*, *ROBO1* and *Robo2* genes, being therefore considered as tumor suppressor genes [42,43]. Both genes are extremely important during the process of nerve formation and repair. Both *SLIT2*, *ROBO1* and *ROBO2* proteins have been reported to inhibit migration of Schwann cells [44–46]. In the present study, we observed that *ROBO1* mRNAs are increased in perineural invasion negative prostate cancer samples when compared to normal tissue.

Since circadian entertainment is an upregulated pathway in positive perineural prostate tumors, we associated DEGs to clock-related gene list. *PER3*, *NR3C1*, *PPARGC1A*, *TIMP3*, *ID2*, *PDE6B*, *SLC25A10* and *CAVIN1* were upregulated in negative perineural tumors. We also observed upregulated genes in positive perineural invasion: *PPARGC1A*, *TIMP3*, *S100A8*, *ID2*, *DEFB1*, *AQP3*, *ASS1*, *PDE6B*, *NEFH* and *CAVIN1*. *AQP3* and *NEFH* (oncogenic clock-related genes) were upregulated only in positive perineural invasion tumors and *PER3*, *SLC25A10* and *NR3C1* (tumor suppressor clock-related genes) were upregulated only in negative perineural invasion samples. Previous studies has observed circadian rhythm [47] and melatonin [48] are associated with nerve regeneration. Previous studies has observed that melatonin, an important mediator of circadian rhythm, is involved in the dedifferentiation and increase proliferation of Schwann cells. Although, the mechanism is not fully understood, it has been demonstrated that *Ras/Raf/ERK*, *MAPK* and *GDNF/PKC* pathways can be activated

through MIT1/MIT2 receptors. Whereas the melatonin increases Schwann cell proliferation, the interaction of these cells with cancer cells will contribute to perineural invasion and worse prognosis for prostate cancer³⁶. We also observed correlation between AKT and MAPK phosphorylation in PRAD cancer. Based on these findings, we believe that Circadian rhythm and/or melatonin disruption could be associated with Schwann cells dedifferentiation, leading to a perineural invasion in prostate cancer.

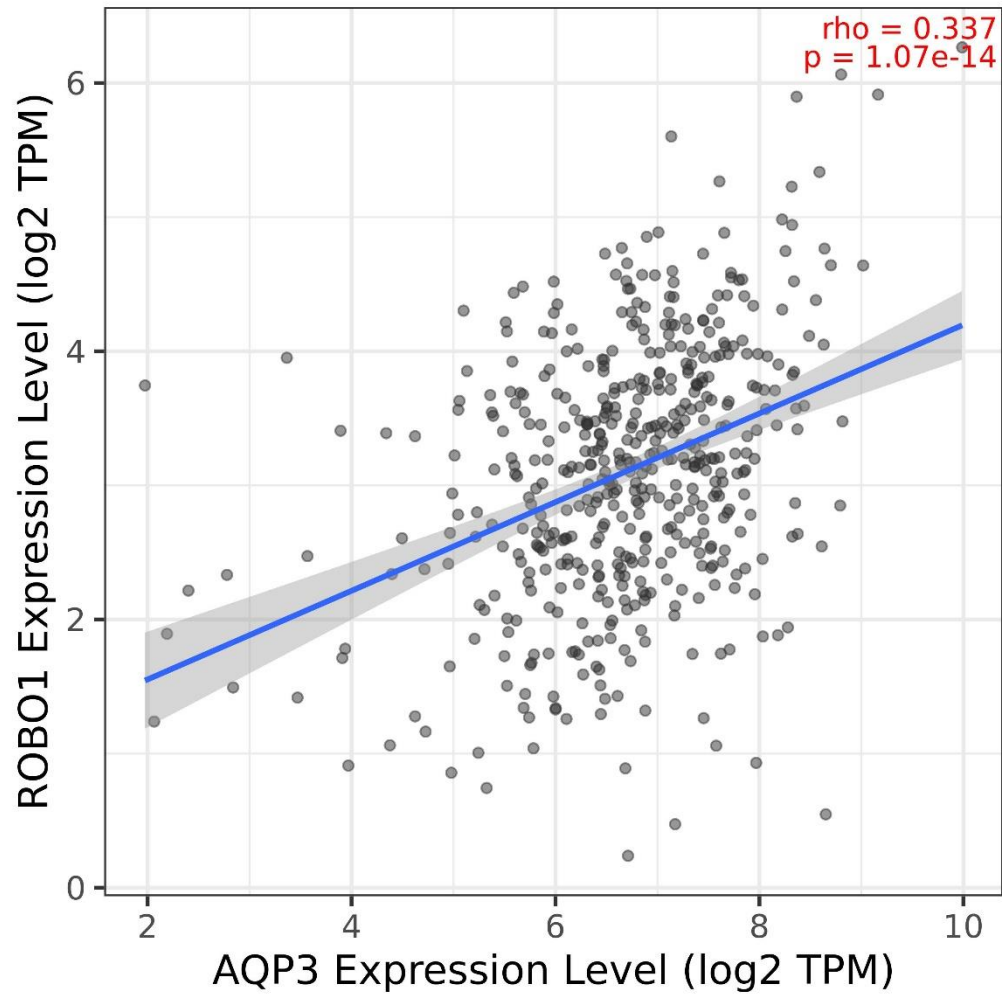
In summary, we observed that the “axon guidance” pathway was upregulated in negative perineural invasion prostate cancers. Meanwhile, upregulated mRNAs activate the “axon guidance” and, together with *ROBO1* and *MPZ* upregulation, inhibits perineural invasion pathways. Both genes are also associated with Schwann cells migration inhibition. Besides, clock-related genes were deregulated in perineural invasion patients with prostate cancer. We believe that Schwann cells’ dedifferentiation and proliferation are induced by circadian entertainment disruption; consequently, Schwann cells produce different factors that will participate in several processes of tumor progression. These processes may also be involved in tumor invasion into the perineural tissue in prostate cancer.

Competing interests

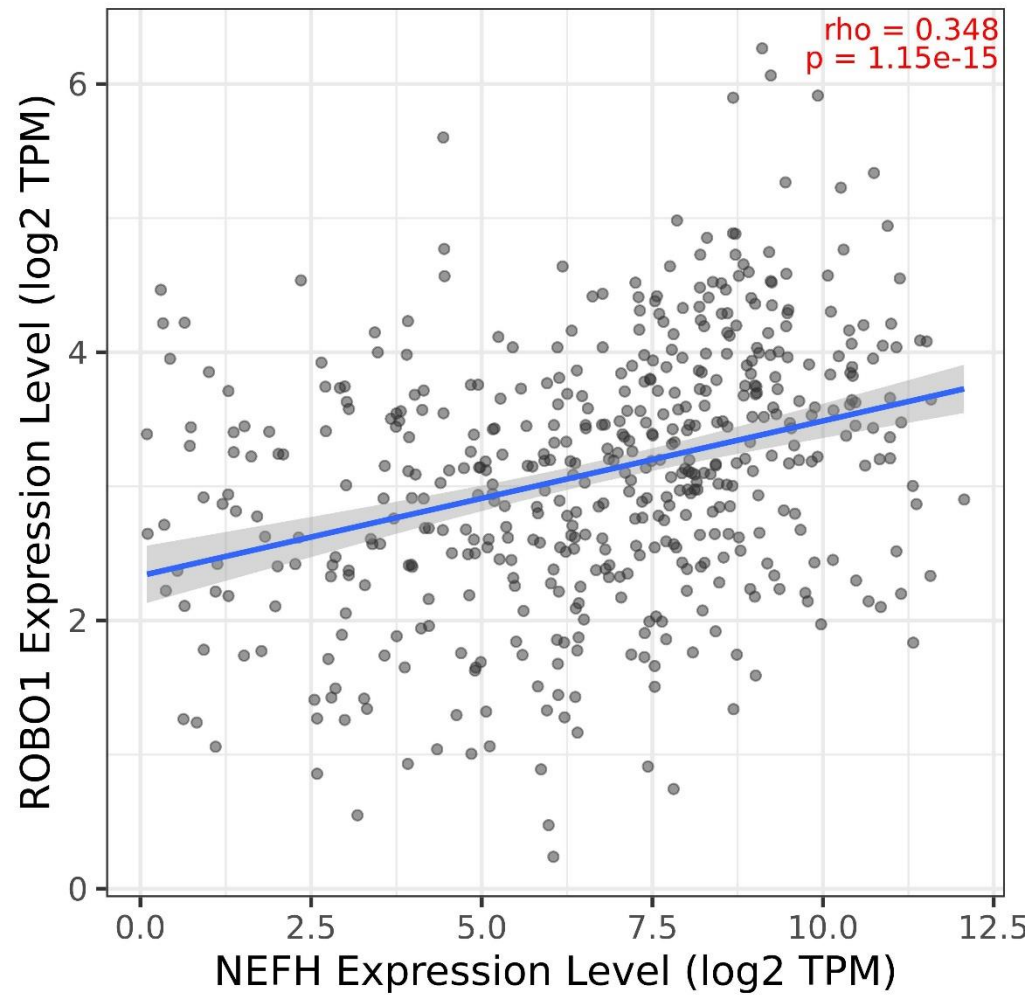
The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

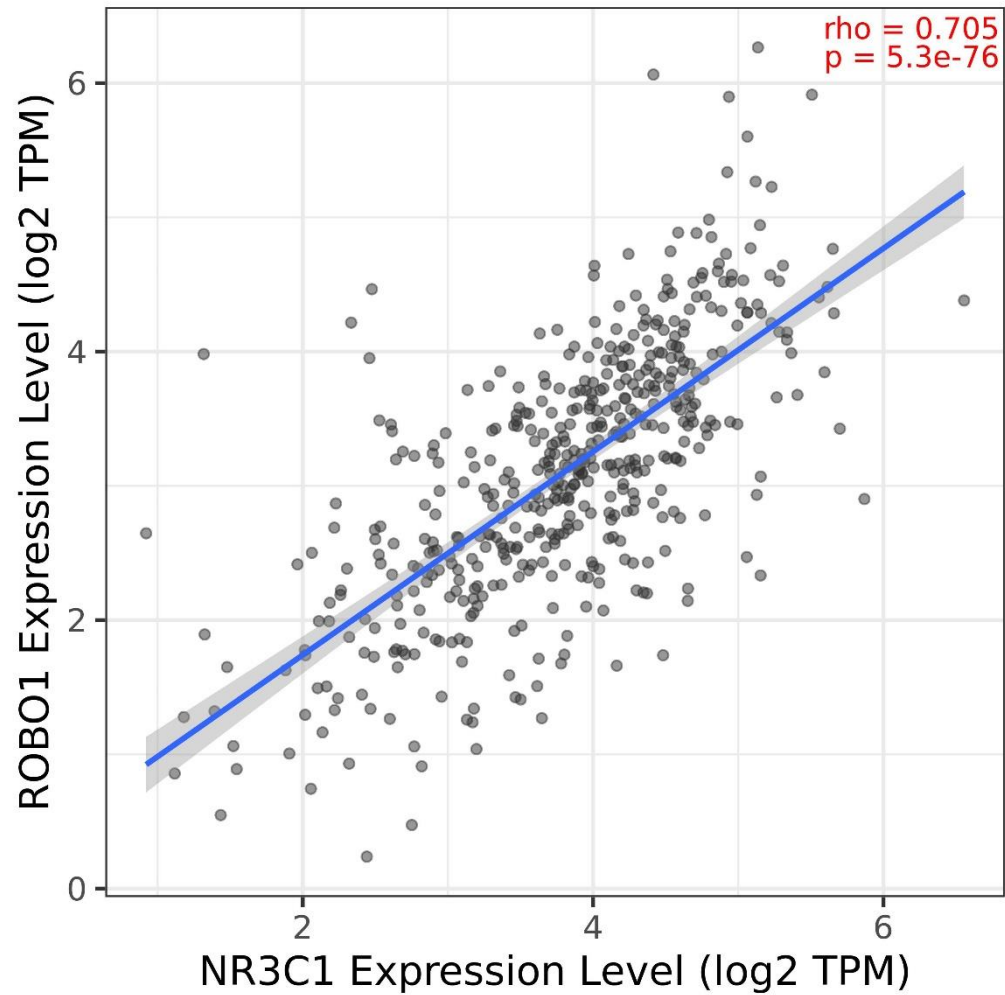
Not applicable.



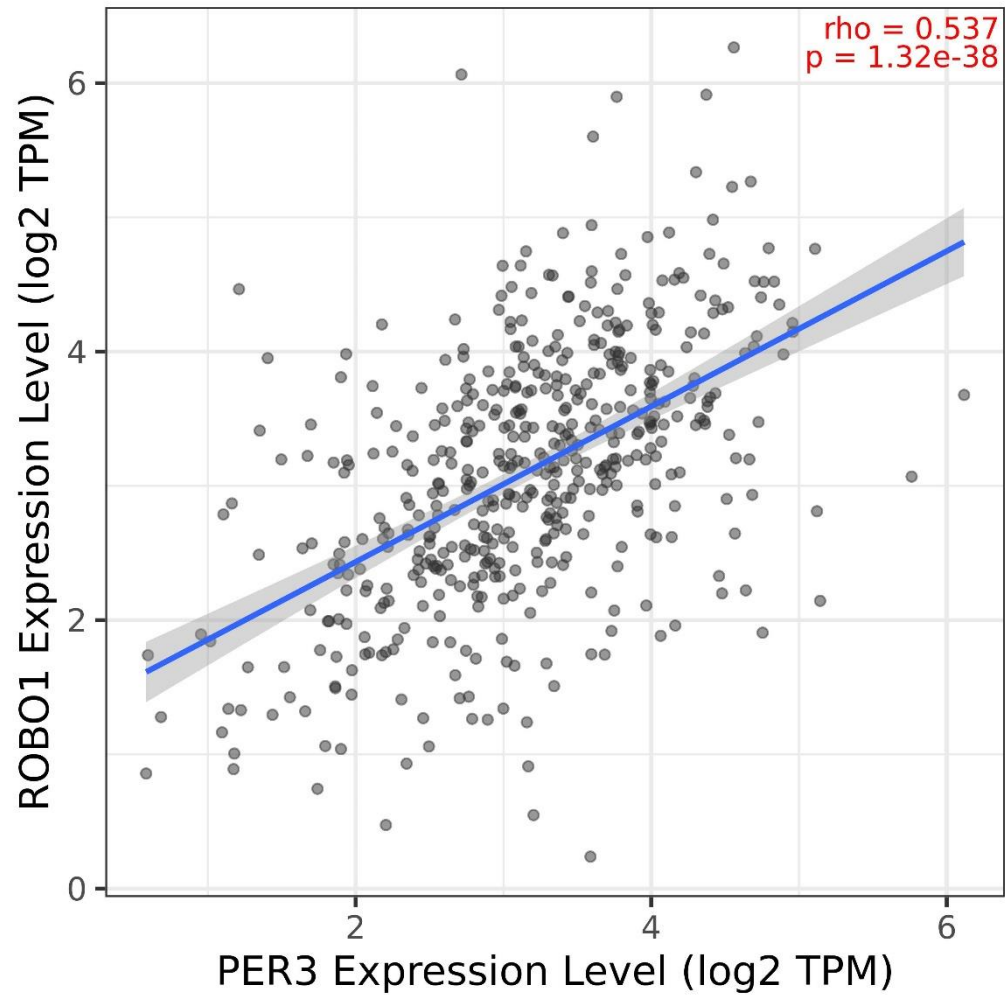
Supplementary Figure 1- Correlation between ROBO1 and AQP3 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



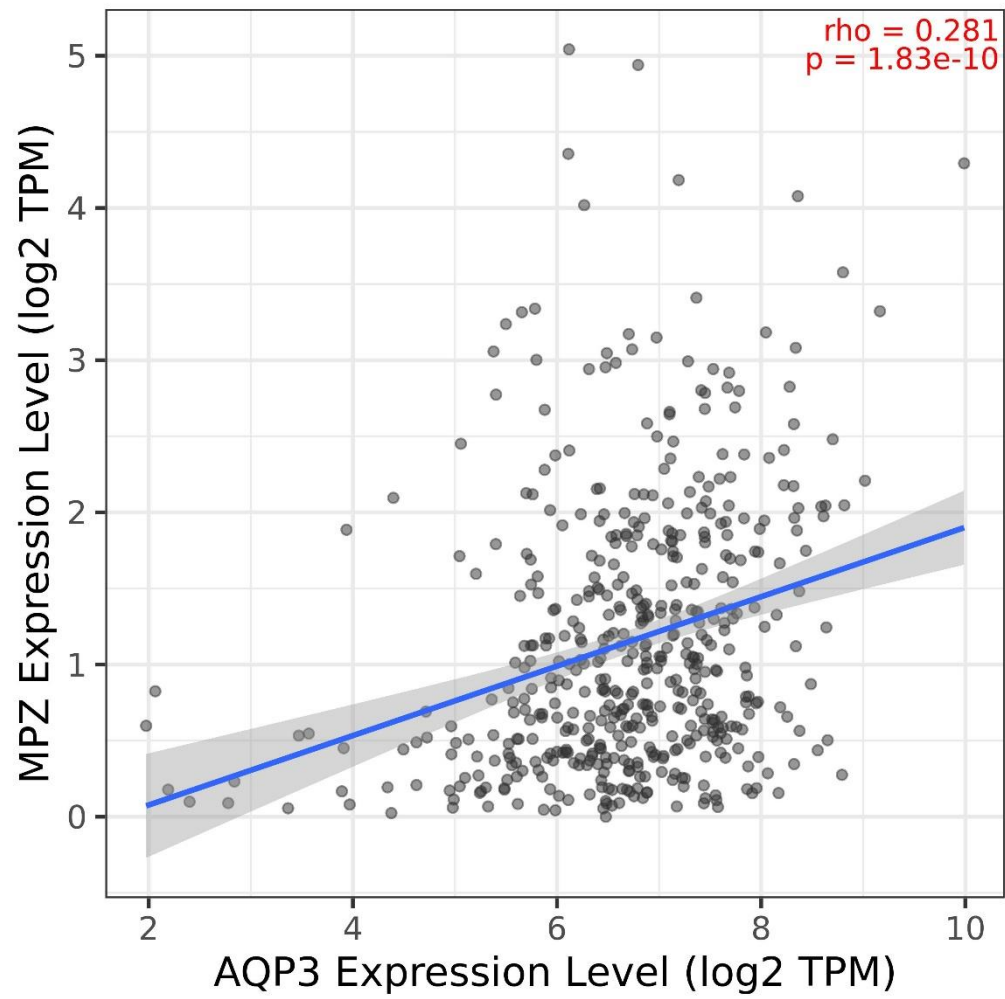
Supplementary Figure 2- Correlation between *ROBO1* and *NGFR* in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



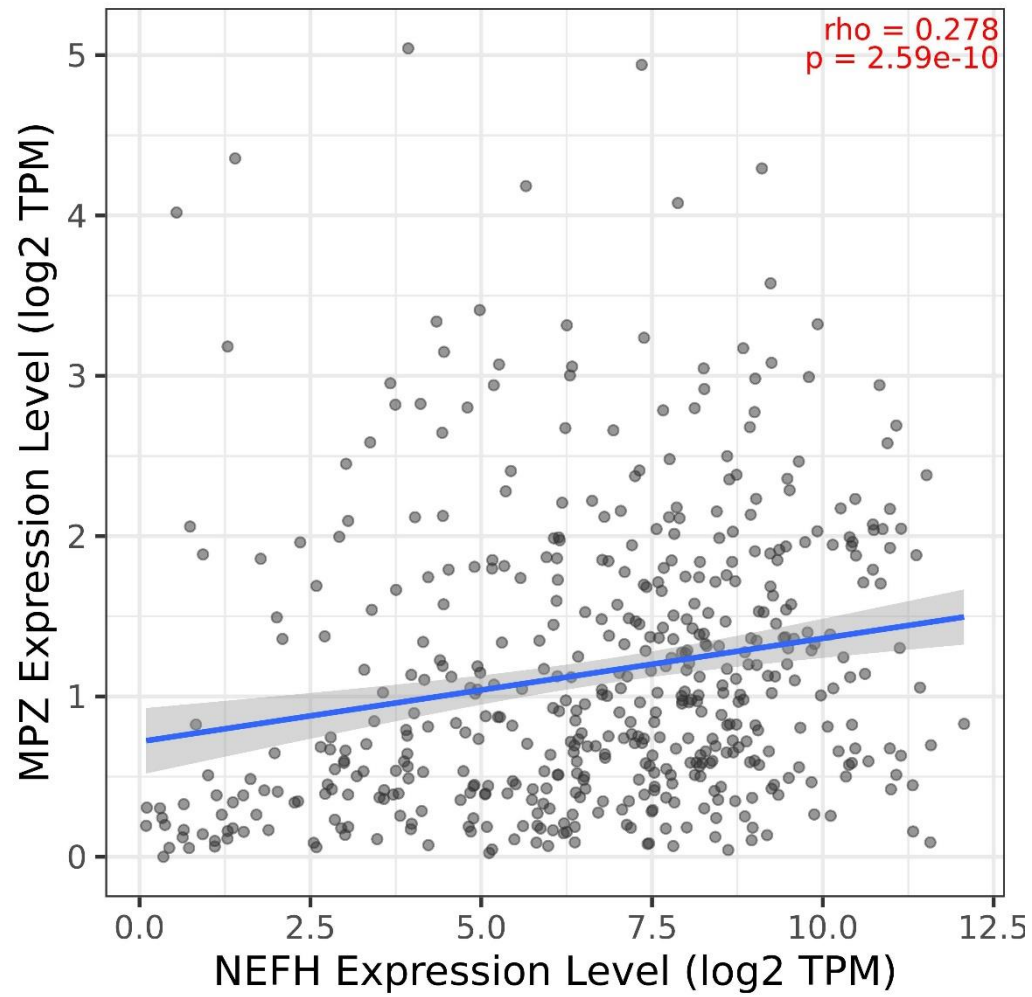
Supplementary Figure 3- Correlation between ROBO1 and NR3C1 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



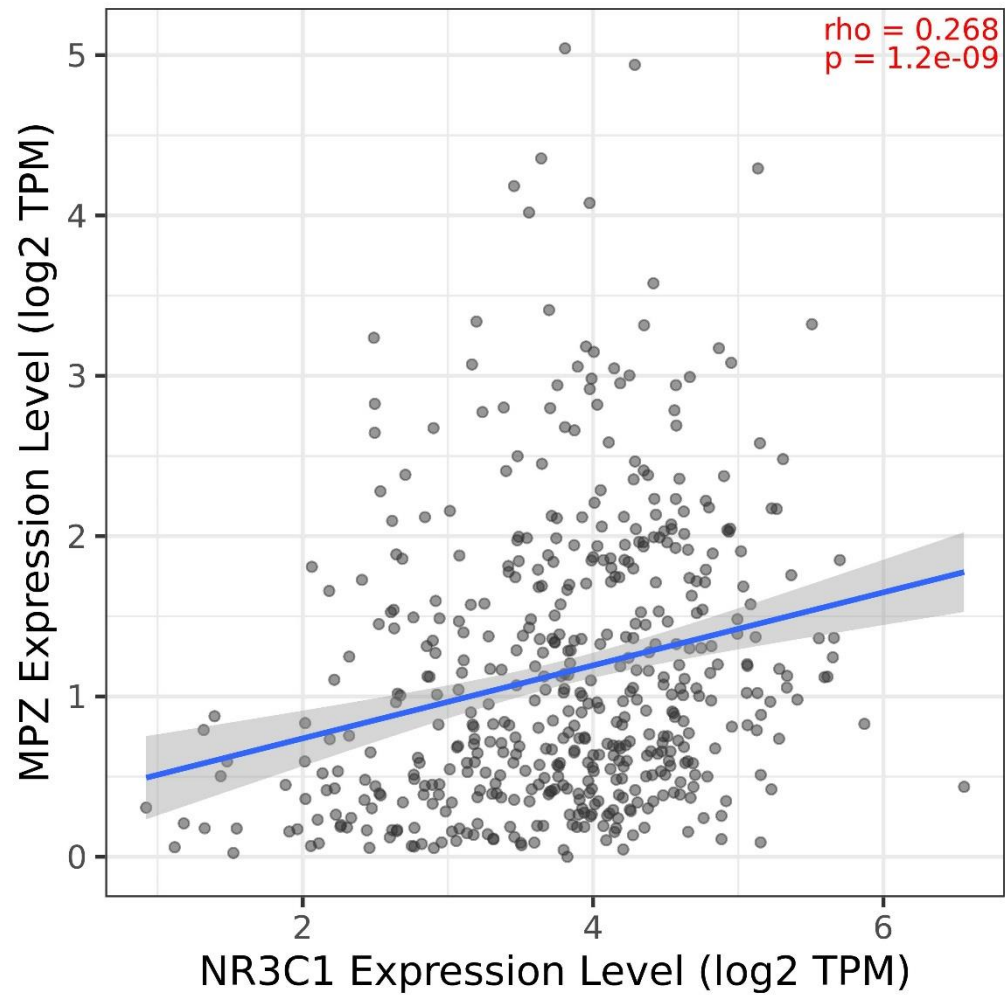
Supplementary Figure 4- Correlation between ROBO1 and PER3 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



