



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

**JOÃO NUNES CALDEIRA MARINHO MATOS**

***QUIMIOPREVENÇÃO DO CANCRO DA PRÓSTATA  
– MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS***

**ARTIGO DE REVISÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:**

**DR. CARLOS RABAÇA**

**PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO**

**MARÇO/2015**

**ÍNDICE**

I – Resumo/Abstract.....	3
II – Lista de Abreviaturas e Acrónimos.....	7
III – Introdução.....	10
IV – Materiais e Métodos.....	13
V – Resultados e Discussão.....	14
1. Fatores de Risco e Evolução do Cancro da Próstata.....	14
2. As Vias de Sinalização Celular.....	16
2.1.As Vias de Sinalização Celular no Cancro da Próstata.....	16
2.1.1. Sinalização pela Via do Recetor de Androgénios.....	17
2.1.2. Sinalização pela Via do PI3K/Akt/mTOR.....	20
2.1.3. Sinalização pela Via do NF- $\kappa$ B.....	22
2.1.4. Sinalização pela Via do Wnt/catenina- $\beta$ .....	23
2.1.5. Outras Vias de Sinalização Celular.....	24
2.2.As Vias de Sinalização Celular como Alvos para a Quimioprevenção do Cancro da Próstata.....	26
3. A Inflamação e o <i>Stress</i> Oxidativo.....	32
3.1.A Influência da Inflamação e do <i>Stress</i> Oxidativo no Cancro da Próstata.....	32
3.2.A Inflamação e o <i>Stress</i> Oxidativo como Alvos para a Quimioprevenção do Cancro da Próstata.....	39
4. A Epigenética.....	42
4.1.O Papel da Epigenética no Cancro da Próstata.....	42
4.1.1. Metilação do DNA.....	43
4.1.2. Alterações nas Histonas.....	45
4.1.3. Silenciamento Mediado por miRNAs.....	48

4.2. A Epigenética como Alvo para a Quimioprevenção do Cancro da Próstata.....	49
VI – Conclusão.....	55
VII – Agradecimentos.....	61
VIII – Referências.....	62

**I – RESUMO**

*Introdução:* O cancro da próstata mantém-se como um dos mais incidentes a nível mundial e nacional. O seu tratamento, apesar de poder ser curativo, acarreta importantes comorbilidades. A estratégia deverá, portanto, passar pela prevenção desta doença, que pode ser conseguida através da eliminação dos seus fatores de risco e/ou da quimioprevenção. Esta compreende o uso de agentes naturais, sintéticos ou biológicos para reverter, suprimir ou prevenir as fases iniciais da carcinogénese ou a progressão de uma lesão pré-maligna para doença invasiva. De modo a intervir sobre a carcinogénese importa conhecer os mecanismos fisiopatológicos que dela fazem parte. Assim, neste trabalho, reveem-se os principais fatores de risco para o cancro da próstata e os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão tumorais, com foco na sinalização celular, na inflamação e *stress* oxidativo, e nas alterações epigenéticas. Tenta-se, também, transpor esses conhecimentos para a prática clínica.

*Materiais e Métodos:* Na procura de literatura foram pesquisadas revisões e artigos originais nas bases de dados The Cochrane Library e Pubmed/Medline. Para a pesquisa dos dados estatísticos, consultaram-se os *websites* oficiais da International Agency for Research on