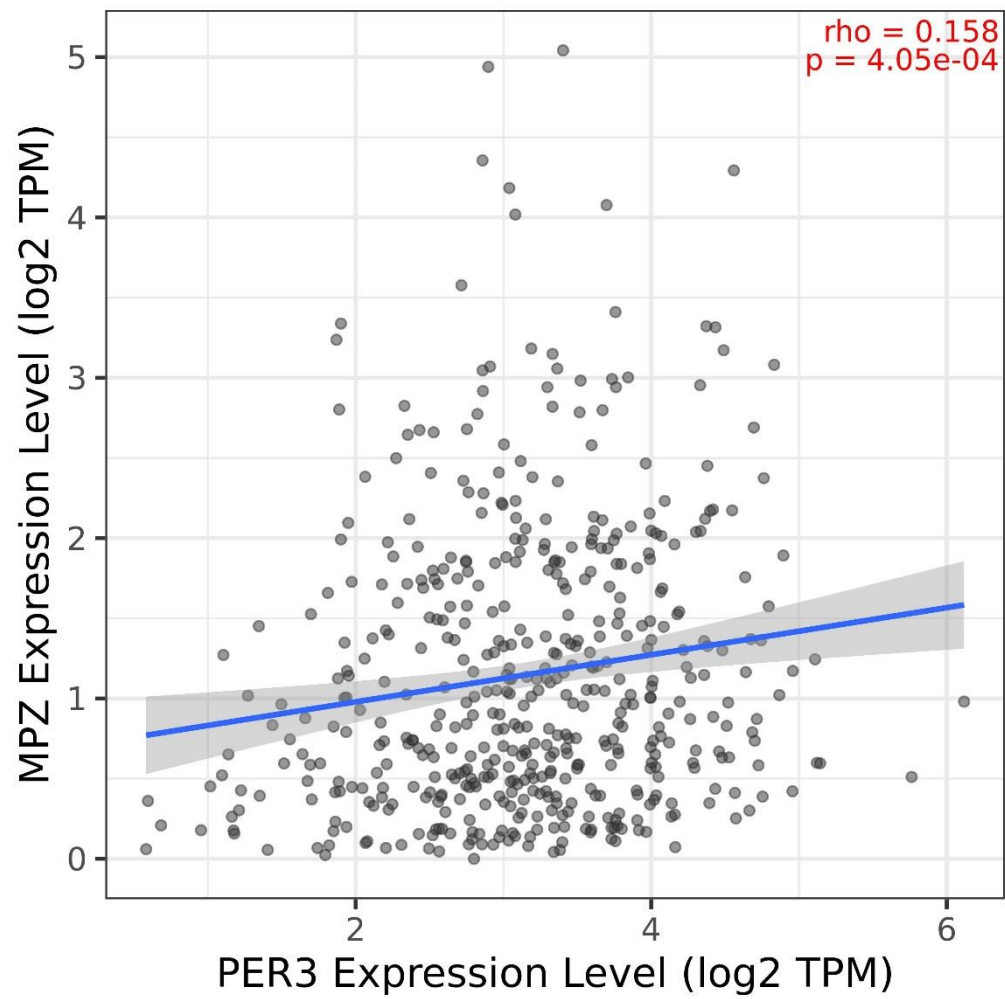
Supplementary Figure 5- Correlation between MPZ and AQP3 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



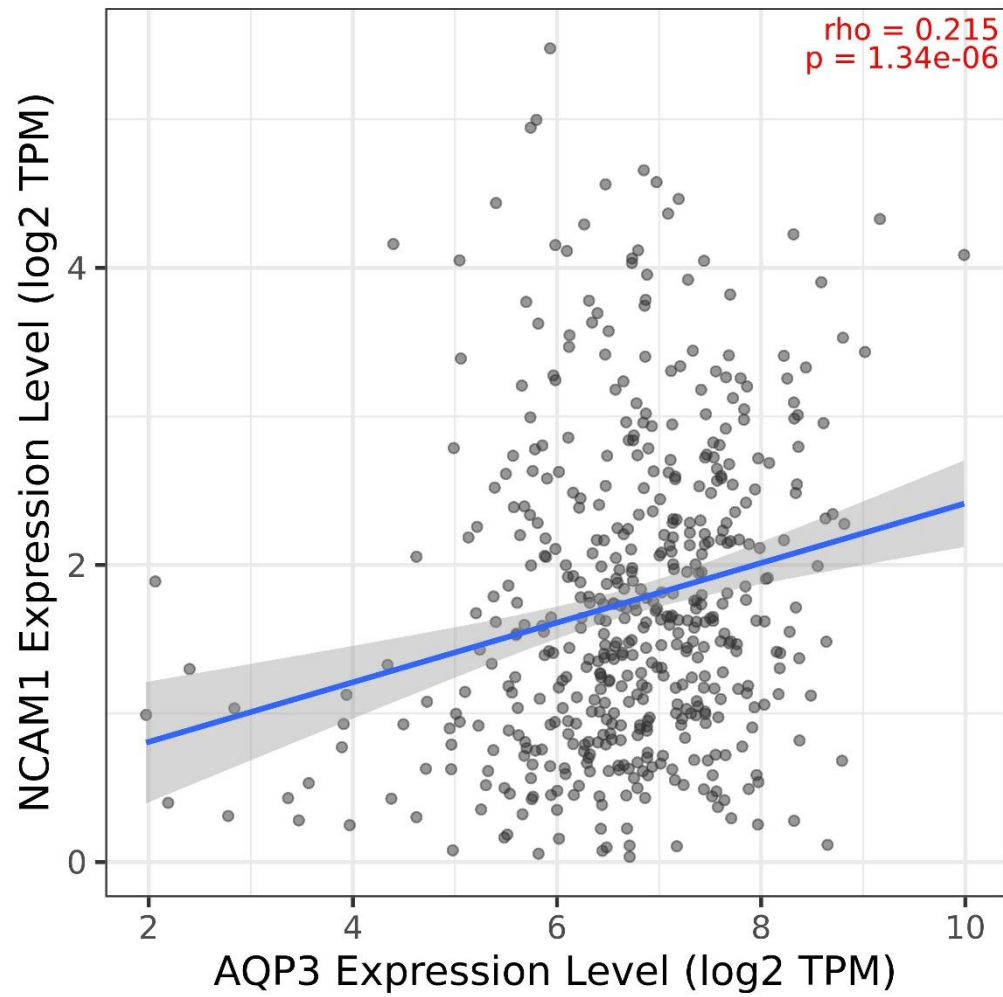
Supplementary Figure 6- Correlation between MPZ and NGFR in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



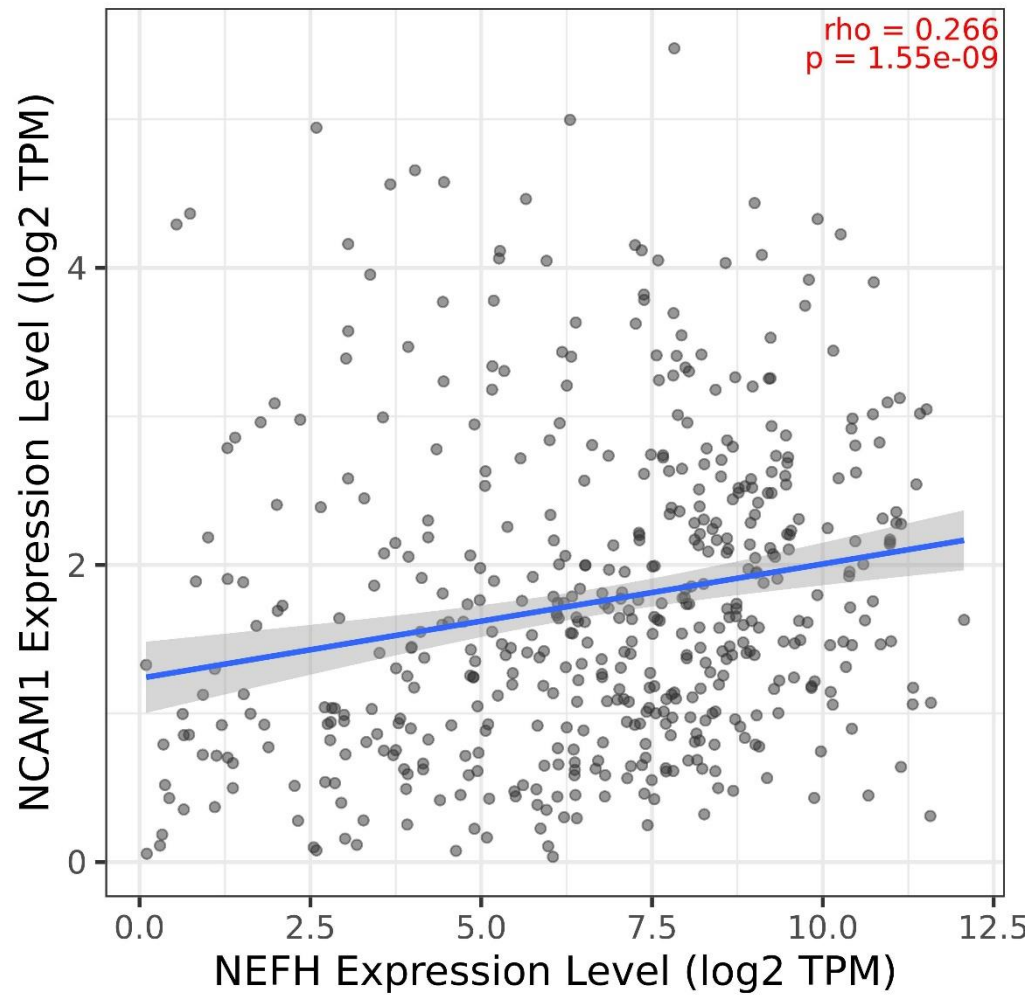
Supplementary Figure 7- Correlation between MPZ and NR3C1 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



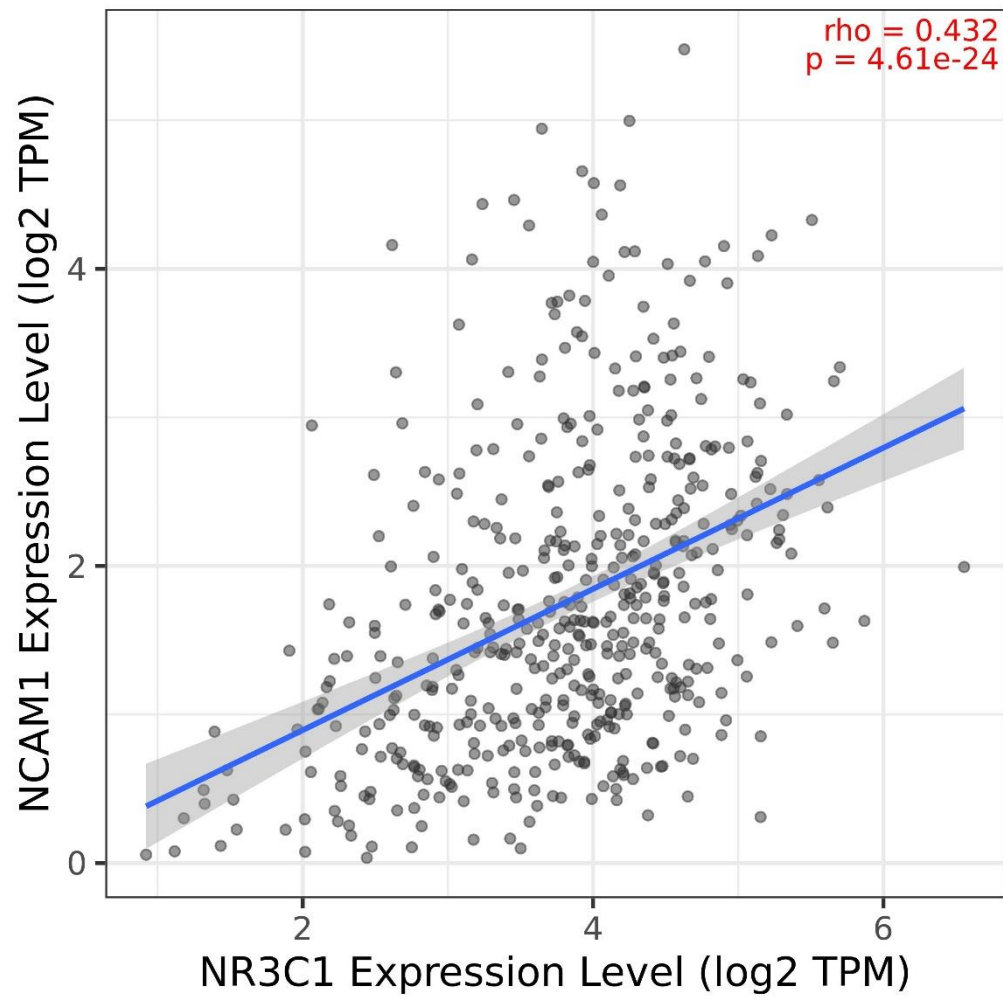
Supplementary Figure 8- Correlation between MPZ and PER3 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



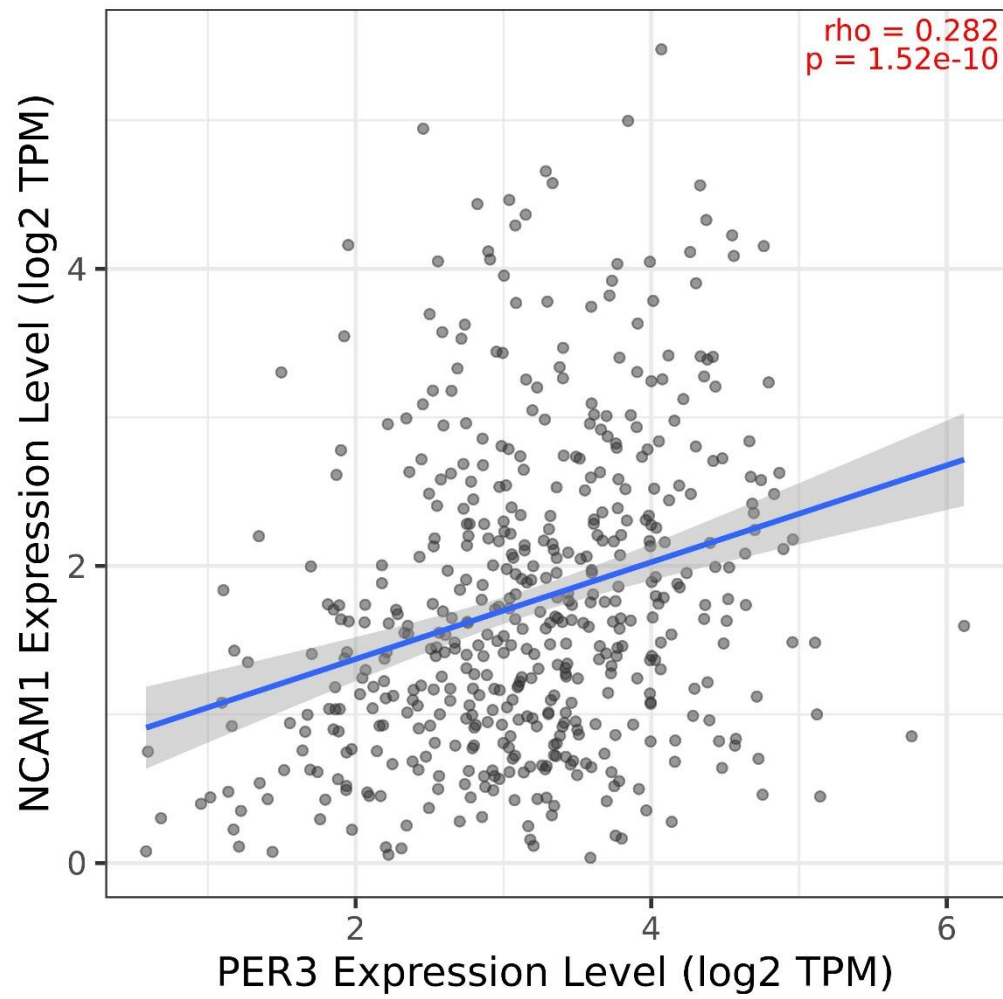
Supplementary Figure 9- Correlation between NCAM1 and AQP3 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



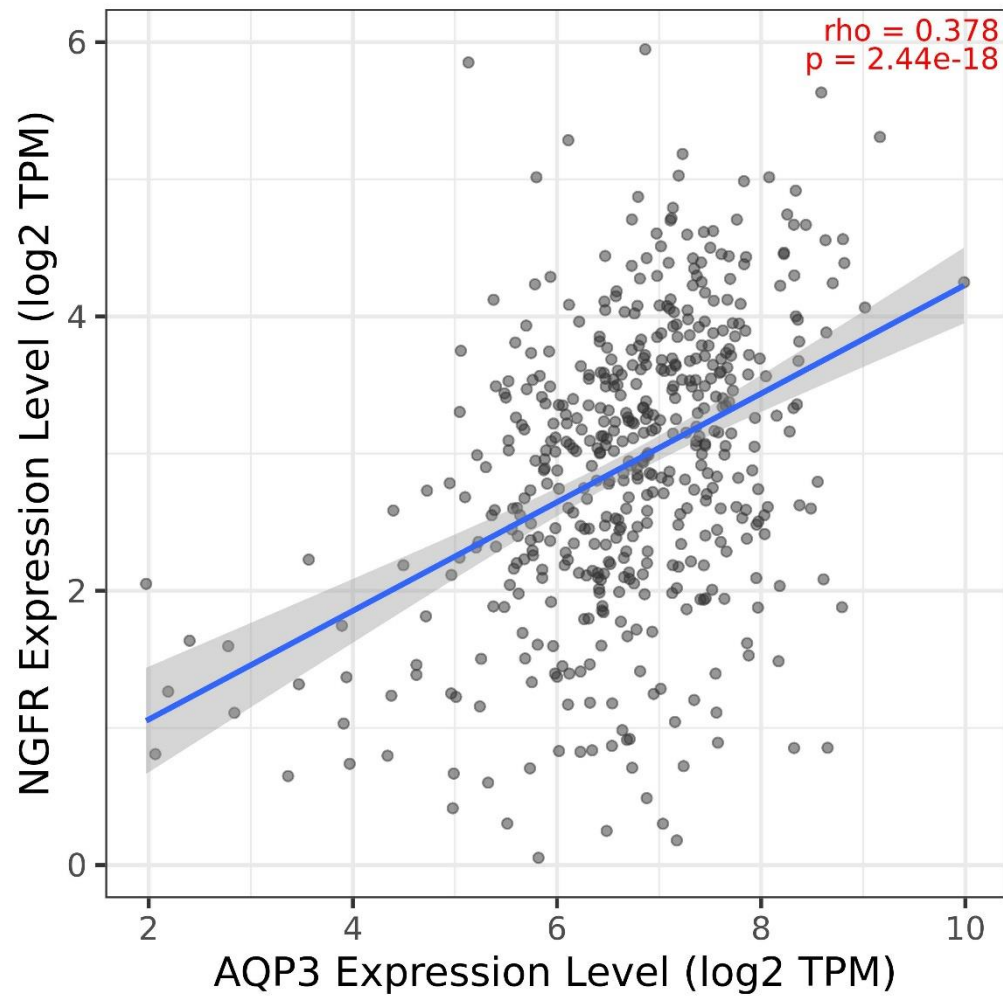
Supplementary Figure 10 - Correlation between NCAM1 and NGFR in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



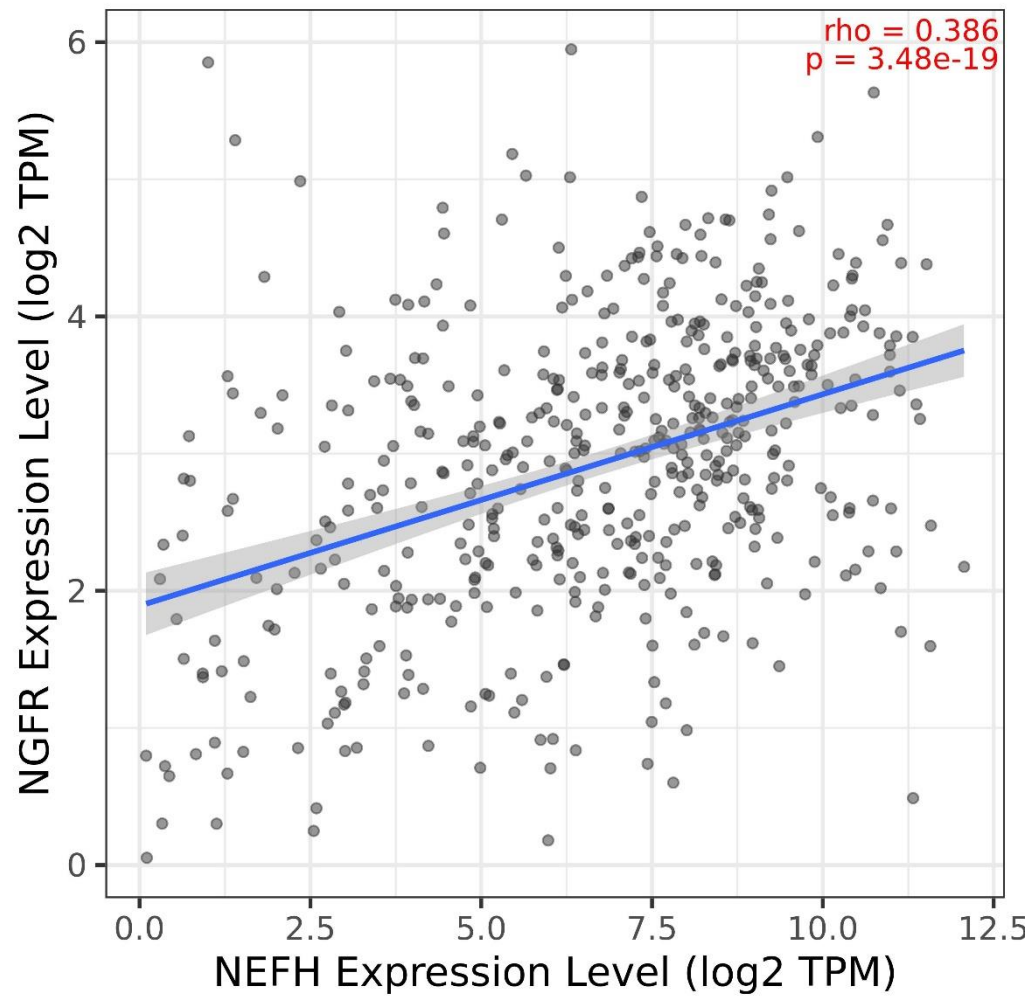
Supplementary Figure 11- Correlation between NCAM1 and NR3C1 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



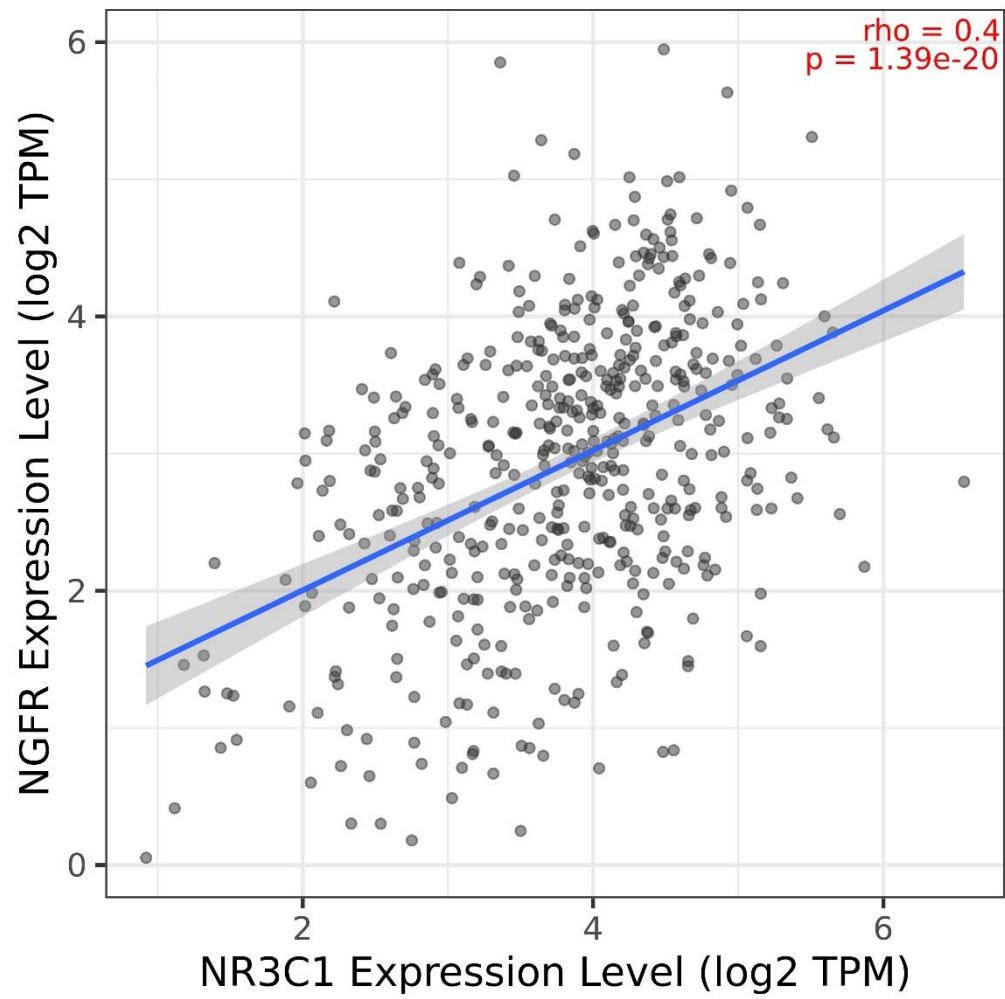
Supplementary Figure 12- Correlation between NCAM1 and PER3 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



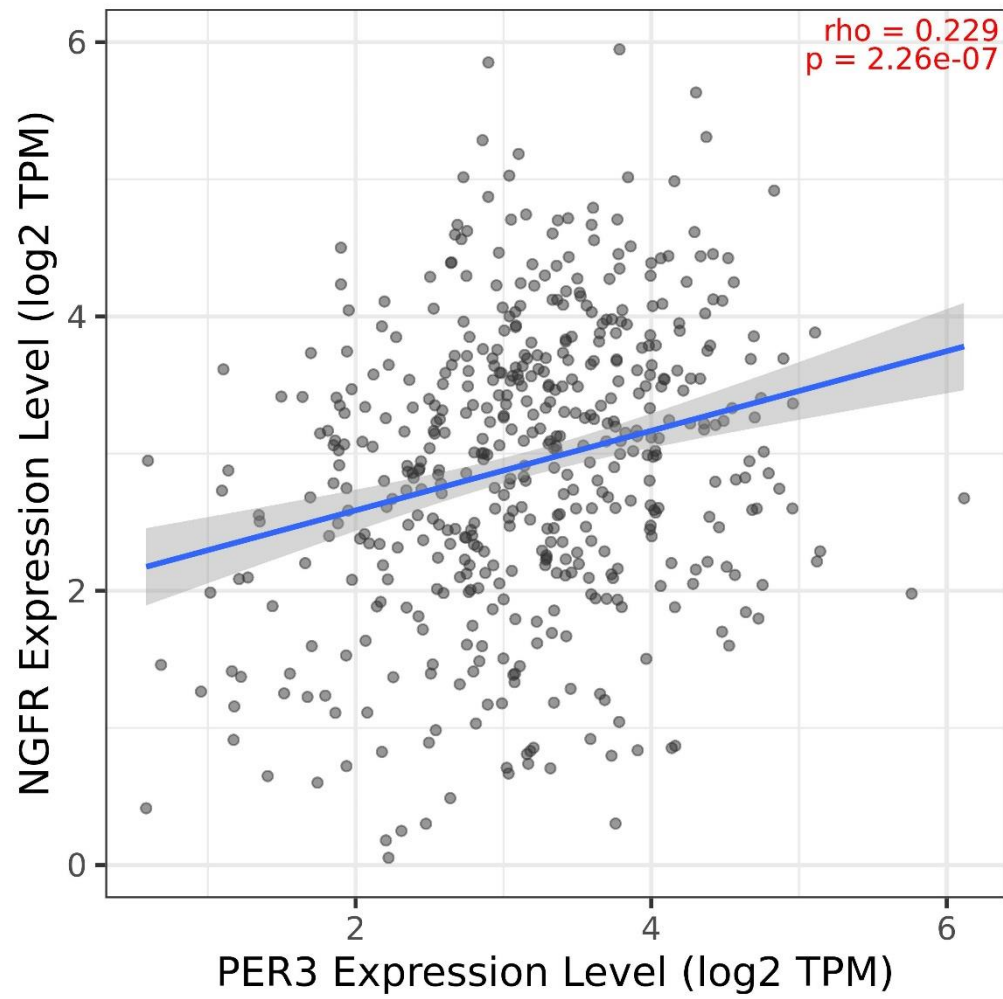
Supplementary Figure 13- Correlation between NGFR and AQP3 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



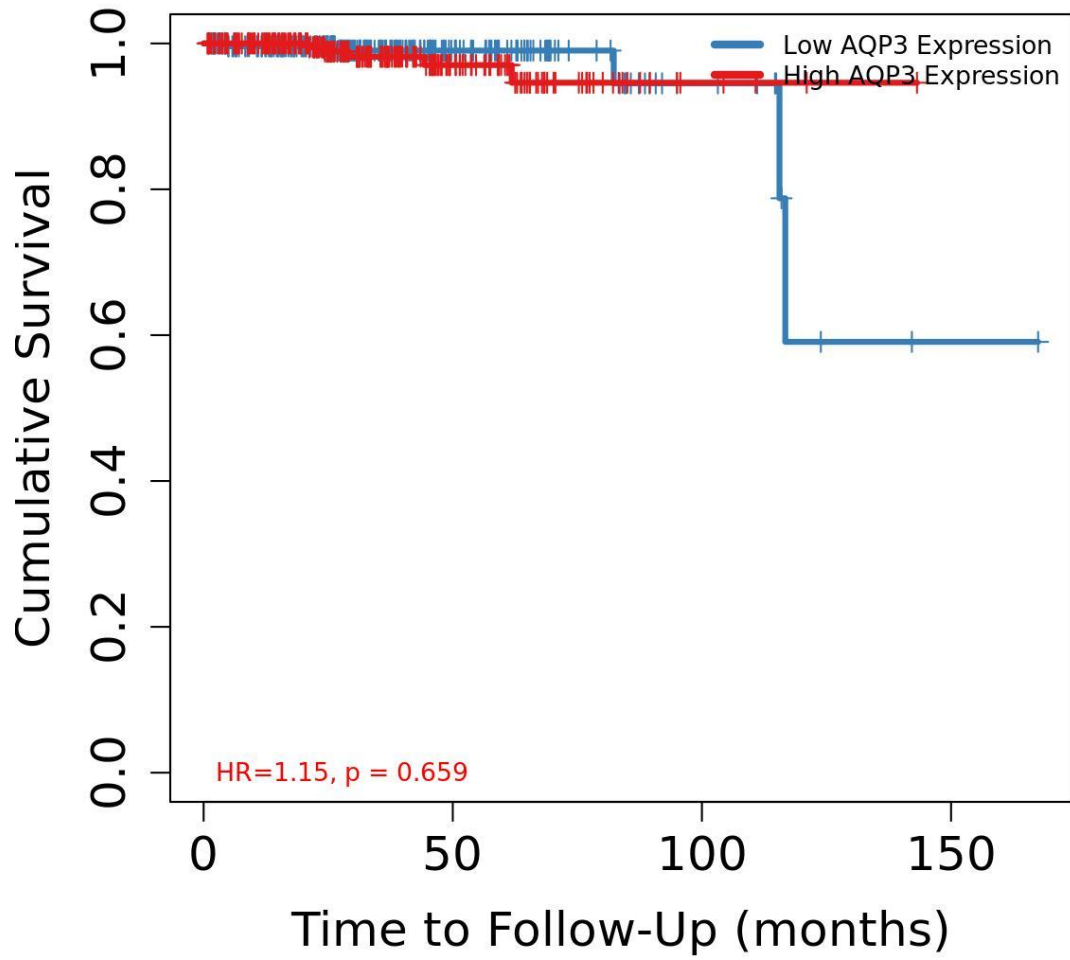
Supplementary Figure 14- Correlation between NGFR and NGFR in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



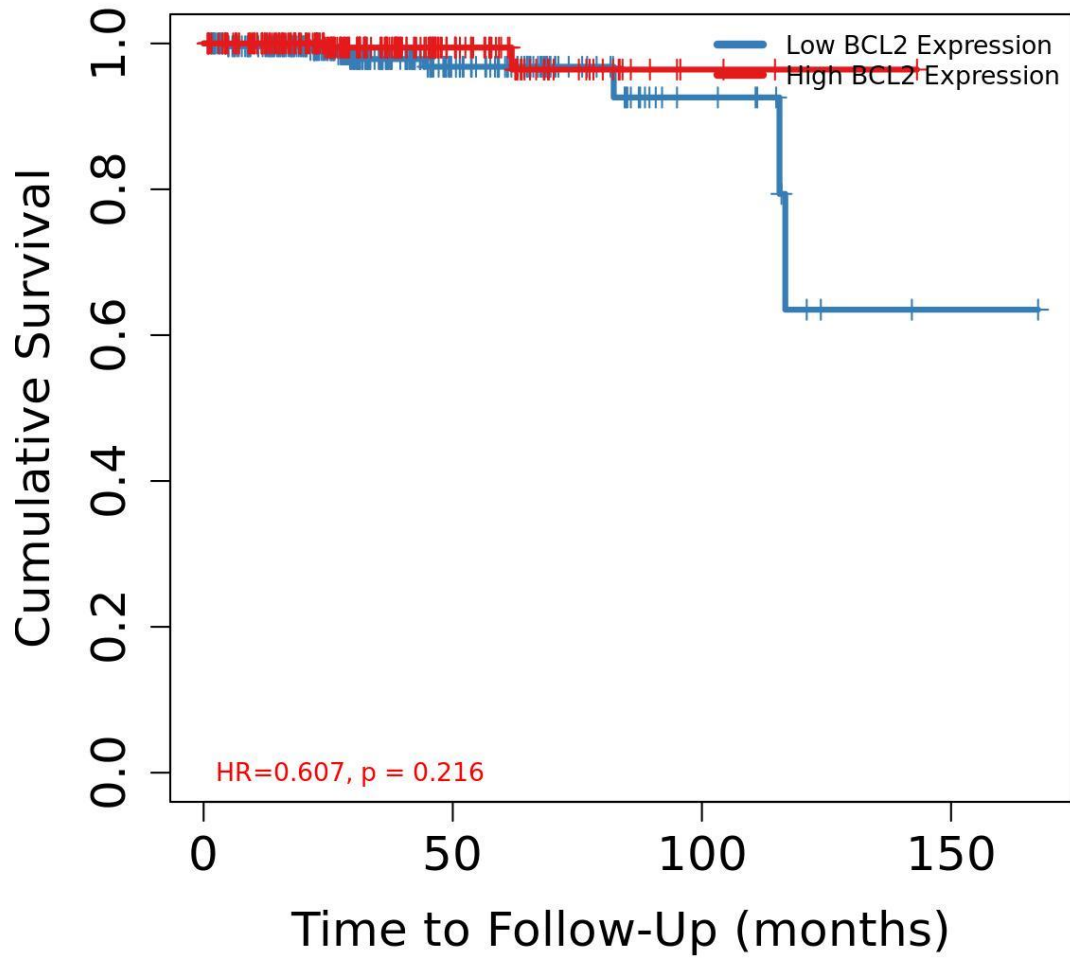
Supplementary Figure 15- Correlation between NGFR and NR3C1 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server.



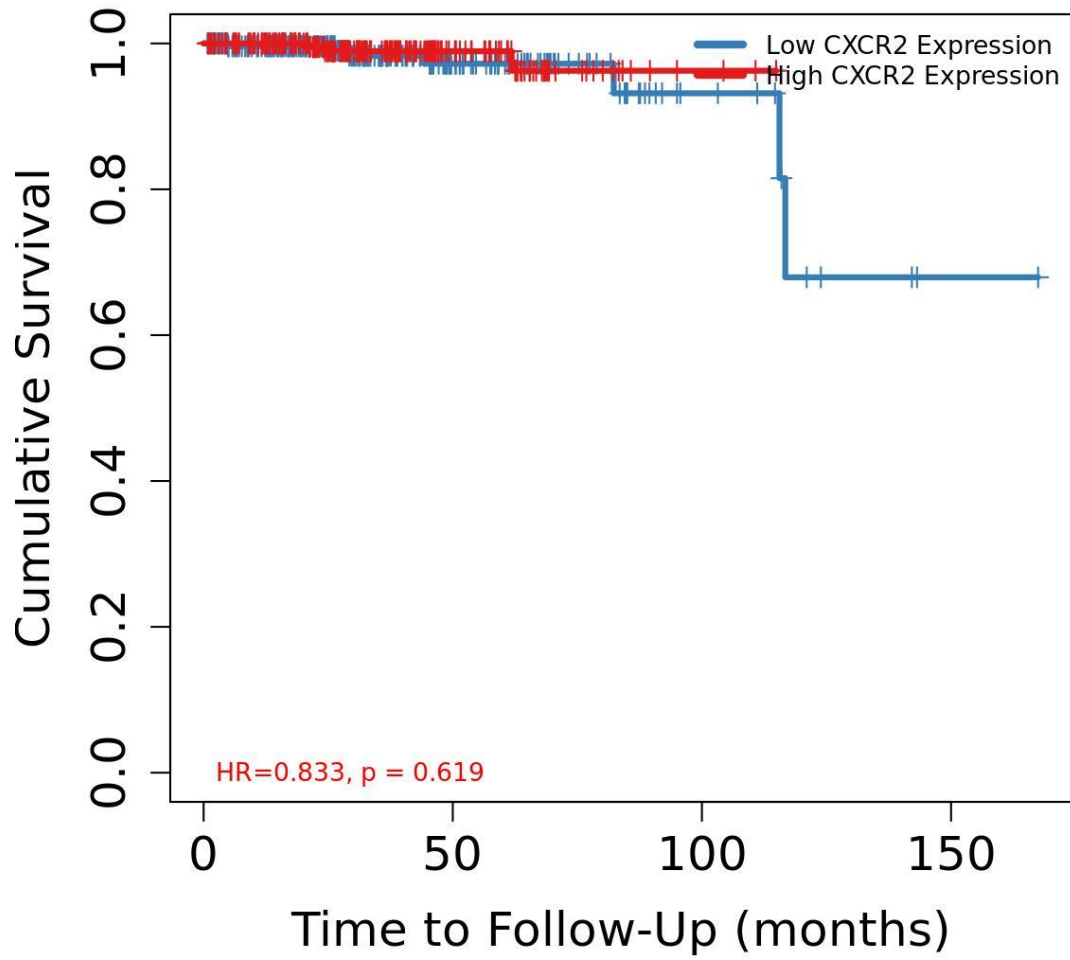
Supplementary Figure 16- Correlation between NGFR and PER3 in Prostate adenocarcinoma (PRAD). Data are extracted from TIMER web server



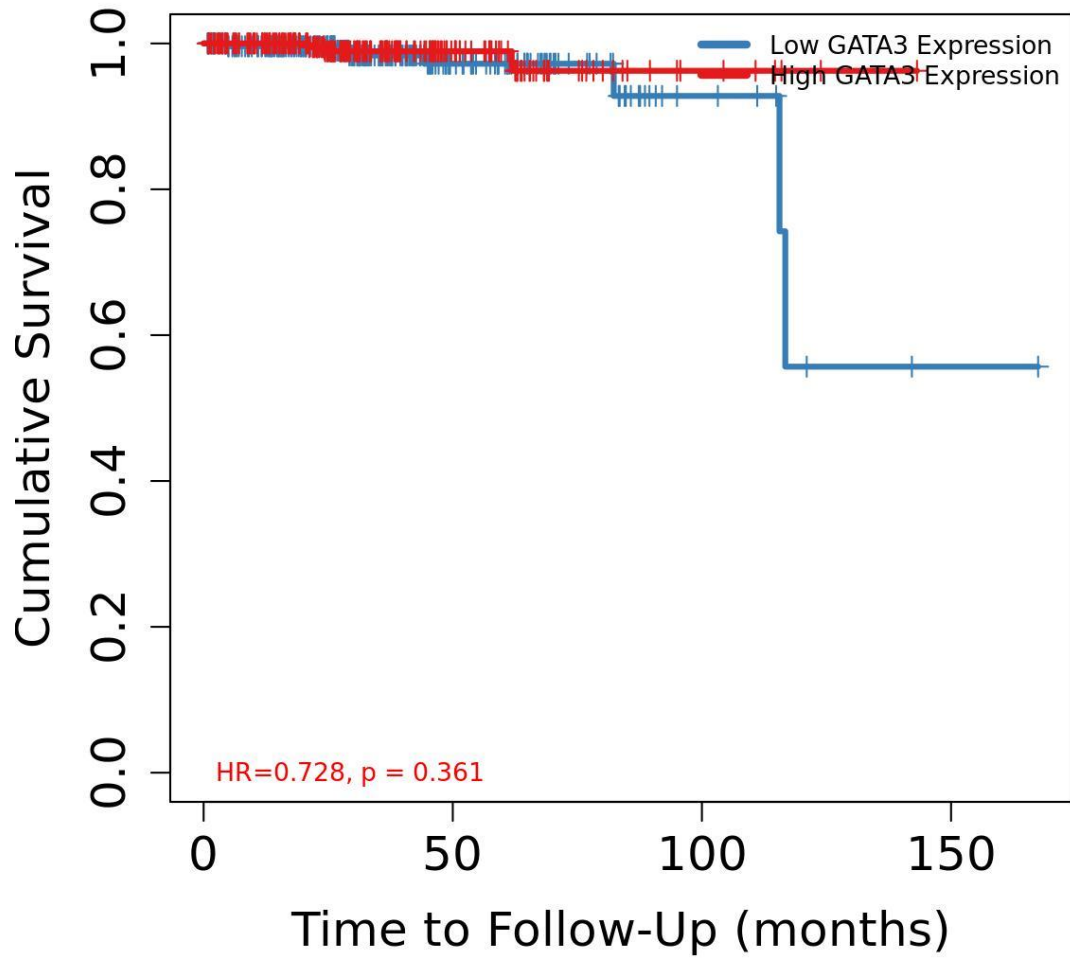
Supplementary Figure 17-TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for AQP3 gene



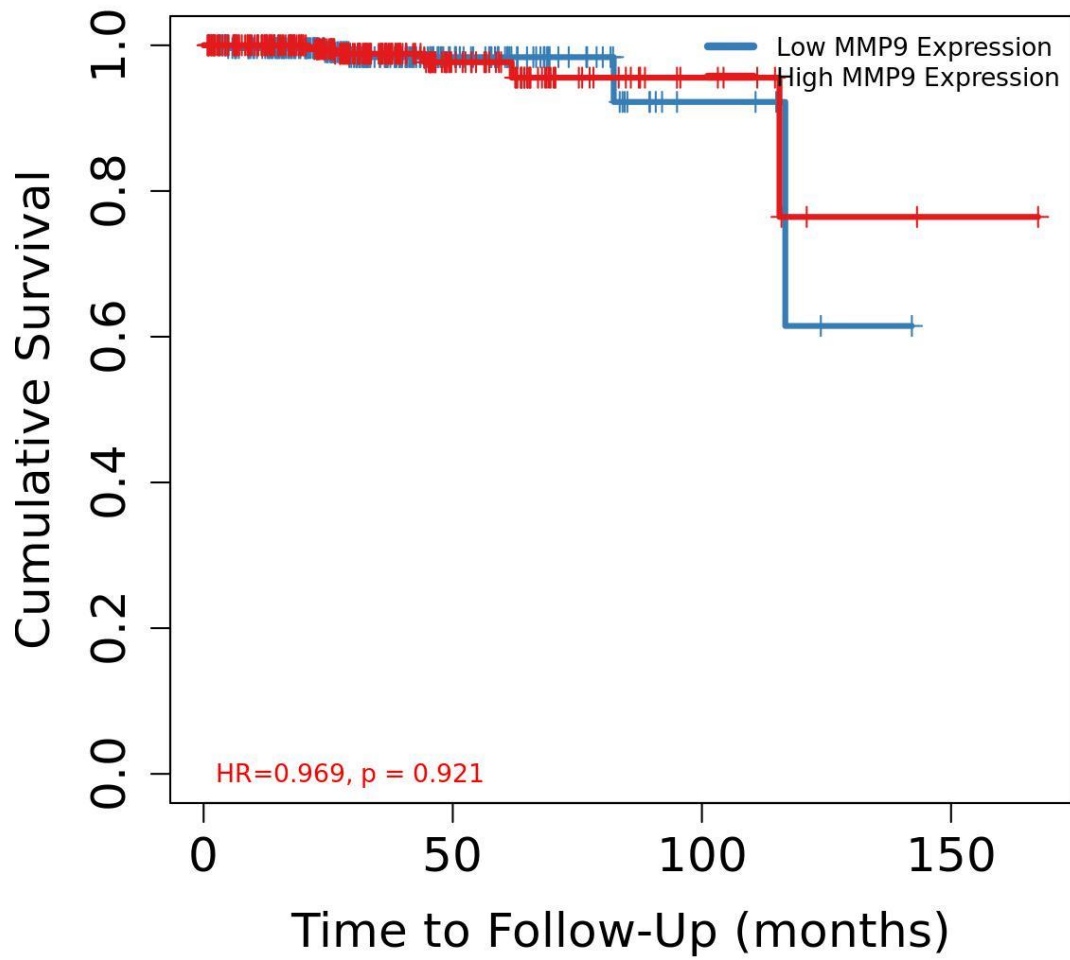
Supplementary Figure 18-TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for BCL2 gene.



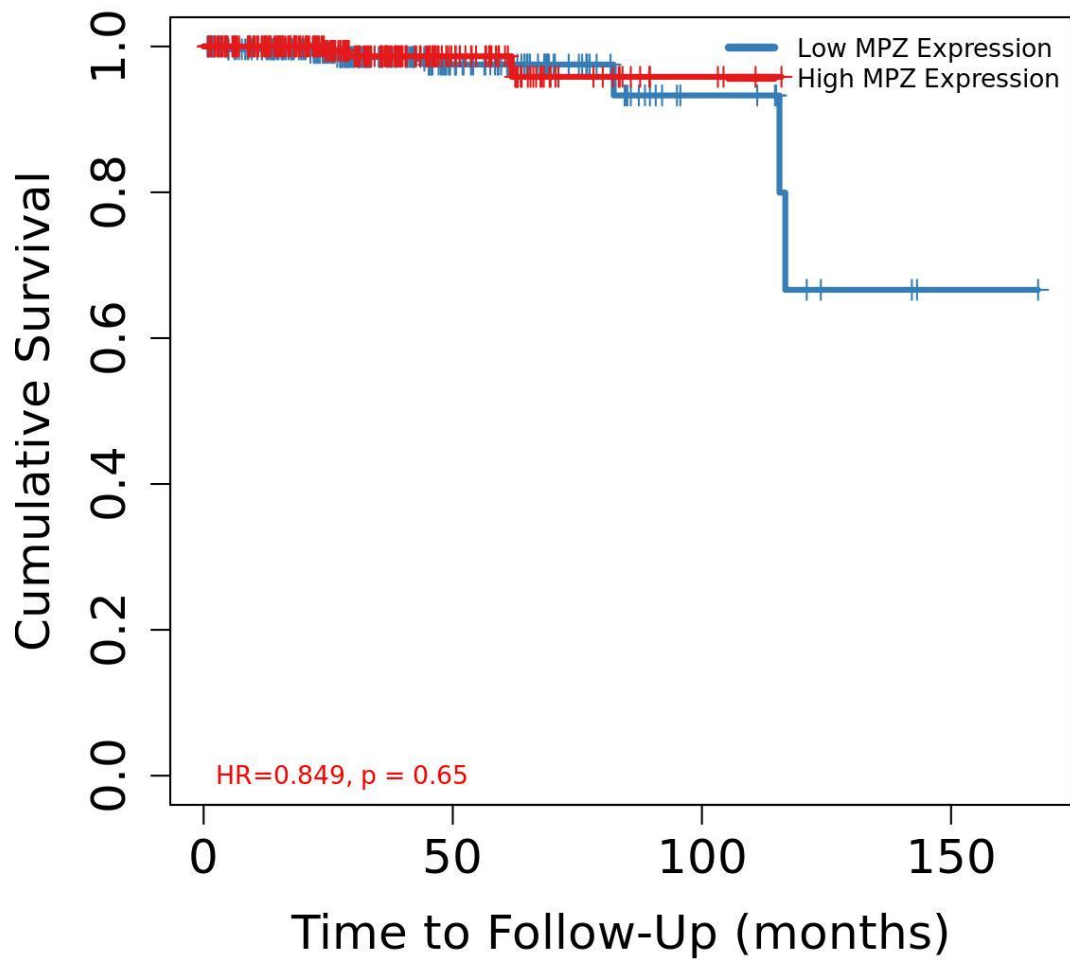
Supplementary Figure 19 -TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for CXCR2 gene



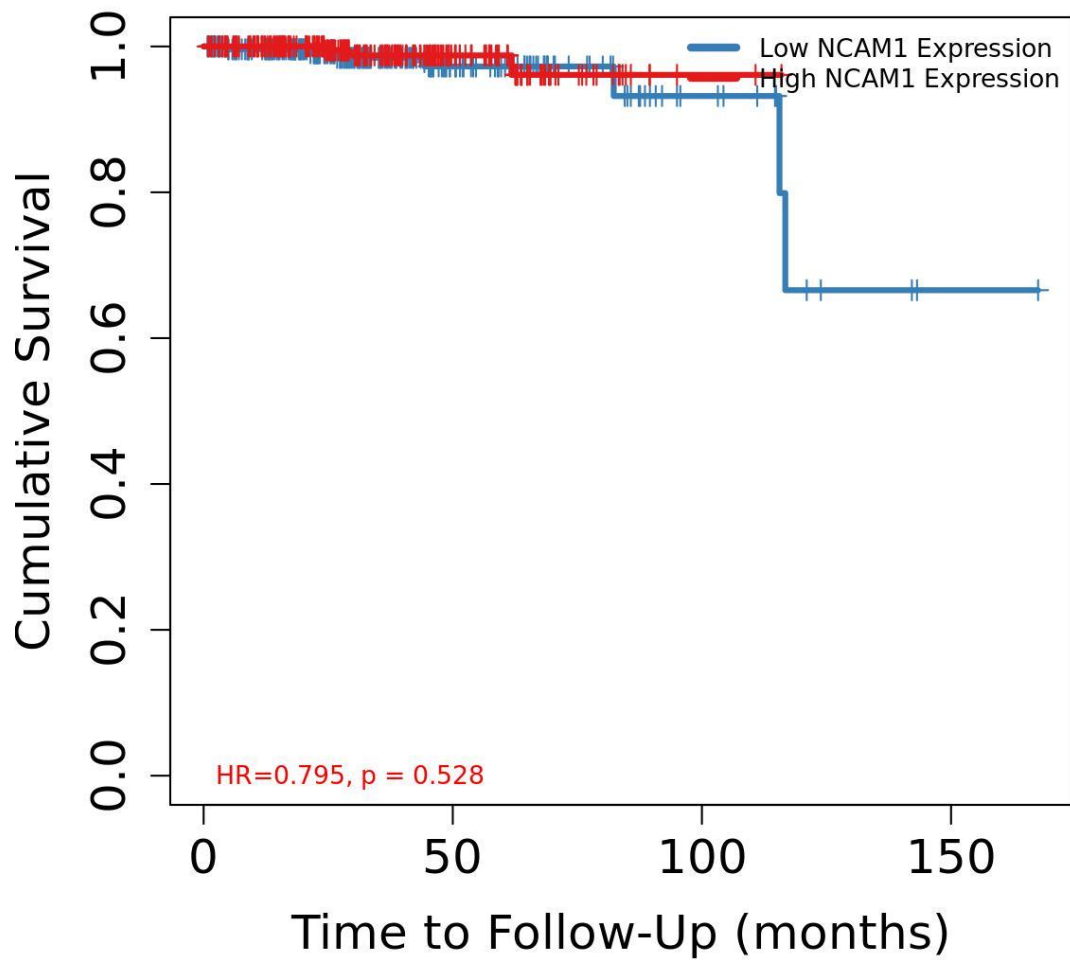
Supplementary Figure 20-TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for GATA3 gene.



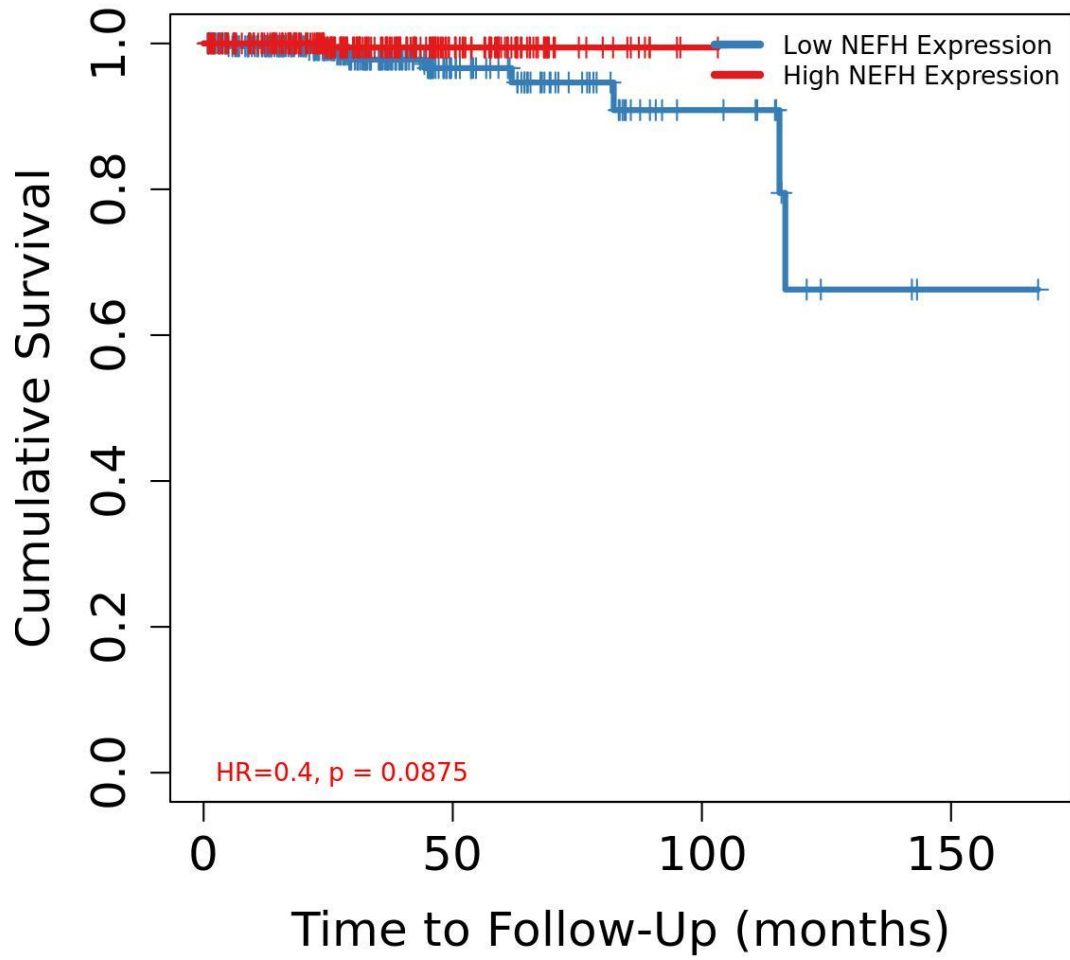
Supplementary Figure 21-TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for MMP9 gene.



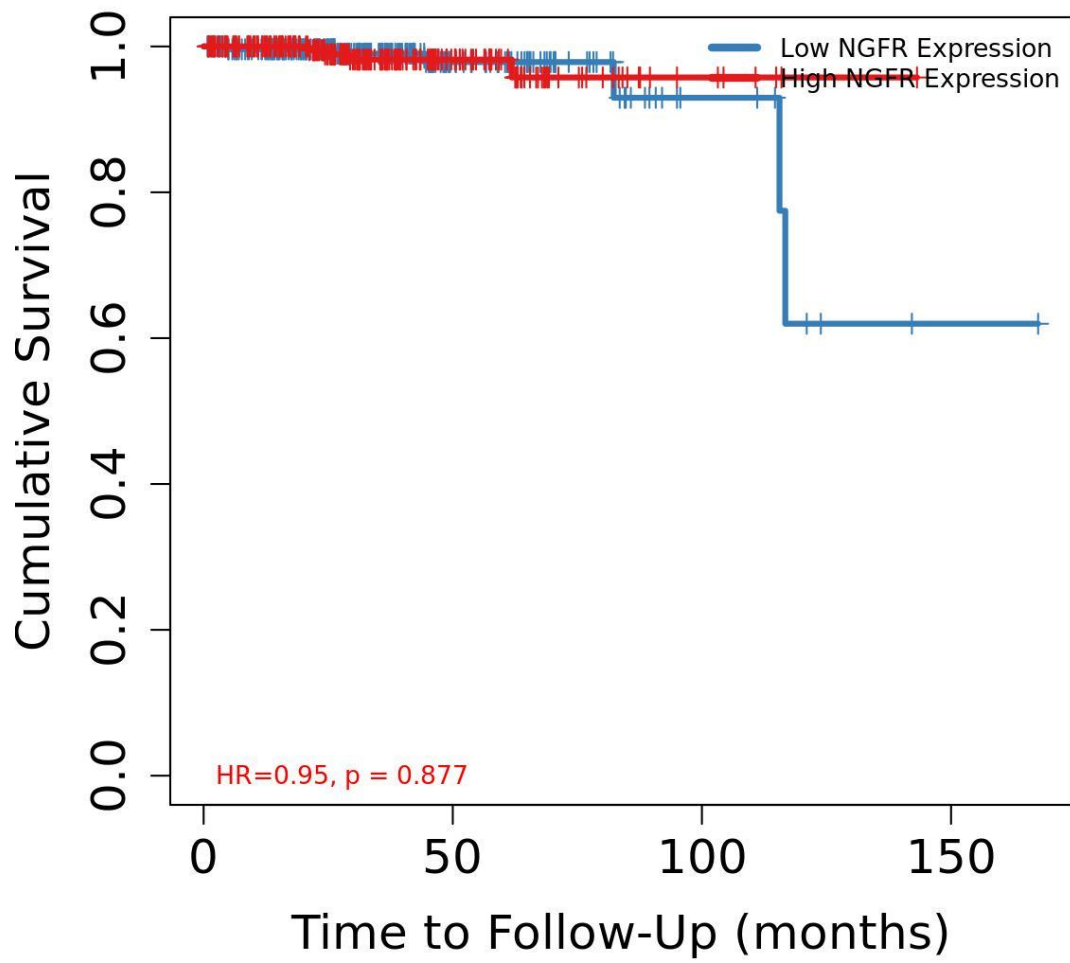
Supplementary Figure 22-TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for MPZ gene



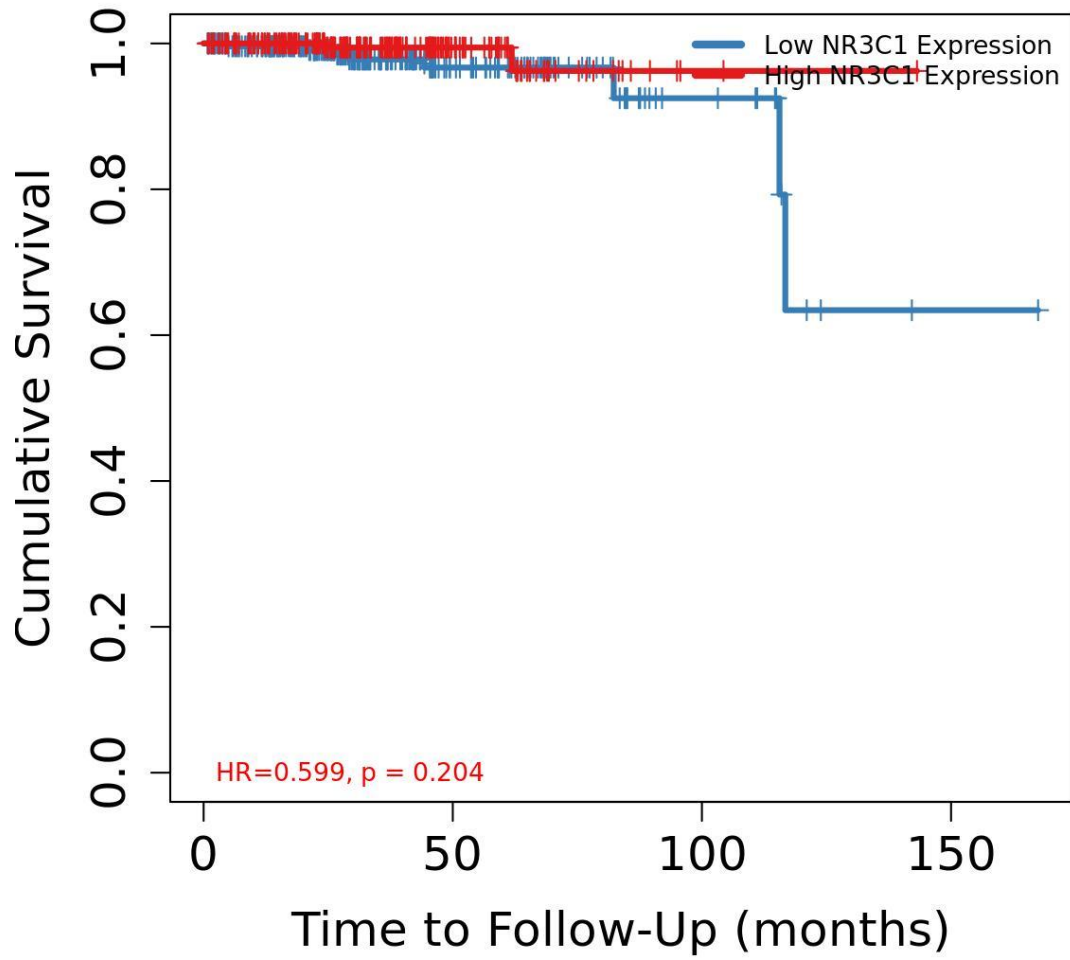
Supplementary Figure 23-TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for NCAM1 gene.



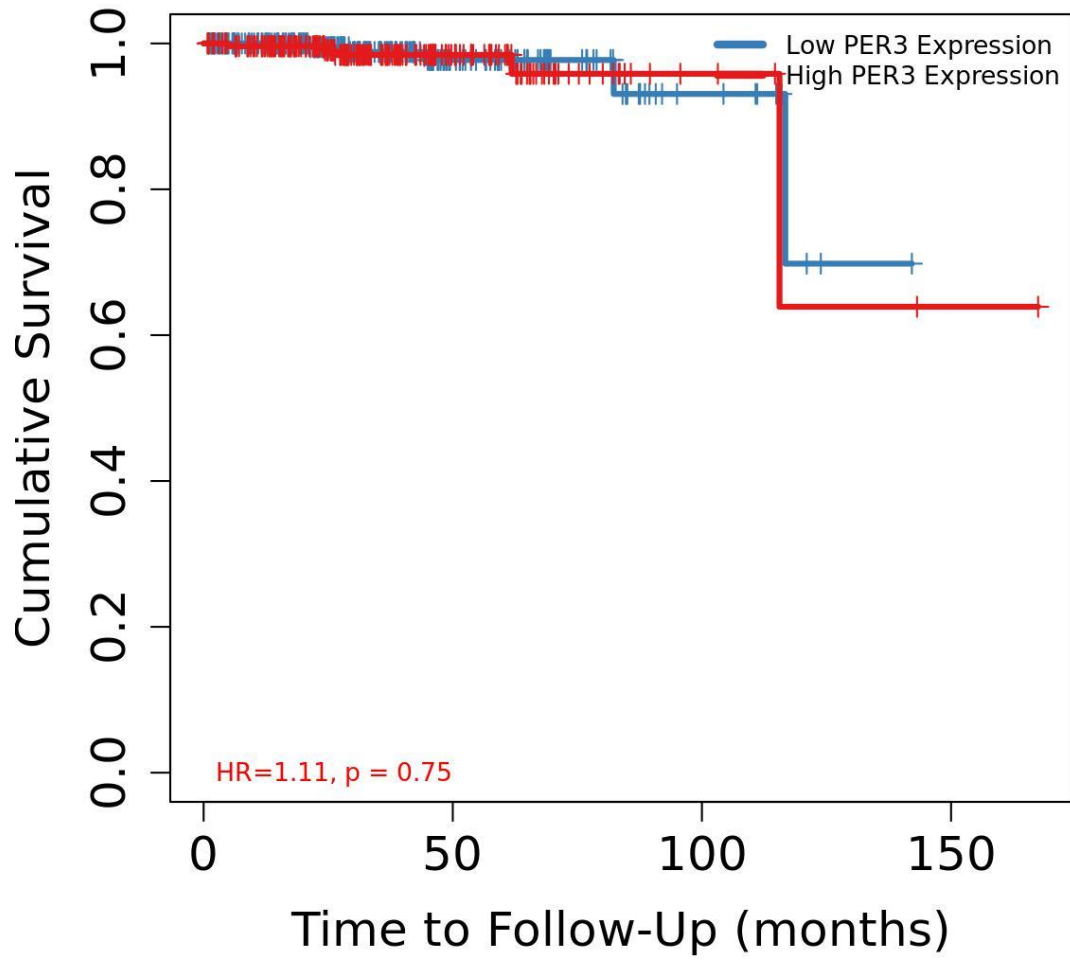
Supplementary Figure 24-TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for NEFH gene.



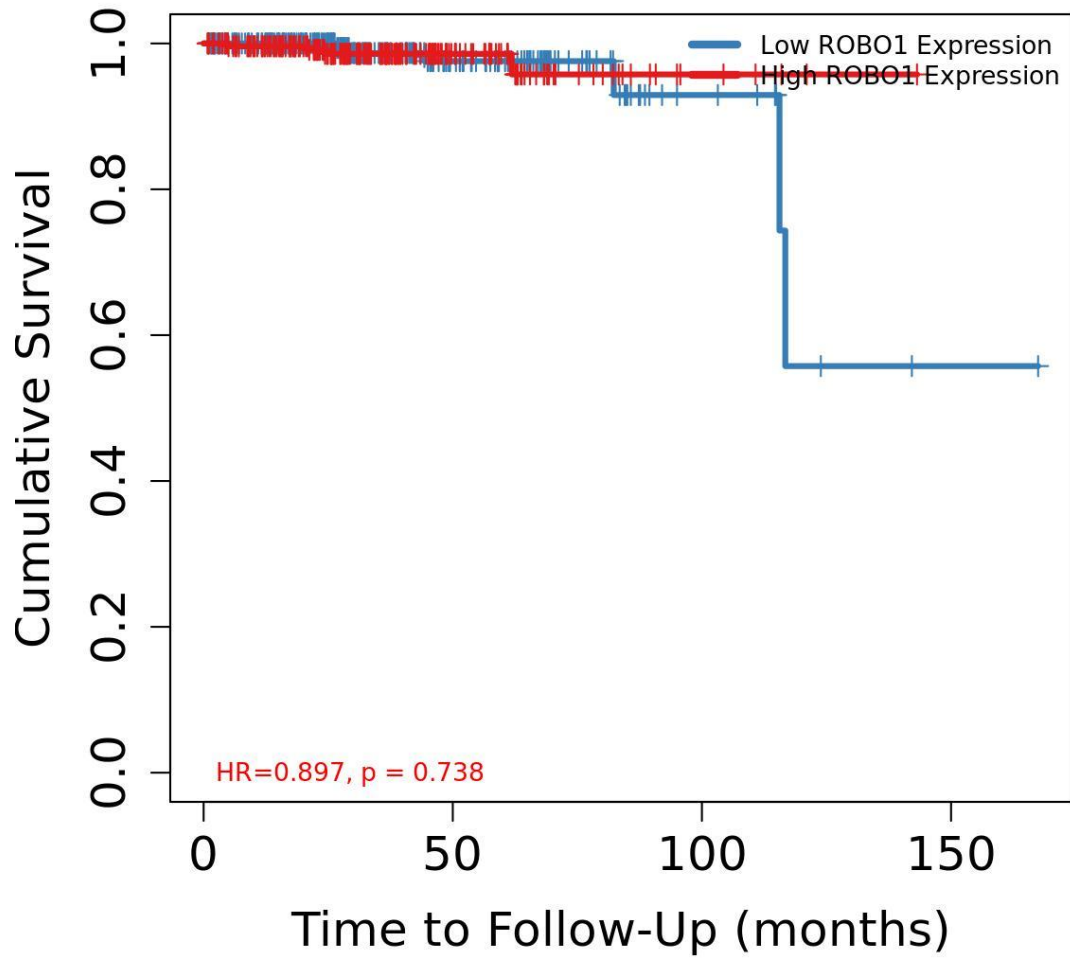
Supplementary Figure 25-TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for NGFR gene.



Supplementary Figure 26-TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for NGFR gene.



Supplementary Figure 27-TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for PER3 gene.



Supplementary Figure 28-TIMER Survival analyses in Prostate adenocarcinoma for ROBO1 gene.

References

- [1] Gatenby RA, Gillies RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008. <https://doi.org/10.1038/nrc2255>.
- [2] Lo HC, Zhang XHF. EMT in Metastasis: Finding the Right Balance. *Dev Cell* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.033>.
- [3] Binmadi NO, Basile JR. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: A discussion of significance and review of the literature. vol. 47. Elsevier Ltd; 2011. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.08.002>.
- [4] Aguilar-Cazares D, Chavez-Dominguez R, Carlos-Reyes A, Lopez-Camarillo C, Hernandez de la Cruz ON, Lopez-Gonzalez JS. Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer. *Front Oncol* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.01399>.
- [5] De Paula AMB, Souza LR, Farias LC, Corrêa GTB, Fraga CAC, Eleutério NB, et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral Oncol* 2009;45. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.11.015>.
- [6] de Carvalho Fraga CA, Farias LC, de Oliveira MVM, Domingos PLB, Pereira CS, Silva TF, et al. Increased VEGFR2 and MMP9 protein levels are associated with epithelial dysplasia grading. *Pathol Res Pract* 2014;210:959–64. <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2014.06.020>.
- [7] Poswar FDO, Fraga CAD, Gomes ESB, Farias LC, Souza LWF, Santos SHS, et al. Protein expression of MMP-2 and MT1-MMP in actinic keratosis, squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma. *Int J Surg Pathol* 2015;23. <https://doi.org/10.1177/1066896914540998>.
- [8] Hingorani D V., Lippert CN, Crisp JL, Savariar EN, Hasselmann JPC, Kuo C, et al. Impact of MMP-2 and MMP-9 enzyme activity on wound healing, tumor growth and RACPP cleavage. *PLoS One* 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198464>.
- [9] Huang CY, Chang YM, Shih YT, Chen YS, Liu CL, Fang WK, et al. Schwann cell migration induced by earthworm extract via activation of PAs and MMP2/9 mediated through ERK1/2 and p38. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2011. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep131>.
- [10] Deborde S, Omelchenko T, Lyubchik A, Zhou Y, He S, McNamara WF, et al. Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. *J Clin Invest* 2016. <https://doi.org/10.1172/JCI82658>.

- [11] Fraga CADC, De Oliveira MVM, De Oliveira ES, Barros LO, Santos FBG, Gomez RS, et al. A high HIF-1 α expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients. *Oral Oncol* 2012;48. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.08.023>.
- [12] Yao Q, Kou L, Tu Y, Zhu L. MMP-Responsive ‘Smart’ Drug Delivery and Tumor Targeting. *Trends Pharmacol Sci* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.06.003>.
- [13] Braakhuis BJM, Brakenhoff RH, Leemans CR. Head and neck cancer: molecular carcinogenesis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2005;16 Suppl 2. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDI713>.
- [14] Zee PC, Attarian H, Videnovic A. Circadian rhythm abnormalities. *Contin Lifelong Learn Neurol* 2013. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000427209.21177.aa>.
- [15] Barbosa Vieira TK, Jurema da Rocha Leão M, Pereira LX, Alves da Silva LC, Pereira da Paz BB, Santos Ferreira RJ, et al. Correlation between circadian rhythm related genes, type 2 diabetes, and cancer: Insights from metanalysis of transcriptomics data. *Mol Cell Endocrinol* 2021;526:111214. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2021.111214>.
- [16] Rana S, Mahmood S. Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circadian Rhythms* 2010. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-8-3>.
- [17] Zhou Y, Shurin G V., Zhong H, Bunimovich YL, Han B, Shurin MR. Schwann cells augment cell spreading and metastasis of lung cancer. *Cancer Res* 2018. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1702>.
- [18] Deborde S, Wong RJ. How Schwann cells facilitate cancer progression in nerves. *Cell Mol Life Sci* 2017. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2578-x>.
- [19] Azam SH, Pecot C V. Cancer’s got nerve: Schwann cells drive perineural invasion. *J Clin Invest* 2016. <https://doi.org/10.1172/JCI86801>.
- [20] Poswar FDO, Farias LC, Fraga CADC, Bambirra W, Brito-Júnior M, Sousa-Neto MD, et al. Bioinformatics, interaction network analysis, and neural networks to characterize gene expression of radicular cyst and periapical granuloma. *J Endod* 2015;41. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.02.004>.
- [21] Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. TCGAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res* 2016;44:e71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1507>.
- [22] Silva TC, Colaprico A, Olsen C, Malta TM, Bontempi G, Ceccarelli M, et al. TCGAbiolinksGUI: A graphical user interface to analyze cancer molecular and clinical data. *F1000Research* 2018;7:439. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14197.1>.

- [23] Edgar R, Lash A. The Gene Expression Omnibus (GEO): A Gene Expression and Hybridization Repository. *NCBI Handb* 2002;0.
- [24] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- [25] Li T, Fan J, Wang B, Traugh N, Chen Q, Liu JS, et al. TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *Cancer Res* 2017;77:e108–10. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0307>.
- [26] Bunimovich YL, Keskinov AA, Shurin G V., Shurin MR. Schwann cells: a new player in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2017;66:959. <https://doi.org/10.1007/S00262-016-1929-Z>.
- [27] Webber CA, Christie KJ, Cheng C, Martinez JA, Singh B, Singh V, et al. Schwann cells direct peripheral nerve regeneration through the Netrin-1 receptors, DCC and Unc5H2. *Glia* 2011. <https://doi.org/10.1002/glia.21194>.
- [28] Li Z, Zhou J, Zhang J, Li S, Wang H, Du J. Cancer-associated fibroblasts promote PD-L1 expression in mice cancer cells via secreting CXCL5. *Int J Cancer* 2019. <https://doi.org/10.1002/ijc.32278>.
- [29] Nagarajan D, McArdle SEB. Immune landscape of breast cancers. *Biomedicines* 2018. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010020>.
- [30] Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van Bossche J Den, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res* 2010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4672>.
- [31] Clements MP, Byrne E, Camarillo Guerrero LF, Cattin AL, Zakka L, Ashraf A, et al. The Wound Microenvironment Reprograms Schwann Cells to Invasive Mesenchymal-like Cells to Drive Peripheral Nerve Regeneration. *Neuron* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.008>.
- [32] Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22:3855–64. <https://doi.org/10.26355/eurrev-201806-15270>.
- [33] Zhang X, Patterson TA, Paule MG, Wang C, Slikker W. Schwann cells. *Neural Cell Biol.*, 2017. <https://doi.org/10.1201/9781315370491>.
- [34] Kim HS, Lee J, Lee DY, Kim YD, Kim JY, Lim HJ, et al. Schwann Cell Precursors from Human Pluripotent Stem Cells as a Potential Therapeutic Target for Myelin Repair. *Stem Cell Reports* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.011>.
- [35] Santos EMS, Guimarães TA, Santos HO, Cangussu LMB, De Jesus SF, De Carvalho Fraga CA, et al. Leptin acts on neoplastic behavior and expression levels

- of genes related to hypoxia, angiogenesis, and invasiveness in oral squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 2017. <https://doi.org/10.1177/1010428317699130>.
- [36] Guimaraes TA, Farias LC, Fraga CA, Feltenberger JD, Melo GA, Coletta RD, et al. Evaluation of the antineoplastic activity of gallic acid in oral squamous cell carcinoma under hypoxic conditions. *Anticancer Drugs* 2016;27. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000342>.
- [37] Noguti J, Moura CFG de, Jesus GPP de, Silva VHP da, Hossaka TA, Oshima CTF, et al. Metastasis from Oral Cancer: An Overview. *Cancer Genomics Proteomics* 2012. <https://doi.org/9/5/329> [pii].
- [38] Islam F, Gopalan V, Lam AKY, Kabir SR. Pea lectin inhibits cell growth by inducing apoptosis in SW480 and SW48 cell lines. *Int J Biol Macromol* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.021>.
- [39] Rashmi R, DeSelm C, Helms C, Bowcock A, Rogers BE, Rader J, et al. AKT inhibitors promote cell death in cervical cancer through disruption of mTOR signaling and glucose uptake. *PLoS One* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092948>.
- [40] Ren C, Chen X, Du N, Geng S, Hu Y, Liu X, et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes Schwann cell viability and proliferation via the GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *Int J Biol Sci* 2018. <https://doi.org/10.7150/ijbs.22409>.
- [41] Domenech-Estevéz E, Baloui H, Meng X, Zhang Y, Deinhardt K, Dupree JL, et al. Akt Regulates Axon Wrapping and Myelin Sheath Thickness in the PNS. *J Neurosci* 2016. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3521-15.2016>.
- [42] Carr L, Parkinson DB, Dun XP. Expression patterns of Slit and Robo family members in adult mouse spinal cord and peripheral nervous system. *PLoS One* 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172736>.
- [43] Gohrig A, Detjen KM, Hilfenhaus G, Korner JL, Welzel M, Arsenic R, et al. Axon guidance factor SLIT2 inhibits neural invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2014;74:1529–40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1012>.
- [44] Wang LJ, Zhao Y, Han B, Ma YG, Zhang J, Yang DM, et al. Targeting Slit-Roundabout signaling inhibits tumor angiogenesis in chemical-induced squamous cell carcinogenesis. *Cancer Sci* 2008;29:510–7. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00721.x>.
- [45] Qin F, Zhang H, Ma L, Liu X, Dai K, Li W, et al. Low Expression of Slit2 and Robo1 is Associated with Poor Prognosis and Brain-specific Metastasis of Breast Cancer Patients. *Sci Rep* 2015;5:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep14430>.

- [46] Gara RK, Kumari S, Ganju A, Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Slit/Robo pathway: A promising therapeutic target for cancer. *Drug Discov Today* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.008>.
- [47] Zhu S, Ge J, Liu Z, Liu L, Jing D, Ran M, et al. Circadian Rhythm Influences the Promoting Role of Pulsed Electromagnetic Fields on Sciatic Nerve Regeneration in Rats. *Front Neurol* 2017;8:101. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2017.00101>.
- [48] Tiong YL, Ng KY, Koh RY, Ponnudurai G, Chye SM. Melatonin promotes Schwann cell dedifferentiation and proliferation through the Ras/Raf/ERK and MAPK pathways, and glial cell-derived neurotrophic factor expression. *Exp Ther Med* 2020;20:1–1. <https://doi.org/10.3892/ETM.2020.9143>.

Cancer Genetics

Perineural invasion on prostate cancer is associated with Schwann cells and circadian rhythm-related genes disruption: a bioinformatic approach --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original article
Section/Category:	Big Data and Medicine
Keywords:	bioinformatic; prostate adenocarcinoma; clock-related genes; Schwann cells dedifferentiation
Corresponding Author:	Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Ph.D. Universidade Federal de Alagoas Arapiraca, AL BRAZIL
First Author:	Sérgio Lopes Silva
Order of Authors:	Sérgio Lopes Silva Hellem Cristina dos Santos Lima Genilda Castro de Omena Neta Rodger Marcel Lima Rocha Ana Kelly Fernandes Duarte Alexandre Wendell Araujo Moura Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Ph.D.
Abstract:	<p>Studies have shown that Schwann cells participate in the tumor microenvironment, producing several factors that benefit cancer cells. During this process, Schwann cells are dedifferentiated and help the process of cancer cellular proliferation. These cells then migrate to the region close to the tumor tissue and assist the development of the neoplastic cell. In this context, the aim of the present study was to evaluate the influence of Schwann cells over prostate cancers. We investigated the association between Schwann cells and prostate cancer often associated with perineural invasion. Initially, we used the GEO DataSets platform from the GEO repository to identify a database reporting gene expression in Schwann cells in a neoplastic context. Briefly, the database contains the expression results from experiments in which two factors produced by tumor cells were added into cell cultures. Comparisons were made between samples from the first and third passages. We then used these data to perform differential gene expression analysis and crossed data from upregulated genes with differential expression data from negative and positive perineural invasion prostate cancers. We observed that the "axon guidance" pathway was upregulated in negative perineural invasion prostate cancers. Meanwhile, upregulated mRNAs activate the "axon guidance" and, together with Robo1 and Mpz upregulation, inhibits perineural invasion pathways. Both genes are also associated with Schwann cells migration inhibition. Per3, Nr3c1, Ppargc1a, Timp3, Id2, Pde8b and Cavin1 were upregulated in negative perineural tumors, while Slc25a10 was upregulated. We also observed upregulated genes in positive perineural invasion: Ppargc1a, Timp3, Slc10a8, Id2, Defb1, Aqp3, Aas1, Pde8b, Nefh and Cavin1. Aqp3 and Nefh were upregulated only in positive perineural invasion tumors and Per3 and Nr3c1 were upregulated only in negative perineural invasion samples. We believe that Circadian rhythm and/or melatonin disruption could be associated with Schwann cells dedifferentiation; consequently, Schwann cells produce different factors that will participate in various processes of tumor progression. These processes may also be involved in tumor invasion into the perineural tissue in prostate cancer.</p>
Suggested Reviewers:	Andre Guimaraes andreluzguimaraes@gmail.com Talita Guimaraes

4.2. Produto 2



870200161353



24/12/2020

10:35

29409161927414597

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 026684 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Painel genético no prognóstico e predição de neoplasia de próstata

Utilidade (54):

Resumo: A invenção busca descrever um painel para o câncer de próstata que, a partir da identificação de biomarcadores e a expressão gênica diferencialmente aumentada, se correlacionam com sobrevida, diagnóstico, prognóstico, recidiva, progressão e possibilidade de metástase da neoplasia. O painel utiliza para as análises dados de RNAseq do TCGA; expressão diferencial pelo TCGAAbiolinks no software R; identificação dos genes que impactavam negativamente na sobrevida pelo TNMplot; por fim, na identificação de vias metabólicas no NetworkAnalyst.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 18

Nome: PAULYANA FERNANDES BARBOSA

CPF: 06171905429

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Elvira Barbosa Lopes, 600

Cidade: Arapiraca Estado: AL CEP:

País: BRASIL

Telefone: (82) 996 560041

Fax:

Email: paulyanafbarbosa@gmail.com

Inventor 2 de 18

Nome: ANA PAULA FERNANDES BARBOSA

CPF: 60467789487

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Elvira Barbosa Lopes, 600

Cidade: Arapiraca

Estado: AL

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (82) 999 851040 Fax:

Email: npdc@uol.com.br

Inventor 3 de 18

Nome: Carlos Alberto de Carvalho Fraga

CPF: 07464340655

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Amelia Nunes Correia, 1092, H11, condomínio Pedro Tertuliano

Cidade: Arapiraca

Estado: AL

CEP: 57309-610

País: BRASIL

Telefone: (82) 991 931405

Fax:

Email: carlos.fraga@arapiraca.ufal.br

Inventor 4 de 18

Nome: KAROL FIREMAN DE FARIAS

CPF: 95960112434

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: RUA JOSÉ NUNES DA SILVA, 424, SENADOR ARNON DE MELO, CONDOMÍNIO ALTO JARDIM, QUADRA i, LOTE 10

Cidade: ARAPIRACA

Estado: AL

CEP: 57315-784

País: BRASIL

Telefone: (82) 996 206444

Fax:

Email: karol.farias@arapiraca.ufal.br

Inventor 5 de 18

Nome: ROBERTA KAROLLINE DE SOUZA LIMA

CPF: 07925461489

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Avenida Antônio Custódio Porto, 140, Centro, São Sebastião

Cidade: ARAPIRACA

Estado: AL

CEP: 57275-000

País: BRASIL

Telefone: (82) 991 101597

Fax:

Email: roberta.lima@famed.ufal.br

Inventor 6 de 18

Nome: BRUNA DEL VECHIO KOIKE

CPF: 27215337898

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Miguel Santos 172, ap 201

Cidade:

Petrolina

Estado: PE

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (87) 210 16865

Fax:

Email: bruna.dvkoike@univasf.edu.br

Inventor 7 de 18

Nome: HELLEM CRISTINA DOS SANTOS LIMA

CPF: 08766624401

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: LOT AROEIRAS, 19 - QD:07 - BOM SUCESSO

Cidade: ARAPIRACA

Estado: AL

CEP: 57275-000

País: BRASIL

Telefone: (82) 982 354622

Fax:

Email: hellem.lima@arapiraca.ufal.br

Inventor 8 de 18

Nome: NOAN ROCHA DE ALMEIDA

CPF: 15472464722

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Quinze de Agosto, 15 - CENTRO

Cidade: ARAPIRACA

Estado: AL

CEP: 57300-540

País: BRASIL

Telefone: (21) 980 561200

Fax:

Email: noan.almeida@arapiraca.ufal.br

Inventor 9 de 18

Nome: GIOVANNA BARROS ROLIM

CPF: 10487853431

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua José Matheus do Nascimento, 123

Cidade: Arapiraca

Estado: AL

CEP: 57312-690

País: BRASIL

Telefone: (82) 999 580505

Fax:

Email: giovanna.rolim@famed.ufal.br

Inventor 10 de 18

Nome: LUCIANA XAVIER PEREIRA

CPF: 08934131608

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Estelita de Macedo, 326, apto 801, bloco B

Cidade: Arapiraca

Estado: AL

CEP: 57312-105

País: BRASIL

Telefone: (37) 988 042328

Fax:

Email: luciana.pereira@arapiraca.ufal.br

Inventor 11 de 18

Nome: MIGUEL FERREIRA LUSTOSA NETO

CPF:12043872494

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Cícero Romão Batista, 169

Cidade: Arapiraca

Estado: AL

CEP: 57307-070

País: BRASIL

Telefone: (82) 998 254618

Fax:

Email: miguel.neto@arapiraca.ufal.br

Inventor 12 de 18

Nome: ÉRIKA DE FÁTIMA MACHADO SOARES

CPF: 11070942405

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Maria Francisca da Silva, 172

Cidade: Santana do Ipanema

Estado: AL

CEP: 57500-000

País: BRASIL

Telefone: (82) 999 279005

Fax:

Email: erika.soares@arapiraca.ufal.br

Inventor 13 de 18

Nome: TATIANA FARIAS DE OLIVEIRA

CPF: 07713613439

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Dione Nunes Ferreira, 08

Cidade: Arapiraca

Estado: AL

CEP: 57303-260

País: BRASIL

Telefone: (82) 999 491827

Fax:

Email: tatiana.oliveira@arapiraca.ufal.br

Inventor 14 de 18

Nome: THAYSA KELLY BARBOSA VIEIRA TOMÉ

CPF: 01401304460

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Jose Fernandes Lopes, numero 09, quadra A. Canafístula

Cidade: Arapiraca

Estado: AL

CEP: 57302-010

País: BRASIL

Telefone: (82) 996 10022

Fax:

Email: thaysa.vieira@arapiraca.ufal.br

Inventor 15 de 18

Nome: WALLISON JUSTINO DA SILVA

CPF: 09226293406

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Cícero Barbosa e Silva, 25

Cidade: Arapiraca

Estado: AL

CEP: 57308-110

País: BRASIL

Telefone: (82) 998 099929

Fax:

Email: wallison.silva@arapiraca.ufal.br

Inventor 16 de 18

Nome: GENILDA CASTRO DE OMENA NETA

CPF: 05928447493

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Pedro Manoel Mendes, N°58, Quadra-15, Conj. José
Maria de Melo

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57081-125

País: BRASIL

Telefone: (82) 981 177321

Fax:

Email: genilda.castro@ifal.edu.br

Inventor 17 de 18

Nome: RODGER MARCEL LIMA ROCHA

CPF: 03820611444

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Monsenhor Cícero Teixeira de Vasconcelos, 250

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57042-215

País: BRASIL

Telefone: (82) 999 355588

Fax:

Email: rodger.rocha@iqb.ufal.br

Inventor 18 de 18

Nome: LÍVIA ANDRESSA SILVA DO CARMO

CPF: 07408888462

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Leonídio Cincinato, 59

Cidade: Murici

Estado: AL

CEP: 57820-000

País: BRASIL

Telefone: (32) 991 283416

Fax:

Email: liviaandressacarmo@hotmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Pagamento.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	REIVINDICAÇÕES.pdf
Desenho	DESENHOS.pdf
Resumo	RESUMO.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

COMPROVANTE DE PAGAMENTO DE TITULOS

CLIENTE: CARLOS ALBERTO C FRAGA
AGENCIA: 0104-X CONTA: 116.596-8

=====

BANCO DO BRASIL

00190000090294091619627414597172184990000007000

BENEFICIARIO:

INSTITUTO N P I - INPI

NOME FANTASIA:

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE I

CNPJ: 42.521.088/0001-37

PAGADOR:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

CNPJ: 24.464.109/0001-48

NR. DOCUMENTO	121.502
MOSSO NUMERO	29409161927414597
CONVENIO	02940916
DATA DE VENCIMENTO	13/01/2021
DATA DO PAGAMENTO	15/12/2020
VALOR DO DOCUMENTO	70,00
VALOR COBRADO	70,00

NR.AUTENTICACAO 2.FDF.7E7.397.309.A0D

Central de Atendimento BB

4004 0001 Capitais e regioes metropolitanas

0800 729 0001 Demais localidades.

Consultas, informacoes e servicos transacionais.

SAC BB

0800 729 0722

Informacoes, reclamacoes, cancelamento de
produtos e servicos.

Ouvidoria

0800 729 5678

Reclamacoes nao solucionadas nos canais
habituais agencia, SAC e demais canais de
atendimento.

Atendimento a Deficientes Auditivos ou de Fala

0800 729 0088

Informacoes, reclamacoes, cancelamento de cartao,
outros produtos e servicos de Ouvidoria.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **“Painel genético no prognóstico e predição de neoplasia de próstata”**

[001] A presente invenção descreve um painel para prognóstico de câncer de próstata que utiliza o perfil de expressão obtidos pelas análises de RNAseq, fornecendo informações acerca da natureza desses tumores e estratifica os resultados da sobrevivência dos pacientes afetados pela doença.

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPÕE A RESOLVER

[002] O câncer de próstata é o câncer não cutâneo mais comum em homens em todo o mundo, com uma estimativa de 1.600.000 casos e 366.000 mortes anualmente (Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar;65(2):87–108). Suas taxas de incidência tendem a ser mais altas em regiões mais desenvolvidas do mundo (por exemplo, América do Norte, Europa Ocidental e do Norte e Austrália), em parte refletindo o acesso a cuidados médicos, incluindo rastreamento e detecção precoce (Rebbeck TR. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Semin Radiat Oncol.* 2017 Jan;27(1):3–10).

[003] Quanto aos principais fatores de risco para câncer de próstata são idade e história familiar, e homens negros têm um risco maior de incidência e morte em comparação com homens de origem branca ou asiática (Merriell SWD, Funston G, Hamilton W. Prostate Cancer in Primary Care. *Adv Ther.* 2018 Sep 10;35(9):1285–94.).

[004] O câncer de próstata exibe a maior herdabilidade relatada de qualquer câncer importante (Lichtenstein P, Holm N V., 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. *N Engl J Med.* 2000 Jul 13;343(2):78–85). Vários estudos, particularmente estudos epidemiológicos, estudos de gêmeos e estudos de associação do genoma em larga escala (GWASs), demonstraram um componente genético para a etiologia do câncer de próstata (Eeles R, Goh C, Castro E, Bancroft E, Guy M, Olama AA Al, et al. The genetic epidemiology 2/12

of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol*. 2014 Jan 3;11(1):18– 31.). Especificamente, estudos epidemiológicos estabeleceram que uma história familiar de câncer de próstata aumenta significativamente o risco (Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. *Genetics and biology of prostate cancer*. *Genes Dev*. 2018 Sep 1;32(17–18):1105–40); estudos com gêmeos indicaram que o câncer de próstata está entre os cânceres mais hereditários (Lichtenstein P, Holm N V., 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*. *N Engl J Med*. 2000 Jul 13;343(2):78–85.).

[005] Catalogar os impulsionadores genéticos do câncer de próstata tem sido fundamental para definir os subtipos de doenças e estratégias terapêuticas associadas (Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. *Genetics and biology of prostate cancer*. *Genes Dev*. 2018 Sep 1;32(17–18):1105–40). Espera-se que o desenvolvimento de algoritmos orientados por inteligência artificial acelere o desenvolvimento de biomarcadores precisos e algoritmos de gerenciamento para prever a sobrevida do paciente, respostas ao tratamento, resistência aos medicamentos e doença residual mínima (Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. *Genetics and biology of prostate cancer*. *Genes Dev*. 2018 Sep 1;32(17–18):1105– 40).

[006] Sendo assim, por meio de avaliação de expressão gênica em dados disponíveis no The Cancer Genome Atlas Program (TCGA), UALCAN e TNMplot, a invenção propõe a disponibilização de um painel genético que englobe dados de diagnóstico, prognóstico, sobrevida e recidiva. Isso foi pensado pois ao longo do amadurecimento da patente, se estendendo na pesquisa de dados e análises, percebeu-se que os bancos de dados atuais como INIP, Latipat, Espacenet e Patentscope não apresentam um painel genético que possa fazer associação entre dados de prognóstico, sobrevida e recidiva do câncer de próstata.

ESTADO DA TÉCNICA

[007] Existem algumas patentes relacionadas a avaliação de marcadores moleculares no câncer.

[008] A patente PI 0518741-9 A2, intitulada **“USO DE UMA COMBINAÇÃO DE UMA**

DROGA DIRETAMENTE METABOLIZADA POR UGT1A1 OU UM SEU SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL E ATAZANAVIR OU UM SEU SAL

FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL, E, COMBINAÇÃO FARMACÊUTICA PARA

ADMINISTRAÇÃO ORAL A UM MAMÍFERO” e publicada em 02/12/2008, refere-se a um método para melhorar a farmacocinética de uma droga administrada oralmente, que é diretamente metabolizado por UGT1A1, compreende administrar oralmente, a um mamífero em necessidade de tratamento, a droga, uma combinação da droga ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e atazanavir ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[009] A patente BR 11 2018 076089 7 A2, intitulada “**PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-AMH E USOS DOS MESMOS**” e publicada em 26/03/2019, refere-se a um processo de preparação de anticorpos anti-AMH de mamífero. A presente invenção também se refere aos anticorpos e fragmentos de anticorpo e ao uso dos mesmos para avaliar o AMH, em particular em fertilidade.

[010] Nenhuma das patentes supracitadas possui semelhança com método proposto de um painel genético para o prognóstico associado à sobrevida e recidiva. As patentes relacionadas com prognóstico também apresentam formas diferentes da proposta nesta invenção. Ademais, a maioria dos genes não apresentaram patentes relacionadas, e aqueles que possuíam patentes não apresentavam a mesma finalidade de um painel genético associado ao prognóstico dos pacientes. Dessa forma, o objetivo da presente invenção é disponibilizar a identificação dos genes relacionados ao prognóstico do Câncer de Próstata, no que diz respeito a sobrevida, recidiva e resistência a quimioterápicos, sendo uma forma de orientação ao melhor tratamento.

[011] A presente invenção descreve o método baseado em painel genético para a identificação de marcadores moleculares relacionados a predição do prognóstico do desenvolvimento de Câncer de Próstata, com ênfase na sobrevida e estadiamento. O método pode ser aplicado a pacientes susceptíveis e com histórico familiar, e outros casos que se façam pertinentes.

[012] Na presente invenção, a avaliação da expressão gênica é realizada por dados experimentais disponíveis no The Cancer Genome Atlas Program (TCGA). A grande vantagem da invenção é a capacidade de esclarecer o risco individual de recidiva e sobrevida dos pacientes. Os valores das expressões dos genes supracitados permitem segregar os pacientes em grupos de alto e baixo risco para metástase e recidiva, impactando no tempo de sobrevida dos mesmos. Esses marcadores são de extrema importância para a prática clínica, já que permite estabelecer o prognóstico, fornecendo

informações importantes para as estratégias terapêuticas mais adequadas às características moleculares individuais das neoplasias. O perfil de expressão dos painéis genéticos são utilizados para a predição do curso do Câncer de Próstata, indicando o risco aumentado de metástase dentre os pacientes com esse câncer. A abordagem terapêutica a ser escolhida levará em consideração o perfil de expressão dos painéis e, como resultados indiretos, redução no tempo e nos custos do tratamento.

[013] A presente invenção apresenta vantagens como: capacidade de segregar os pacientes com alto risco de recidiva e metástase no do Câncer de Próstata, permitindo a escolha correta do tratamento, o que acarretará na maior sobrevida e menor custo de tratamento dos pacientes.

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

[014] O sistema de classificação de Gleason, que foi originalmente definido por Donald Gleason (Gleason e Mellinger 1974) com base nos padrões histológicos do adenocarcinoma da próstata, foi refinado ao longo dos anos e é o sistema de classificação mais amplamente usado para definir a agressividade do câncer de próstata (Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. Genes Dev. 2018 Sep 1;32(17–18):1105–40). Tal sistema estratifica os cânceres localizados em três grupos: de baixo, intermediário e alto risco (Rodrigues G, Warde P, Pickles T, Crook J, Brundage M, Souhami L, et al. Pre-treatment risk stratification of prostate cancer patients: A critical review. Can Urol Assoc J. 2012 Apr 17;6(2):121–7). O tratamento do câncer de próstata depende do grau, estágio e idade e varia de vigilância ativa a uma combinação de cirurgia, quimioterapia, radiação e/ou terapia hormonal (Litwin MS, Tan H-J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. JAMA. 2017 Jun 27;317(24):2532).

[015] As patentes e métodos existentes não consideram, nas análises de predição, diagnóstico e prognóstico em câncer de próstata e chances de recidiva dos pacientes. Há a necessidade de classificar os pacientes com alto risco de recidiva e metástase. Estes fatores permitirão a escolha do tratamento, o que impacta diretamente na sobrevida dos pacientes, acarretando em um menor custo para a saúde pública.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[016] **Tabela 1.** Genes expressos entre grupos e genes individuais de cada grupo de indivíduos com câncer de próstata

[017] **Figura 1.** Comparação de lâminas de imuno-histoquímica de tecido de próstata normal e tecido de câncer de próstata

[018] **Figura 2.** Comparação de lâminas de imuno-histoquímica de tecido de próstata normal e tecido de câncer de próstata

[019] **Figura 3.** Vias metabólicas relacionadas ao câncer de próstata

[020] **Figura 4.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene AMH.

[021] **Figura 5.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene CPLX1.

[022] **Figura 6.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene GAD1.

[023] **Figura 7.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene GPC2.

[024] **Figura 8.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene GPRIN.

[025] **Figura 9.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene LOC100272228.

[026] **Figura 10.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene MAPK8IP2.

[027] **Figura 11.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene PAQR6.

[028] **Figura 12.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene PATE1.

[029] **Figura 13.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene PCBP3.

[030] **Figura 14.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene PIGL.

[031] **Figura 15.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene PVT1.

[032] **Figura 16.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene RPL36A.

[033] **Figura 17.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene SGK494.

[034] **Figura 18.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene SLC25A27.

[035] **Figura 19.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene UGT1A1.

[036] **Figura 20.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene ZNF485.

[037] **Figura 21.** – Análise de expressão diferencial do gene FASN no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[038] **Figura 22.** – Análise de expressão diferencial do gene GAD1 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[039] **Figura 23.** – Análise de expressão diferencial do gene MAPK8IP2 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[040] **Figura 24.** – Análise de expressão diferencial do gene MARCKSL1 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[041] **Figura 25.** – Análise de expressão diferencial do gene MYO6 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[042] **Figura 26.** – Análise de expressão diferencial do gene PAQR6 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[043] **Figura 27.** – Análise de expressão diferencial do gene PIGL no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[044] **Figura 28.** – Análise de expressão diferencial do gene PYCR1 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[045] **Figura 29.** Descrição em fluxograma dos métodos utilizados para invenção

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RNA-seq e dados de informações clínicas do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA)

[046] Para realizarmos a seleção dos genes, inicialmente baixamos os dados clínicos dos pacientes de câncer de próstata utilizando o pacote TCGA Biolinks disponível para R (COLAPRICO, Antonio et al. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. Nucleic acids research, v. 44, n. 8, p. e71-e71, 2016.).

Originalmente, a tabela continha um total de 115 pacientes. Realizamos individualmente análises de expressão diferencial dos genes utilizando, novamente, o pacote para R TCGA Biolinks, com parâmetros de $\text{LogFC} > 1$ para genes aumentados, $\text{LogFC} < 1$ para genes diminuídos e $p < 0.05$, nestas análises, a expressão gênica dos pacientes seria comparada com dados de tecido normal disponíveis no próprio pacote, obtendo dessa forma uma lista de genes diferencialmente expressos (DEGs).

Análise de sobrevida

[047] Essa lista foi então submetida a uma análise de sobrevida, ainda utilizando o mesmo pacote, o que nos retornou uma nova lista apenas com os genes significativos para a sobrevida dos pacientes, contendo 93 genes. Feito isto, submetemos essa lista a análise no UALCAN (Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Rodriguez IP, Chakravarthi BVSK and Varambally S. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia*. 2017 Aug;19(8):649-658. doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002 [PMID:28732212]) para 8/12

confirmação de nossos dados, além disso, nele obtivemos os plots de sobrevida para cada gene individualmente. Em nossa análise utilizamos apenas os genes de impacto negativo, ou seja, cuja maior expressão resultaria numa menor sobrevida para os pacientes. Ao final, obtivemos uma lista com 21 genes.

Análise de expressão diferencial a nível protéico, recorrência e biomarcadores

[048] Para testarmos a expressão diferencial desses genes no câncer de próstata, comparado com tecido normal e metastático, utilizamos o TNMplot

(<https://www.tnmplot.com>), resultando em 8 genes significativos. Para confirmarmos a expressão de nossos genes a nível proteico, os submetemos ao The Human Protein Atlas (Towards a knowledge-based **Human Protein Atlas**. *Nat Biotechnol*. Berglund L et al, 2008.) no qual encontramos lâminas de imuno-histoquímica com diferença significativa entre o tecido tumoral e o tecido normal para 5 dos 21 genes de impacto negativo encontrados no UALCAN, sendo 1 deles já reconhecido como biomarcadores para o câncer de próstata. Feito isso, comparamos de expressão gênica para recorrência de

adenocarcinoma de próstata armazenado no GEOdatasets (Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M, Yefanov A, Lee H, Zhang N, Robertson CL, Serova N, Davis S, Soboleva A. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D9915.), (GSE26022) (Qi Long. et al Protein-coding and MicroRNA Biomarkers of Recurrence of Prostate Cancer Following Radical Prostatectomy. *The American Journal of Pathology*, Vol. 179, No. 1, July 2011.), dos 21 genes iniciais, 4 se demonstraram impactantes na recidiva segundo esta análise.

RESULTADOS OBTIDOS

[049] A lista inicial contendo 2038 genes foi reduzida para uma lista contendo 93 a qual foi refinada a partir das análises subsequentes três subgrupos de genes impactantes na sobrevida, na recidiva e na metástase contendo 21, 8 e 2 genes. [050] **Tabela 1.** Genes expressos entre grupos e genes individuais de cada grupo de indivíduos com câncer de próstata

<i>Grupos de Análise</i>	<i>Papel dos Biomarcadores</i>	<i>Total</i>	<i>Elementos</i>
Sobrevida pelo UALCAN (Prognóstico)	Prognóstico	21	AMH, CPLX1, GAD1, GPC2, GPRIN1, LOC100272228, MAPK8IP2, PAQR6, PATE1, PCBP3, PIGL, PVT1, RPL36A, SGK494, SLC25A27, UGT1A1, ZNF485, FASN, MARCKSL1, MYO6 e PYCR1
Recorrência pelo TNMplot	Prognóstico	8	GAD1, MAPK8IP2, PAQR6, PIGL, FASN, MARCKSL1, MYO6 e PYCR1
Biomarcadores pelo THPA	Diagnóstico	2	PAQR6 e PIGL

[051] Dos 93 genes encontrados, 5 foram identificados desregulados também a nível protéico pela análise no The Human Protein Atlas, sendo 2 deles (PIGL e PAQR6) já identificados como biomarcadores para câncer de próstata.

[052] **Figura 1.** Comparação de lâminas de imuno-histoquímica de tecido de próstata normal e tecido de câncer de próstata.

[053] **Figura 2.** Comparação de lâminas de imuno-histoquímica de tecido de próstata normal e tecido de câncer de próstata

[054] **Figura 3.** Vias metabólicas relacionadas ao câncer de próstata [055]

Tabela 02 -

<i>Via</i>	<i>Total</i>	<i>Hits</i>	<i>Valor de P</i>
<i>Vias metabólicas</i>	1430	5	0.00733
<i>Metabolismo de taurina e hipotaurina</i>	11	1	0.0113
<i>Biossíntese de ácidos graxos</i>	18	1	0,0185
<i>Biossíntese de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI)</i>	25	1	0,0256
<i>Metabolismo de ascorbato e aldarato</i>	27	1	0.0276
<i>Metabolismo de butanoato</i>	28	1	0.0286
<i>Metabolismo de beta-alanina</i>	31	1	0.0316
<i>Interconversões de pentose e glucuronato</i>	34	1	0,0346
<i>Metabolismo de porfirina e clorofila</i>	42	1	0.0426
<i>Diabetes mellitus tipo I</i>	43	1	0.0436

[056] **Figura 4.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene AMH.

[057] **Figura 5.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene CPLX1.

[058] **Figura 6.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene GAD1.

[059] **Figura 7.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene GPC2.

[060] **Figura 8.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene GPRIN.

[061] **Figura 9.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene LOC100272228.

[062] **Figura 10.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene MAPK8IP2.

[063] **Figura 11.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene PAQR6.

[064] **Figura 12.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene PATE1.

[065] **Figura 13.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene PCBP3.

[066] **Figura 14.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene PIGL.

[067] **Figura 15.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene PVT1.

[068] **Figura 16.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene RPL36A.

[069] **Figura 17.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene SGK494.

[070] **Figura 18.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene SLC25A27.

[071] **Figura 19.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene UGT1A1.

[072] **Figura 20.** - Análise de sobrevida no UALCAN do câncer de próstata para a expressão do gene ZNF485.

[073] **Figura 21.** – Análise de expressão diferencial do gene FASN no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[074] **Figura 22.** – Análise de expressão diferencial do gene GAD1 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[075] **Figura 23.** – Análise de expressão diferencial do gene MAPK8IP2 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[076] **Figura 24.** – Análise de expressão diferencial do gene MARCKSL1 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[077] **Figura 25.** – Análise de expressão diferencial do gene MYO6 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[078] **Figura 26.** – Análise de expressão diferencial do gene PAQR6 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[079] **Figura 27.** – Análise de expressão diferencial do gene PIGL no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

[080] **Figura 28.** – Análise de expressão diferencial do gene PYCR1 no câncer de próstata, comparado com tecido normal, tumoral e metastático.

VANTAGENS DA PATENTE

[081] A definição da abordagem terapêutica individual no tratamento do câncer de próstata depende de uma identificação inicial e classificação dos genes envolvidos. A vantagem da invenção está na possibilidade da criação de perfis de painéis genéticos que possam prever o curso da neoplasia a partir de dados de sobrevida e recidiva. Ainda, indicando o risco aumentado de metástase, que acarretará diretamente na escolha correta do tratamento e conseqüentemente na redução do custo, bem como no tempo de sobrevida dos pacientes.

[082] A Figura 29 apresenta a descrição em fluxograma dos métodos utilizados para invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Painel genético para prever diagnóstico, prognóstico e predição de neoplasias de próstata, através da detecção da expressão de biomarcadores, **caracterizados pelo** grupo de genes AMH, CPLX1, GAD1, GPC2, GPRIN1, LOC100272228, MAPK8IP2, PAQR6, PATE1, PCBP3, PIGL, PVT1, RPL36A, SGK494, SLC25A27, UGT1A1, ZNF485, FASN, MARCKSL1, MYO6 e PYCR1 em que o aumento ou diminuição da expressão gênica de um ou mais biomarcadores, em comparação com um padrão, indicará recorrência, progressão ou metástase da doença.
2. Painel genético de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** realização através da análise de amostras biológicas.
3. Painel genético de acordo com as reivindicações 1 e 2 para diagnóstico de neoplasias de próstata, **caracterizado pelos** biomarcadores PAQR6 e PIGL.
4. Painel genético de acordo com as reivindicações 1 e 2 para prognóstico de neoplasias de próstata, **caracterizado pelos** biomarcadores GAD1, MAPK8IP2, PAQR6, PIGL, FASN, MARCKSL1, MYO6 e PYCR1
5. Painel genético de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** prever alterações nas vias de sinalização dos genes AMH, CPLX1, GAD1, GPC2, GPRIN1, MAPK8IP2, PAQR6, PATE1, PCBP3, PIGL, PVT1, RPL36A, SGK494, SLC25A27, UGT1A1, ZNF485, FASN, MARCKSL1, MYO6 e PYCR1 utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração, microarranjo e PCR em tempo real, não excluindo outras.
6. Painel genético de acordo com as reivindicações 1 e 5, **caracterizado por** amostra de tecido de tumor oral fresco ou parafinado e amostras de saliva de pacientes com câncer oral, não excluindo outros tipos de amostras.

DESENHOS

FIGURA 01

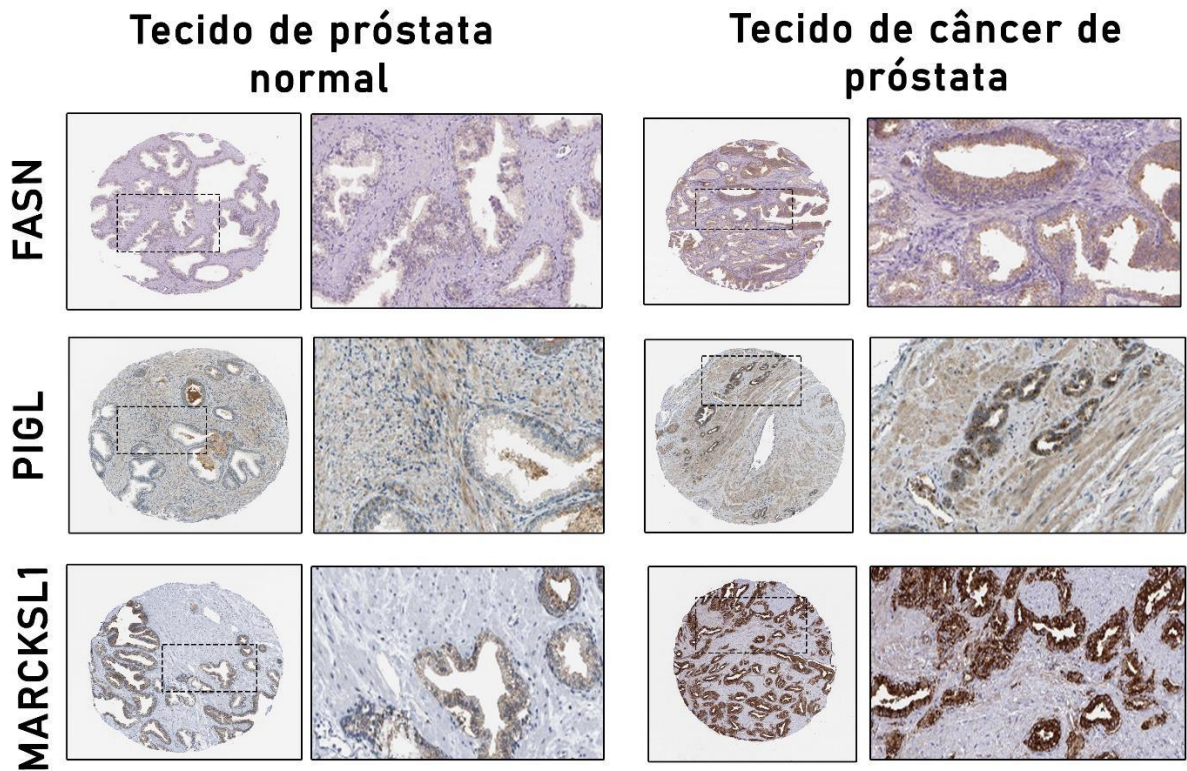


FIGURA 02

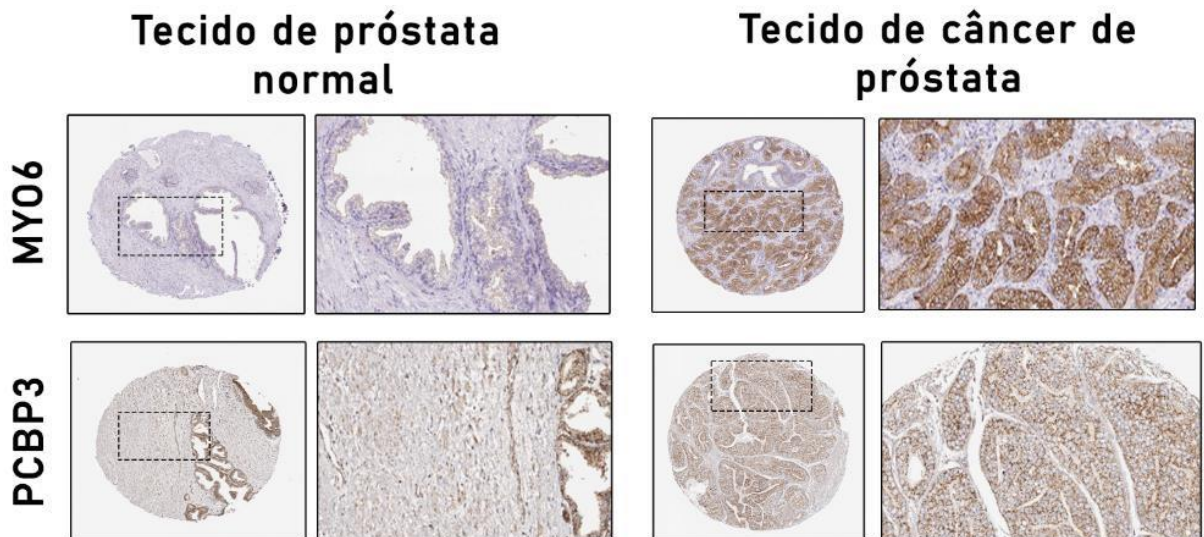


FIGURA 03

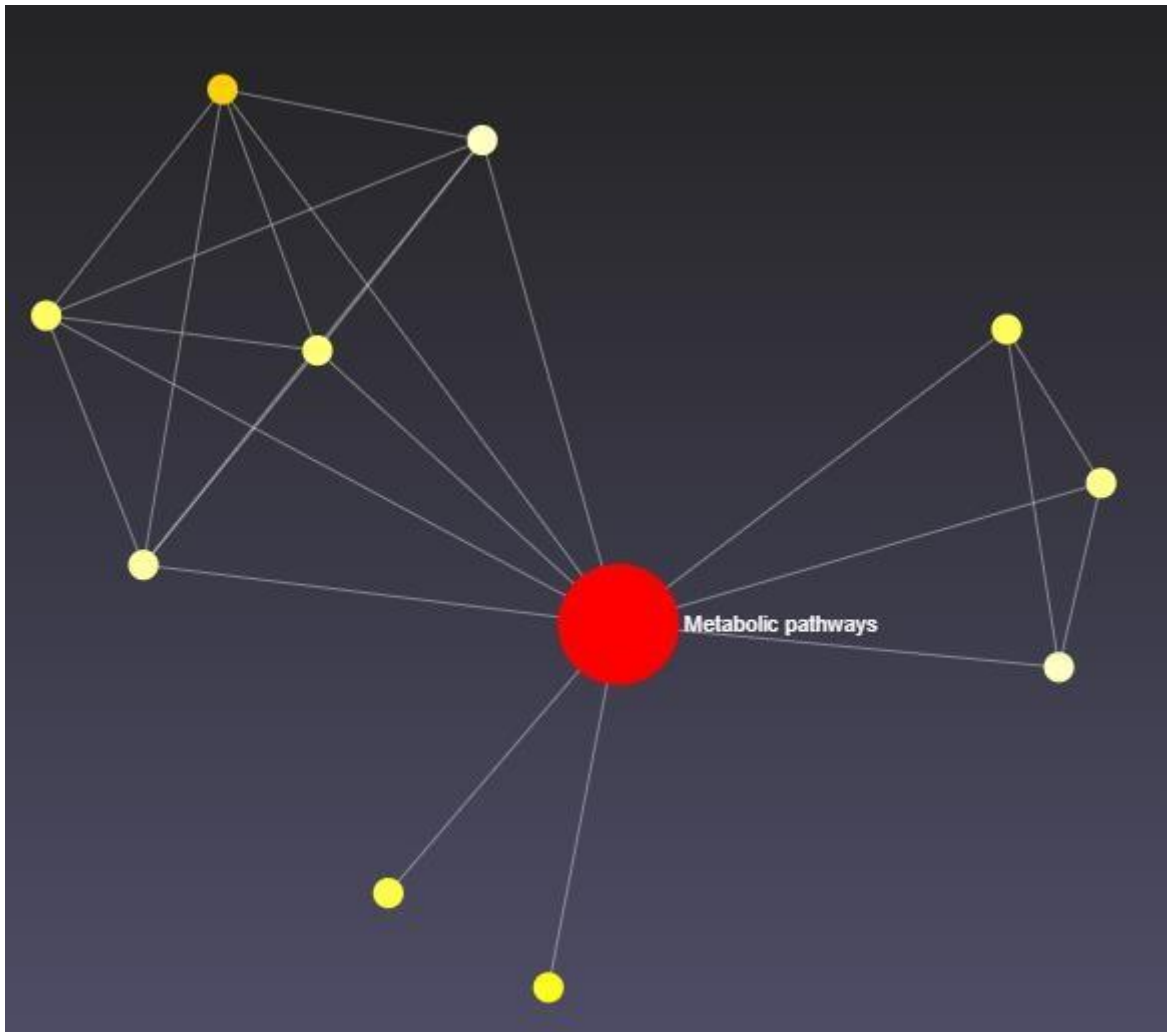


FIGURA 04

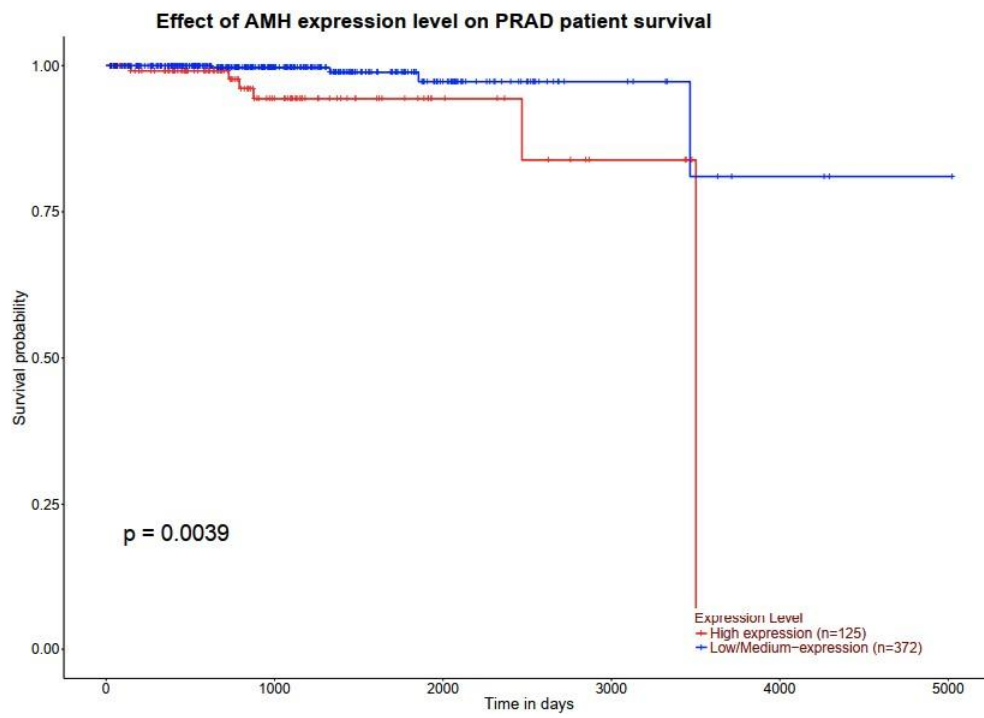


FIGURA 05

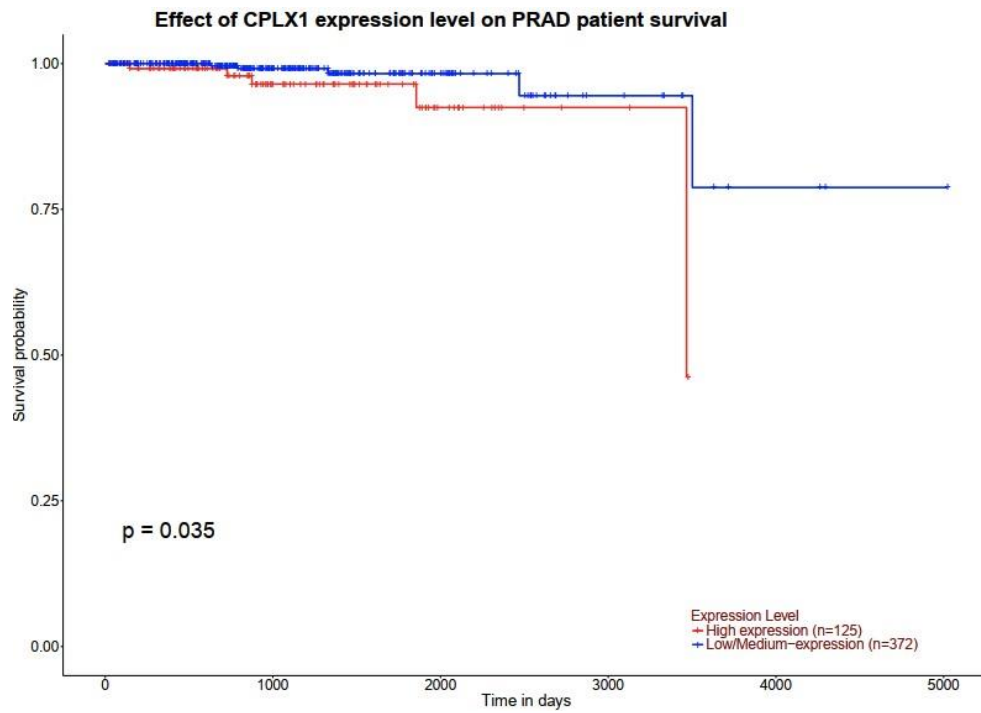


FIGURA 06

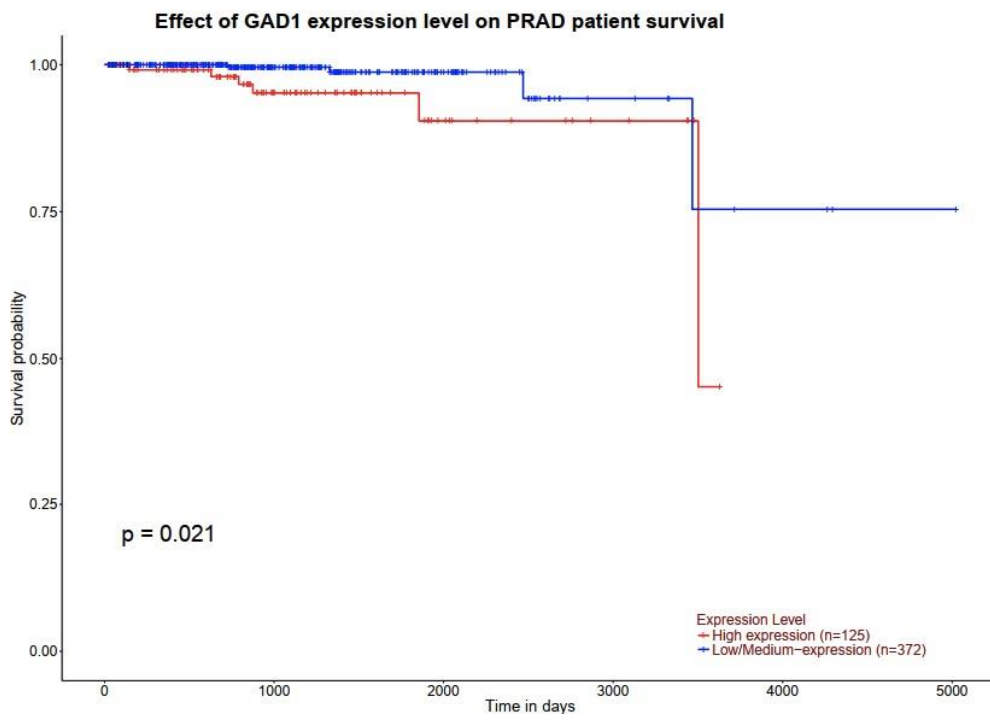


FIGURA 07

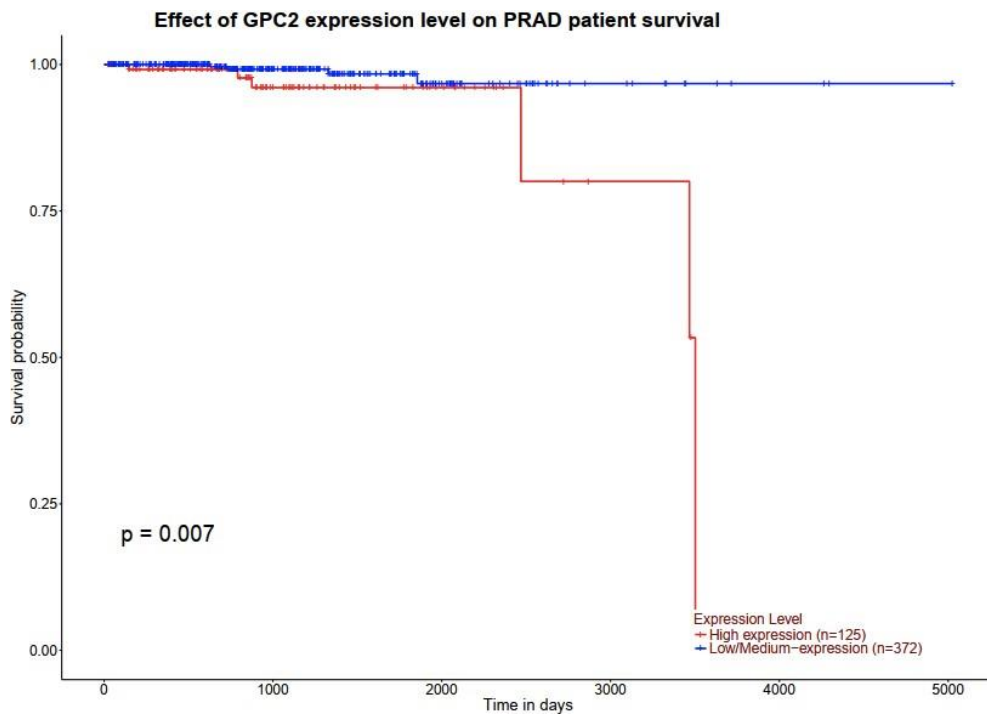


FIGURA 08

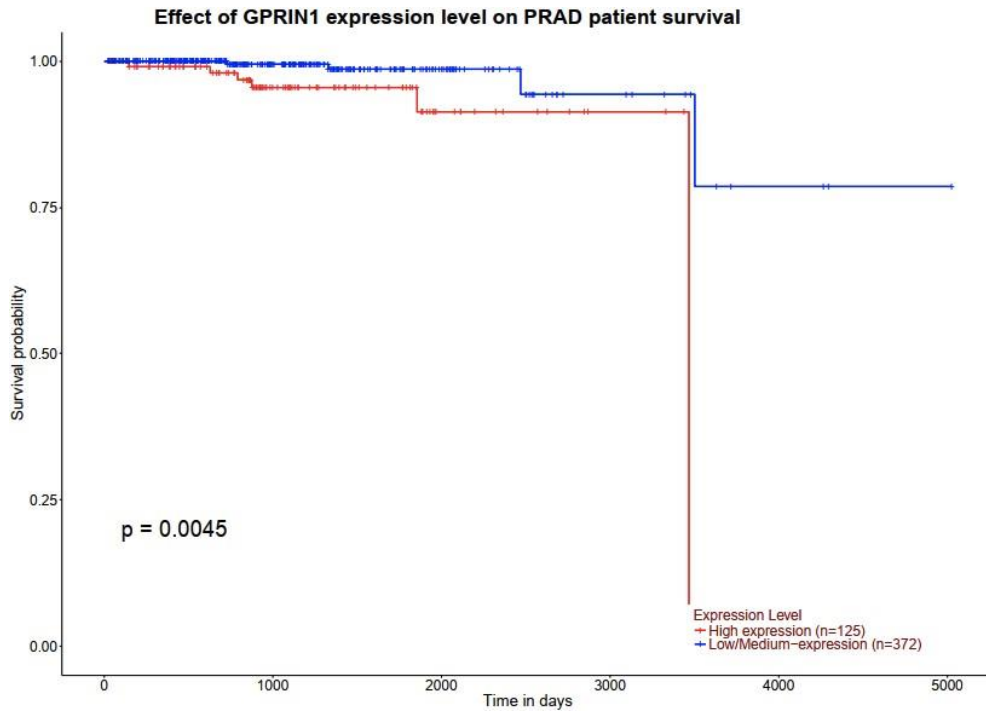


FIGURA 09

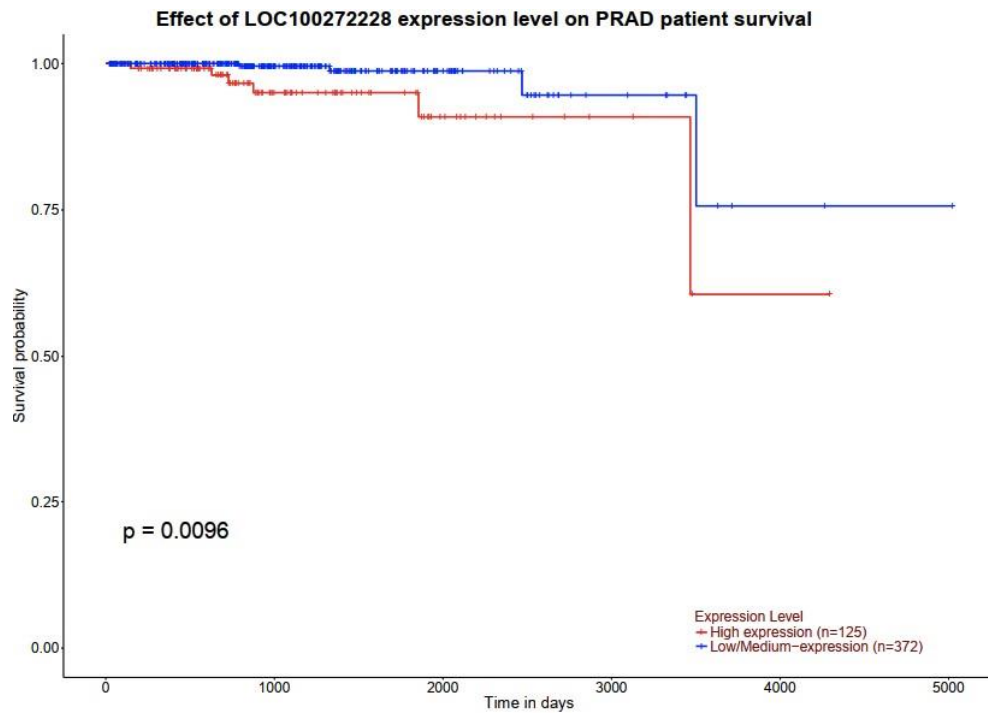


FIGURA 10

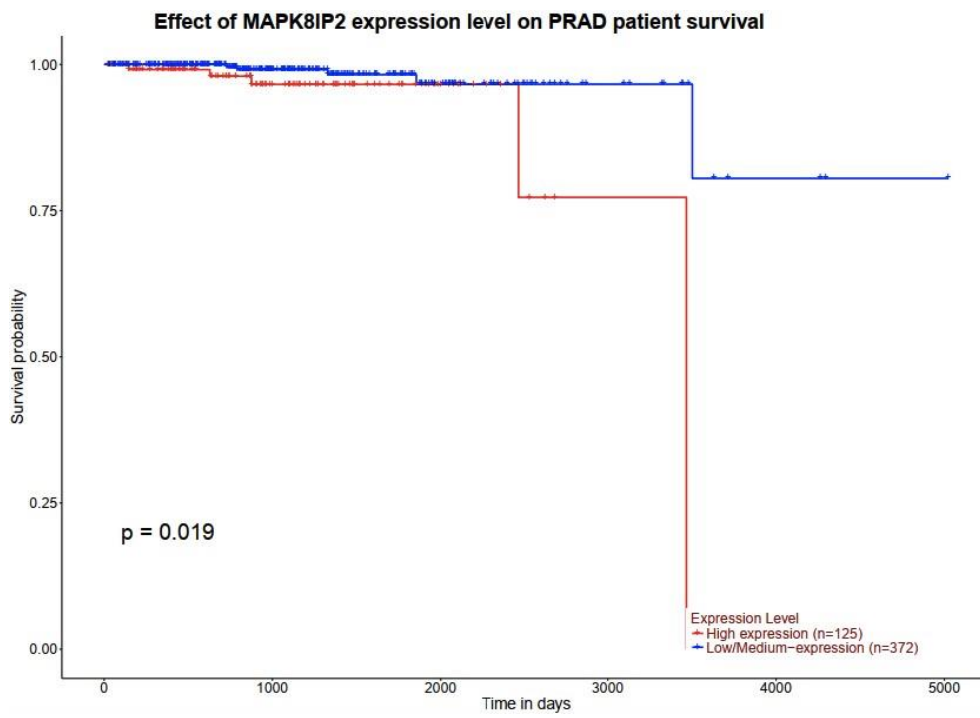


FIGURA 11

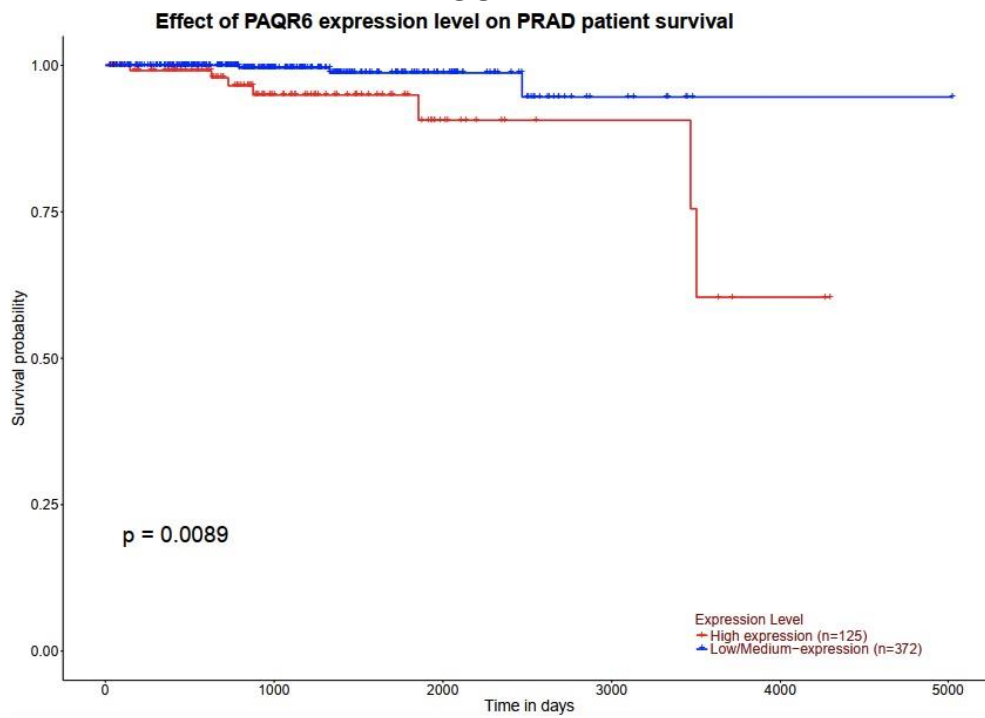


FIGURA 12

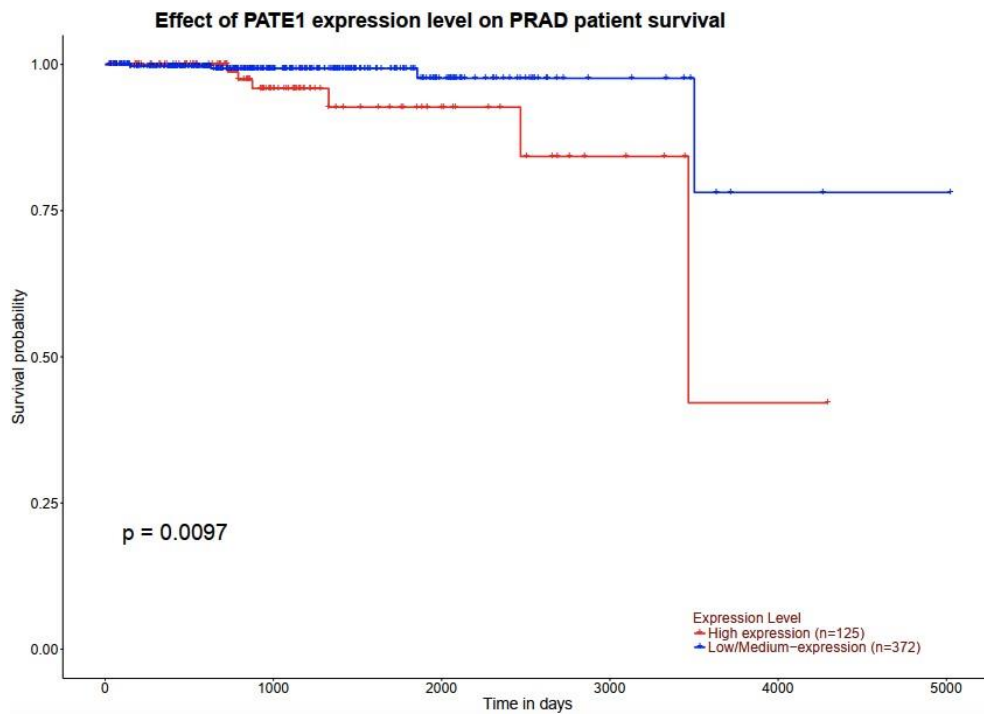


FIGURA 13

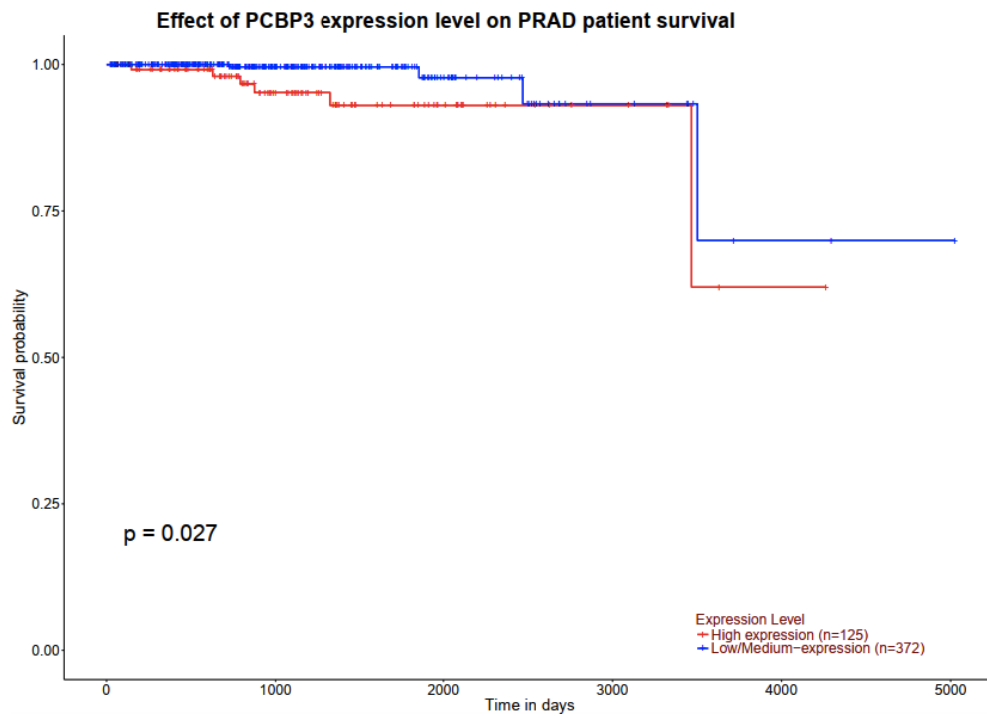


FIGURA 14

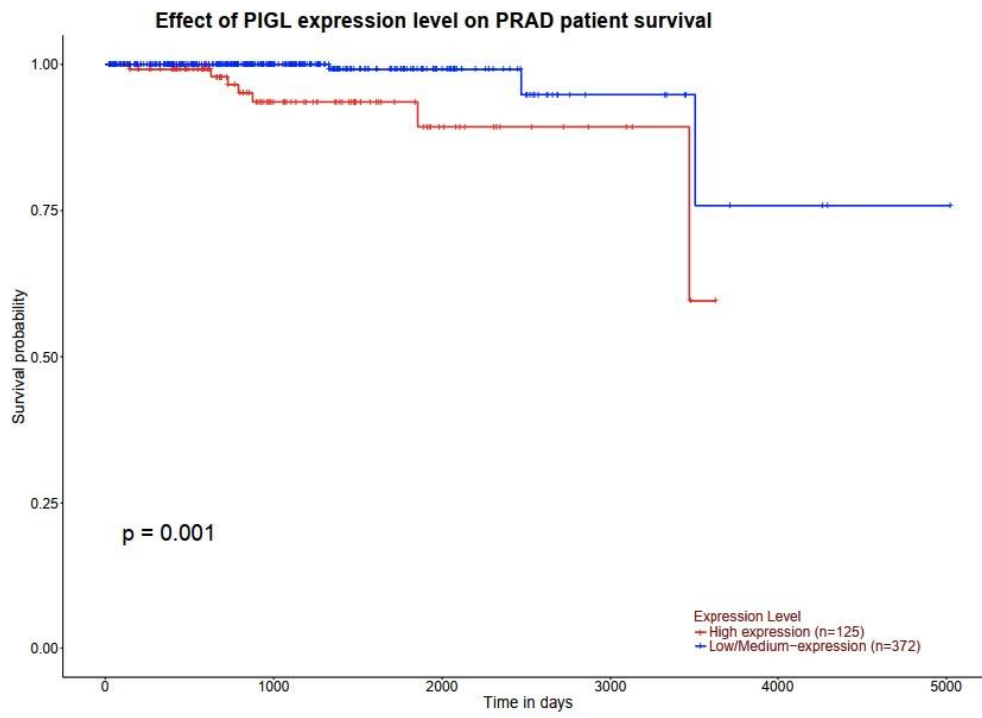


FIGURA 15

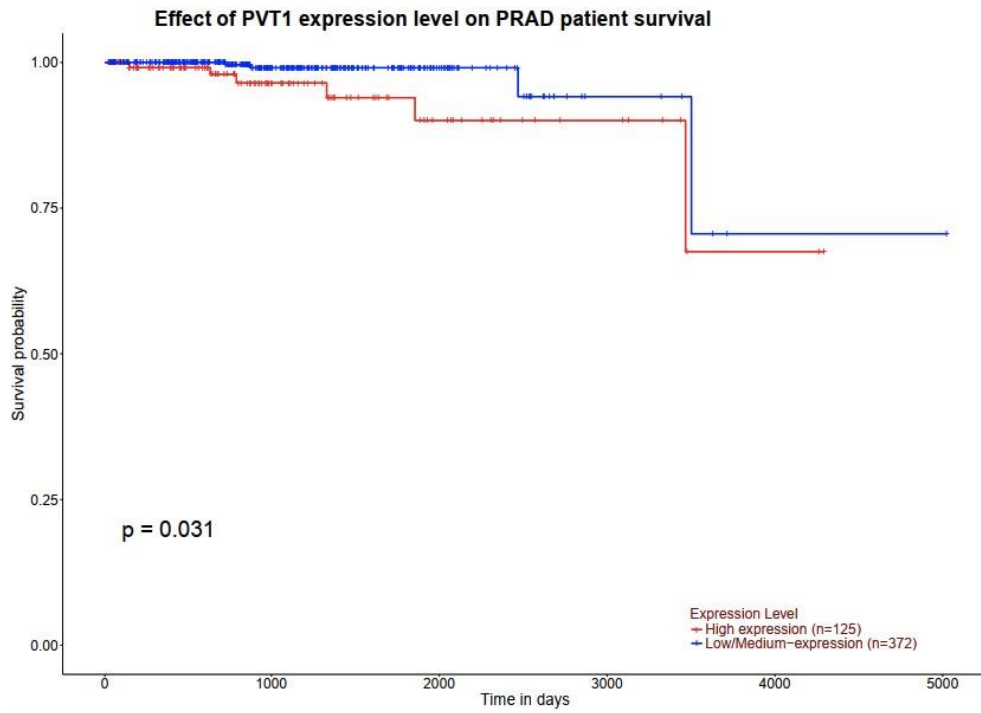


FIGURA 16

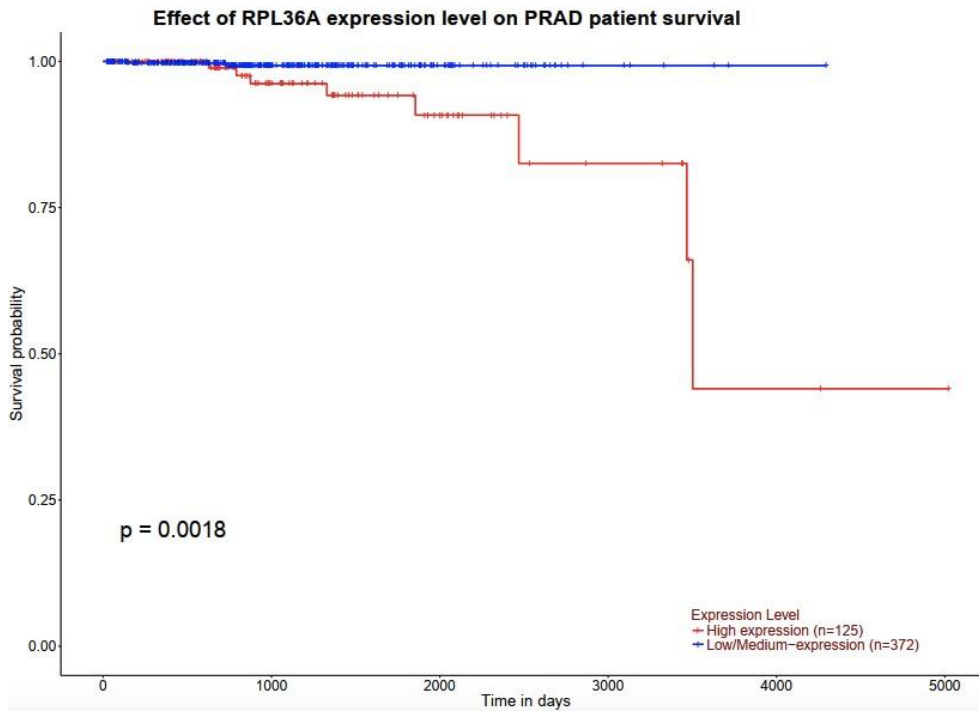


FIGURA 17

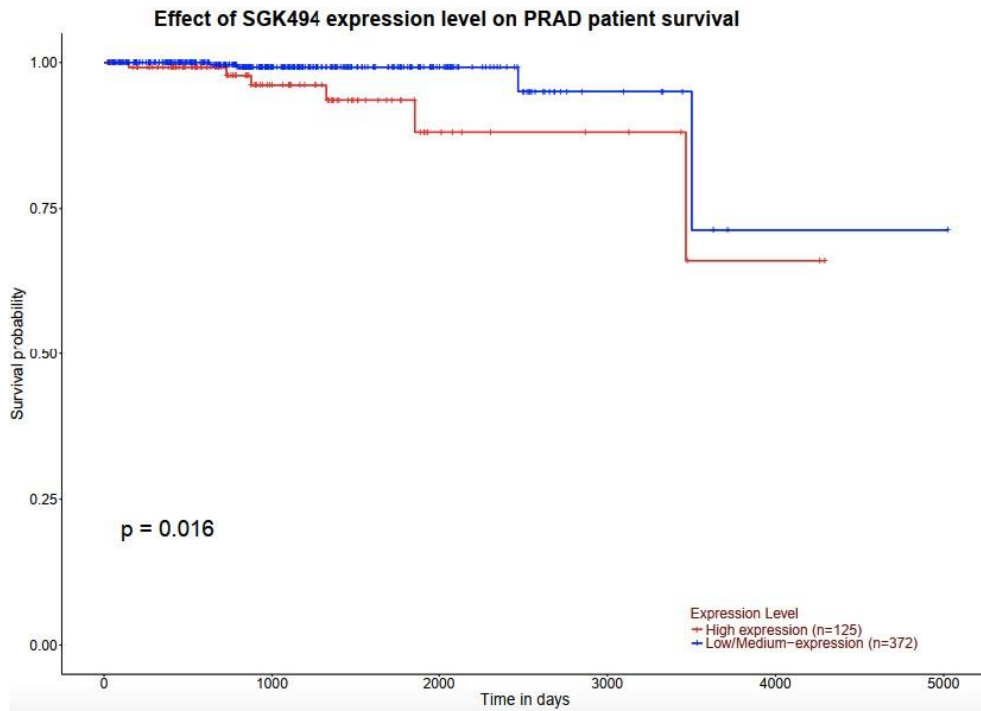


FIGURA 18

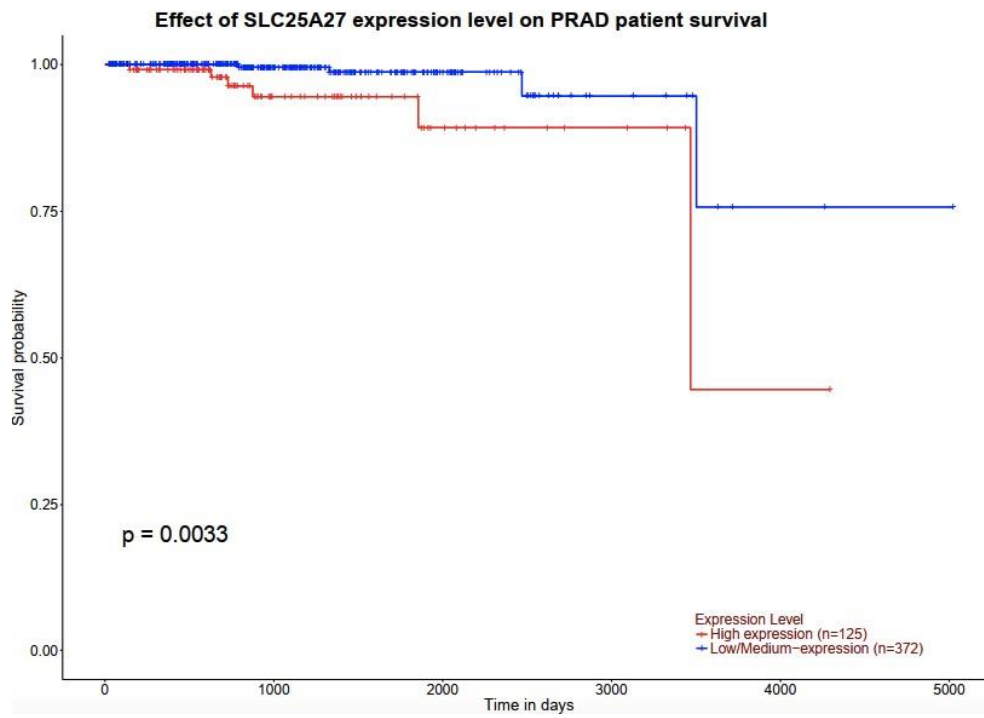


FIGURA 19

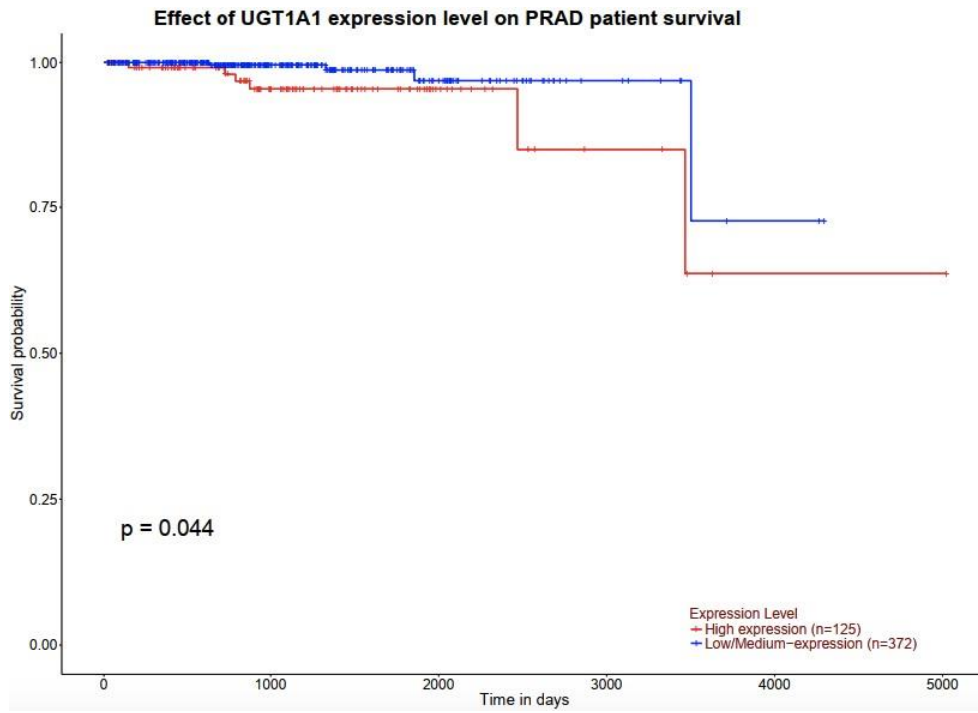


FIGURA 20

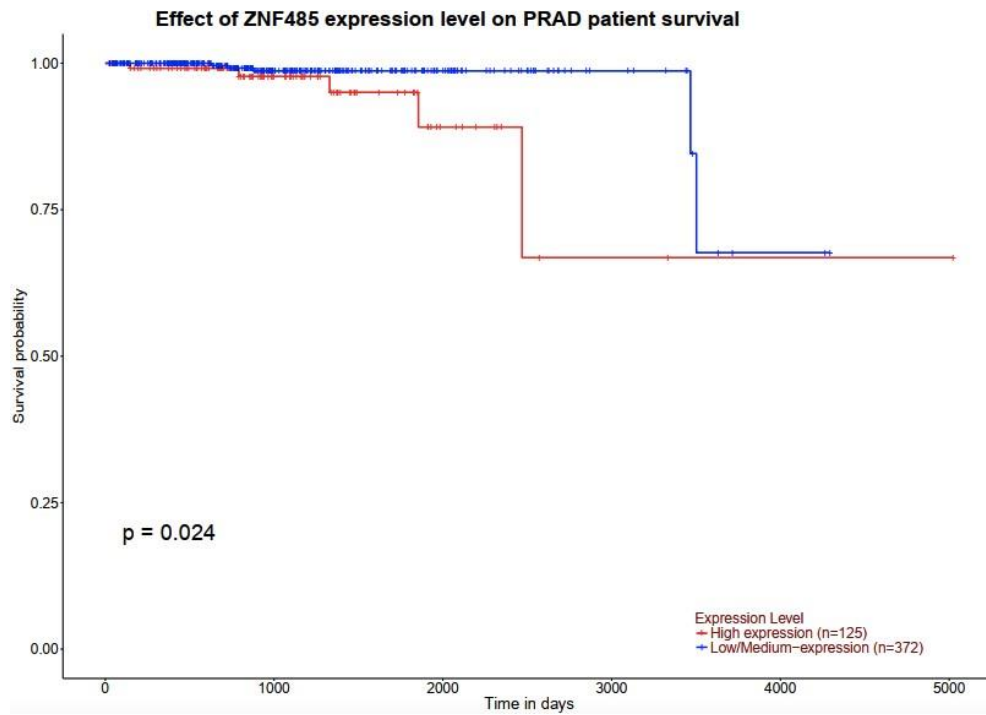
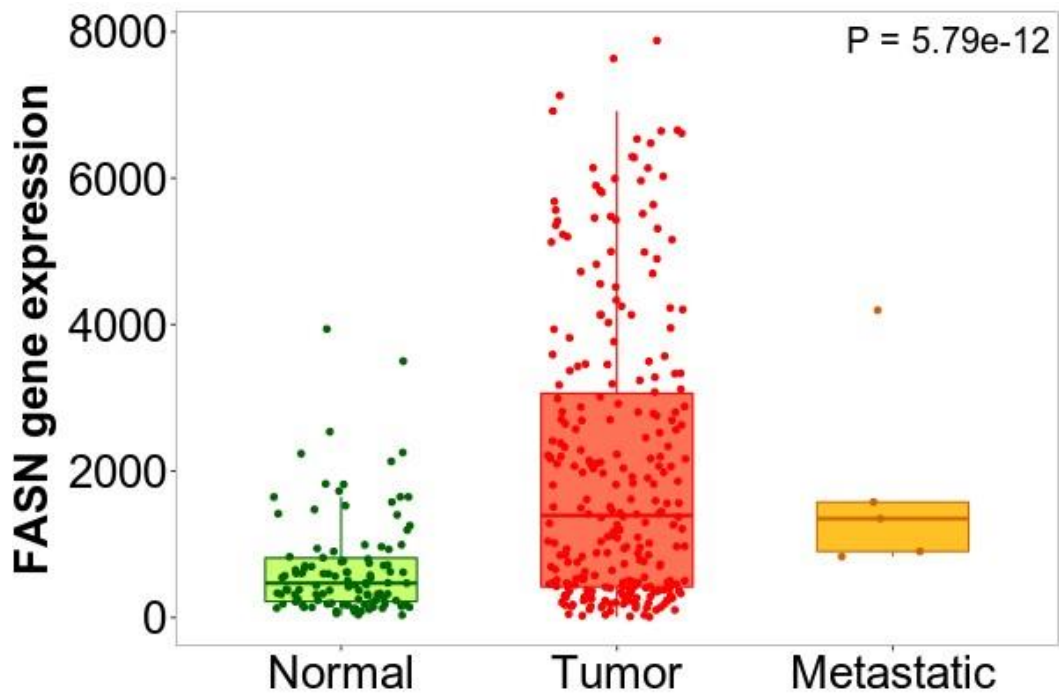


FIGURA 21



FIGUA 22

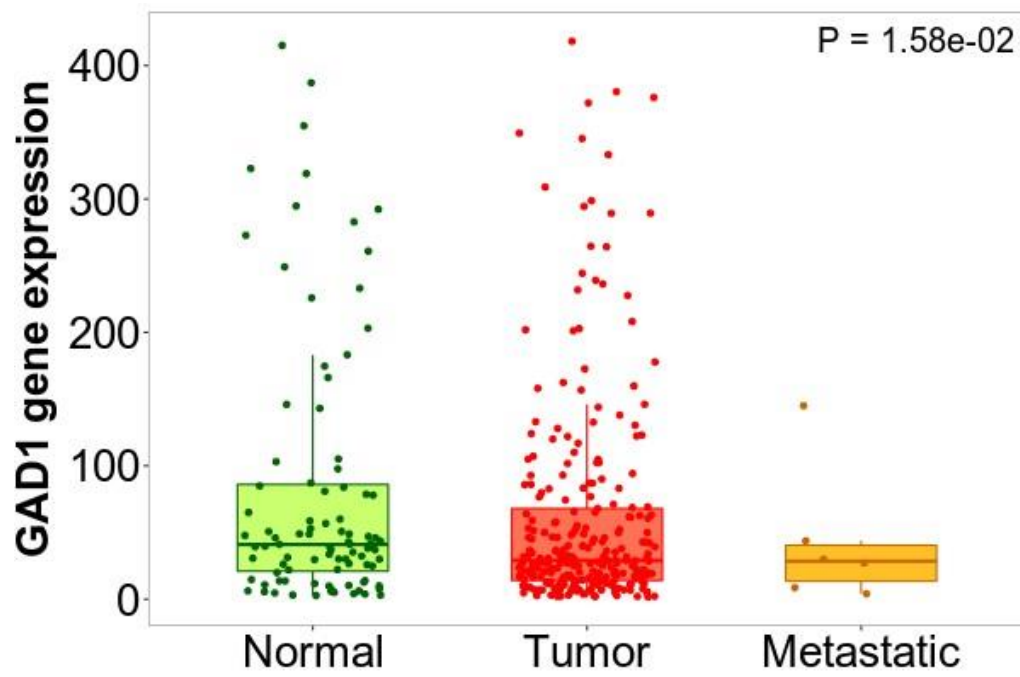


FIGURA 23

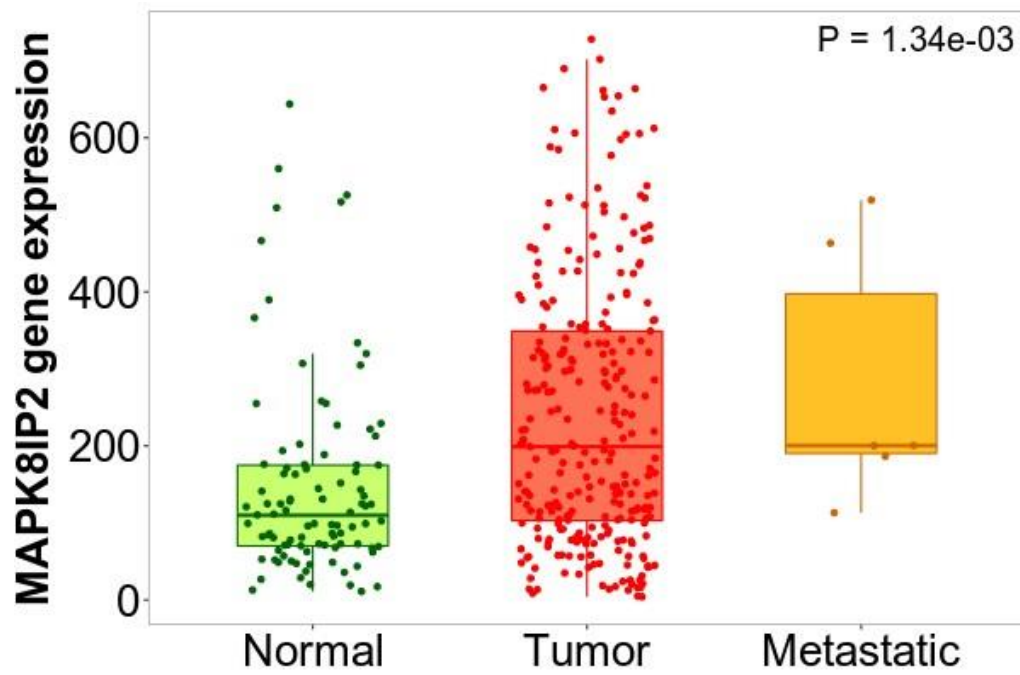


FIGURA 24

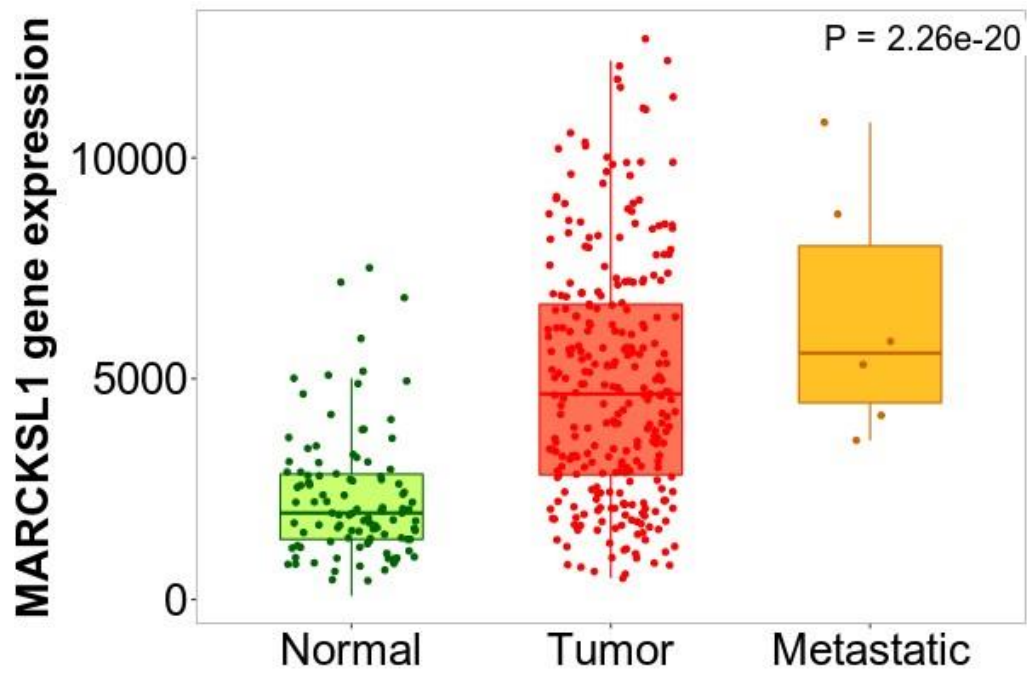


FIGURA 25

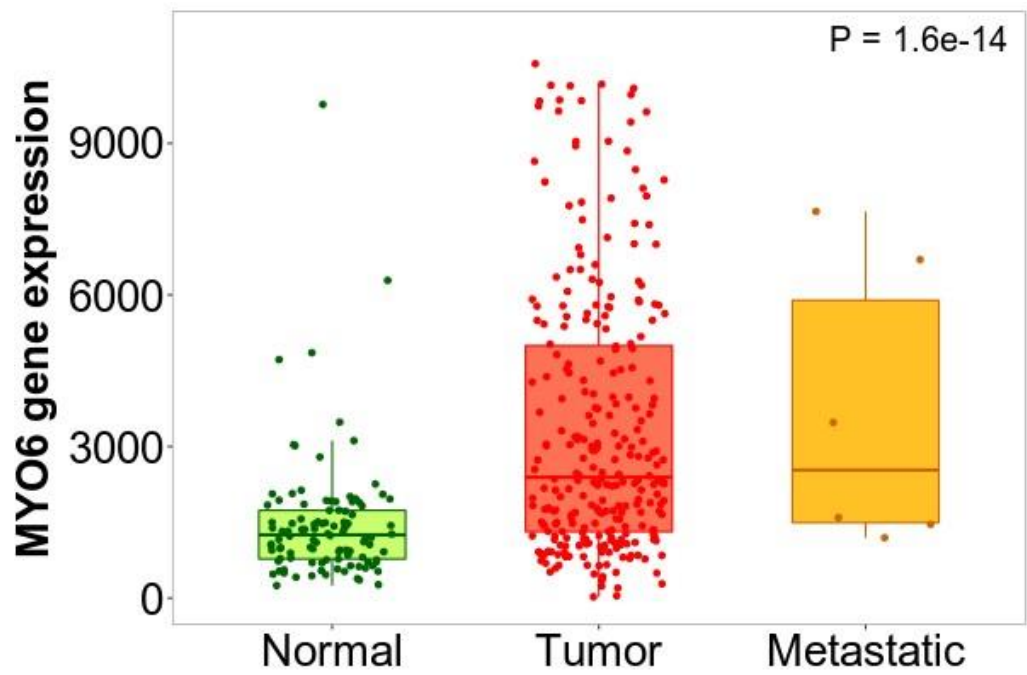


FIGURA 26

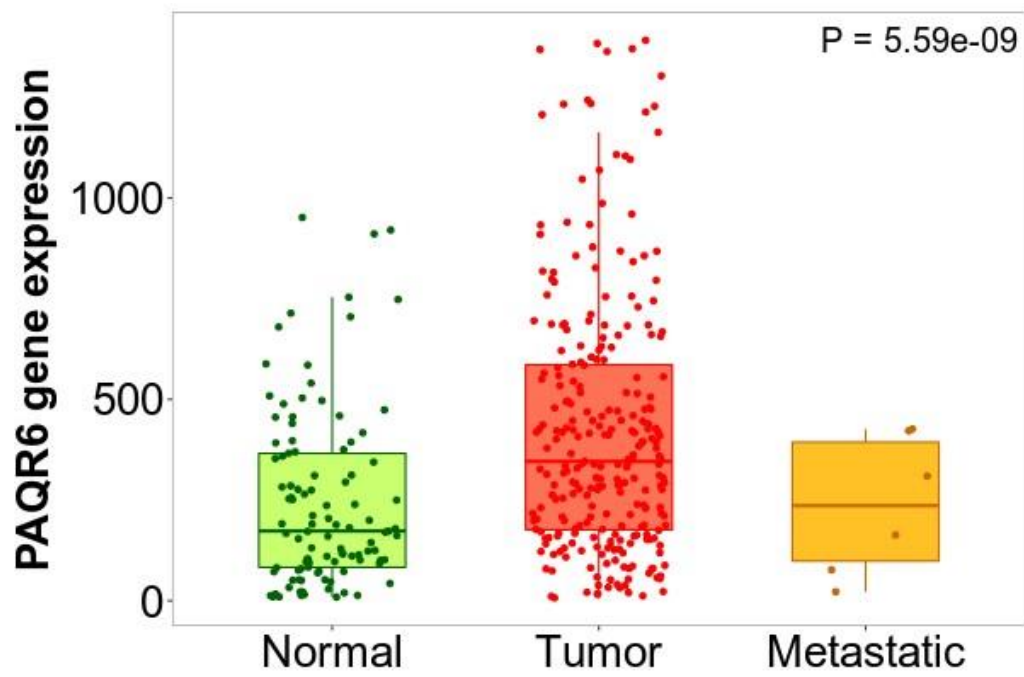


FIGURA 27

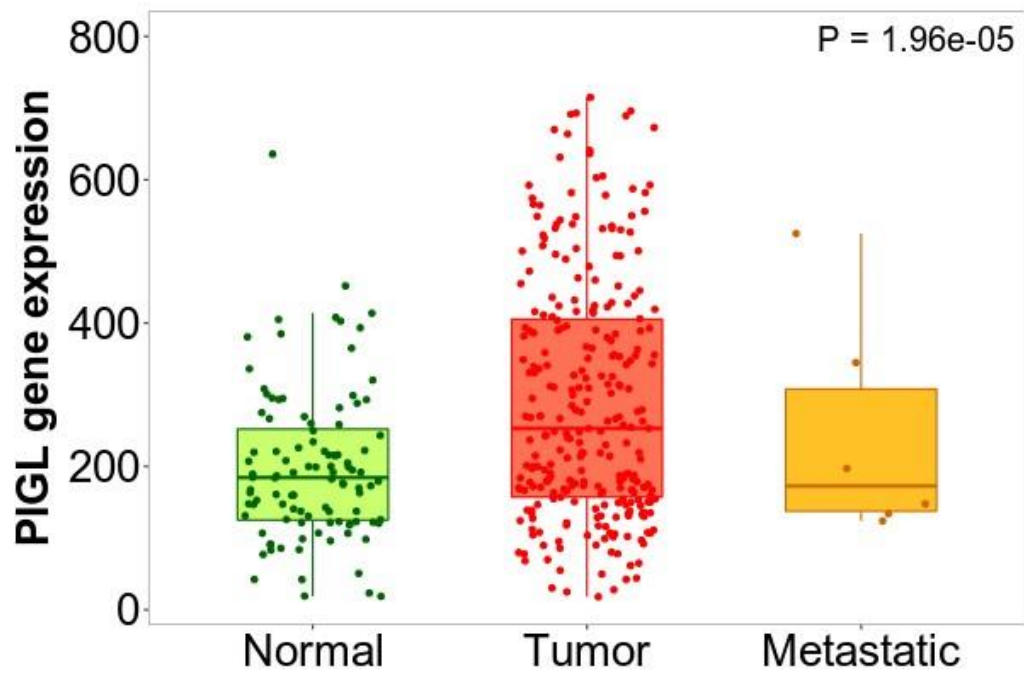


FIGURA 28

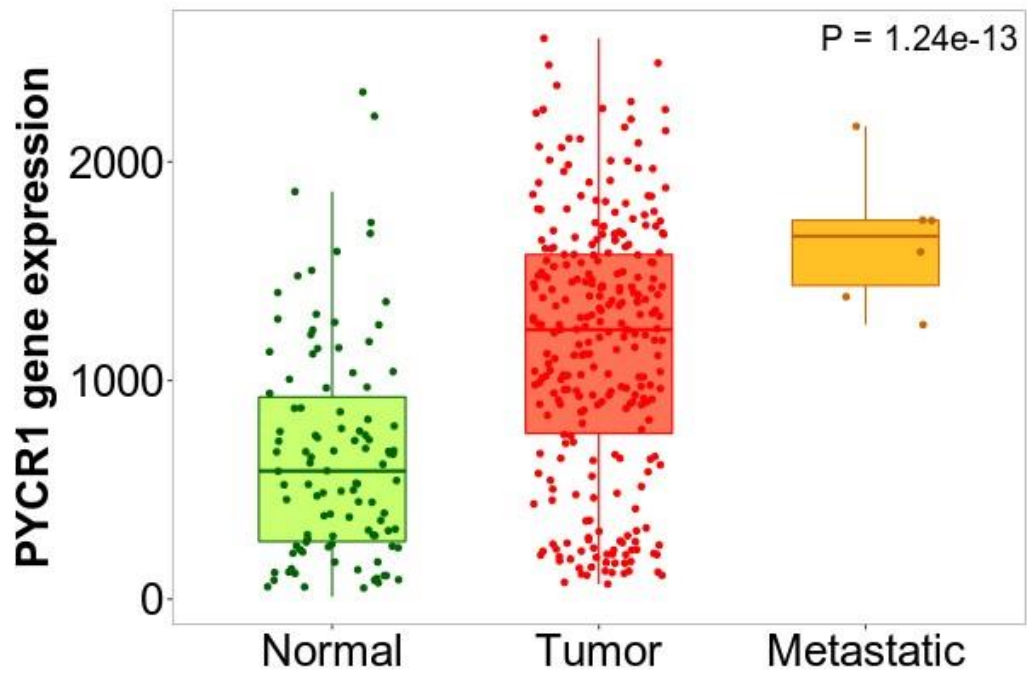
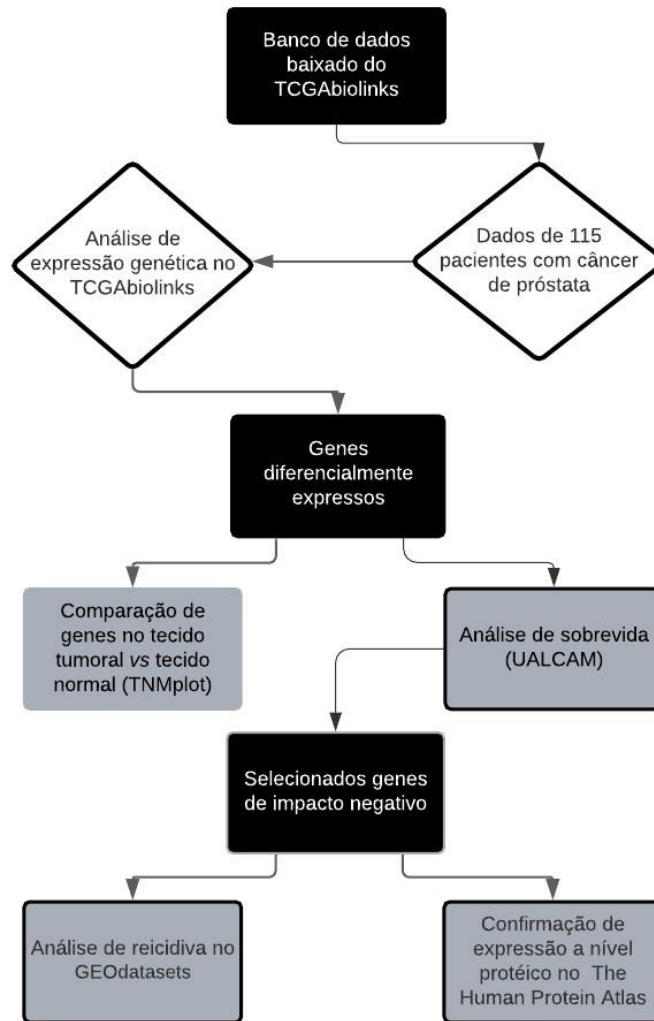


Figura 29



RESUMO

Painel genético no prognóstico e predição de neoplasia de próstata A invenção busca descrever um painel para o câncer de próstata que, a partir da identificação de biomarcadores e a expressão gênica diferencialmente aumentada, se correlacionam com sobrevida, diagnóstico, prognóstico, recidiva, progressão e possibilidade de metástase da neoplasia. O painel utiliza para as análises dados de RNAseq do TCGA; expressão diferencial pelo TCGAbiolinks no software R; identificação dos genes que impactavam negativamente na sobrevida pelo TNMplot; por fim, na identificação de vias metabólicas no NetworkAnalyst.

5. REFERENCIAS:

ABRAHAMSSON, P. A. et al. European Association of Urology Position Statement on Screening for Prostate Cancer. **European Urology**, v. 56, n. 2, p. 270–271, 2009.

AIELLO, N. M. *et al.* EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. **Developmental Cell**, 2018.

ARMY, W. R. et al. in *Black Men*. p. 304–310, 1996.

AZAM, S. H.; PECOT, C. V. Cancer's got nerve: Schwann cells drive perineural invasion. **Journal of Clinical Investigation**, 2016.

AYALA, G. E. et al. **Growth and Survival Mechanisms Associated with Perineural Invasion in Prostate Cancer**CANCER RESEARCH. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/64/17/6082/2517190/zch01704006082.pdf>>.

BASHIR, M. N. Epidemiology of prostate cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 13, p. 5137–5141, 2015.

BENAFIF, S.; KOTE-JARAI, Z.; EELES, R. A. A review of prostate cancer Genome-Wide Association Studies (GWAS). **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 27, n. 8, p. 845–857, 2018.

BOCKMAN D. E; BÜCHLER M.; BEGER H.G. Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. **Gastroenterology**, 1994.

BONEKAMP, D. et al. Advancements in MR imaging of the prostate: From diagnosis to interventions. **Radiographics**, v. 31, n. 3, p. 677–704, 2011.

BOYLE, P.; BRAWLEY, O. W. Prostate Cancer: Current Evidence Weighs Against Population Screening. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 59, n. 4, p. 220–224, 2009.

BRYANT, R. J.; HAMDY, F. C. Screening for Prostate Cancer: An Update. **European Urology**, v. 53, n. 1, p. 37–44, 2008.

BUNIMOVICH, Y. L., KESKINOV, A. A., SHURIN, G. V., & SHURIN, M. R. Schwann cells: a new player in the tumor microenvironment. **Cancer immunology, immunotherapy**, 2016.

CHEN, S. H., ZHANG, B. Y., ZHOU, B., ZHU, C. Z., SUN, L. Q., & FENG, Y. J. Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche. **American journal of cancer research**, 2019

CHING, C. B. et al. Does Transrectal Ultrasound Probe Configuration Really Matter? End Fire Versus Side Fire Probe Prostate Cancer Detection Rates. **Journal of Urology**, v. 181, n. 5, p. 2077–2083, 2009.

CRAWFORD, E. D. Epidemiology of prostate cancer. p. 3–12, 2003.

DAS, C. J. et al. Prostate biopsy: when and how to perform. **Clinical Radiology**, v. 74, n. 11, p. 853–864, 2019.

DEBORDE, Sylvie *et al.* Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. **Journal of Clinical Investigation**, 2016.

DEBORDE, Sylvie; WONG, Richard J. How Schwann cells facilitate cancer progression in nerves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2017.

EPSTEIN, J. I. An Update of the Gleason Grading System. **Journal of Urology**, v. 183, n. 2, p. 433–440, 2010.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893–2917, 2010.

FURLANA, A., ADAMEYKO, I. Schwann cell precursor: a neural crest cell in disguise? **Developmental Biology**. 10.1101. 2018.

GREENE, K. L. et al. Prostate Specific Antigen Best Practice Statement: 2009 Update. **Journal of Urology**, v. 182, n. 5, p. 2232–2241, 2009.

GOKEY, N. G. *et al.* Developmental Regulation of MicroRNA Expression in Schwann Cells. **Molecular and Cellular Biology**, 2012.

HUMPHREY, P. A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. **Modern Pathology**, v. 17, n. 3, p. 292–306, 2004.

HUMPHREY, P. A. Histopathology of prostate cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 10, 1 out. 2017.

ICZKOWSKI, K. A.; VAN LEENDERS, G. J. L. H.; VAN DER KWAST, T. H. The 2019 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on

Grading of Prostatic Carcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 45, n. 7, p. 1005–1007, 2021.

JESSEN K. R.; MIRSKY R.; LLOYD A. C. Schwann cells: development and role in nerve repair. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2015.

KHEIRANDISH, P.; CHINEGWUNDOH, F. Ethnic differences in prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 4, p. 481–485, 2011.

KOGURE, A., KOSAKA, N., & OCHIYA, T. Cross-talk between cancer cells and their neighbors via miRNA in extracellular vesicles: an emerging player in cancer metastasis. **Journal of biomedical science**, 26(1), 7. 2019.

LARNE, Olivia *et al.* MIR-183 in prostate cancer cells positively regulates synthesis and serum levels of prostate-specific antigen. **European Urology**, v. 68, n. 4, p. 581–588, 2015.

LIEBIG, C. et al. Perineural Invasion in Cancer A Review of the Literature. **Cancer**, v. 115, p. 3379–91, 2009.

LO, H. C.; ZHANG, X. H.F. EMT in Metastasis: Finding the Right Balance. **Developmental Cell**. [S.l: s.n.], , 2018

LOJANAPIWAT, B. et al. Correlation and diagnostic performance of the prostate-specific antigen level with the diagnosis, aggressiveness, and bone metastasis of prostate cancer in clinical practice. **Prostate International**, v. 2, n. 3, p. 133–139, 2014.

MCCUBREY, J. A. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. [S.l: s.n.], , 2007.

MERRICK, G. S. et al. Incidence of Repeat Prostate Biopsy in Men Undergoing Transperineal Template Guided Mapping Biopsy for an Elevated PSA. n. January 2005, p. 1–5, 2020.

MOTTET N; CORNFORD P; VAN DEN BERGH RCN. EAU-ESTRO-ESURSIOG guide- lines on prostate cancer. **European Association of Urology 2021 (Update 2021)**., 2021.

NAJI, A., FAVIER, B., DESCHASEAUX, F., ROUAS-FREISS, N., EITOKU, M., & SUGANUMA, N. Mesenchymal stem/stromal cell function in modulating cell death. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 56. 2019.

NAPOLI, I. *et al.* A Central Role for the ERK-Signaling Pathway in Controlling Schwann Cell Plasticity and Peripheral Nerve Regeneration In Vivo. **Neuron**, 2012.

NOGUTI, J. *et al.* Metastasis from Oral Cancer: An Overview. **Cancer Genomics & Proteomics**, 2012.

PASTUSHENKO, I. *et al.* Identification of the tumour transition states occurring during EMT. **Nature**, 2018.

POURESMAEILI, F. *et al.* Evaluation of environmental risk factors for prostate cancer in a population of Iranian patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 24, p. 10603–10605, 2014.

ROSS, Michel H.; PAWLINA, Wojciech. **Ross histologia: texto e atlas: correlações com biologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SCHRÖDER, F. H. *et al.* Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 13, p. 1320–1328, 2009.

SMITH, R. A. *et al.* Cancer screening in the United States, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n. 2, p. 87–105, 2013.

SROKA, I. C. *et al.* The laminin binding integrin $\alpha 6\beta 1$ in prostate cancer perineural invasion. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 2, p. 283–288, 2010.

TAFURI, A. *et al.* Association between Basal Total Testosterone Levels and Prostate Cancer D'Amico Risk Classes. **Urologia Internationalis**, v. 104, n. 9–10, p. 716–723, 2020.

THOMAS, D., & RADHAKRISHNAN, P. Tumor-stromal crosstalk in pancreatic cancer and tissue fibrosis. **Molecular cancer**, 18(1), 14. 2019.

TOURINHO-BARBOSA, R. R.; POMPEO, A. C. L.; GLINA, S. Prostate cancer in Brazil and Latin America: Epidemiology and screening. **International Braz J Urol**, v. 42, n. 6, p. 1081–1090, 2016.

ZAREBA, P. *et al.* Perineural invasion and risk of lethal prostate cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 26, n. 5, p. 719–726, 2017.

ZHANG, L. J. *et al.* Perineural invasion as an independent predictor of biochemical recurrence in prostate cancer following radical prostatectomy or radiotherapy: A systematic review and meta-analysis. **BMC Urology**, v. 18, n. 1, 1 fev. 2018.

WANG, M., ZHAO, J., ZHANG, L., WEI, F., LIAN, Y., WU, Y., GONG, Z., ZHANG, S., ZHOU, J., CAO, K., GUO, C. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, 8(5), 761-773. 2017.

WELCH, H. G. et al. Detection of prostate cancer via biopsy in the medicare-SEER population during the PSA era. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 18, p. 1395–1400, 2007.

WEBBER, Christine A. *et al.* Schwann cells direct peripheral nerve regeneration through the Netrin-1 receptors, DCC and Unc5H2. **GLIA**, 2011.

WELCH, H. G.; SCHWARTZ, L. M.; WOLOSHIN, S. Prostate-specific antigen levels in the United States: Implications of various definitions for abnormal. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 15, p. 1132–1137, 2005.

WIWANITKIT, V. Prostate specific antigen for screening for prostate cancer: An appraisal of thai reports. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 5, n. 4, p. 406–408, 2004.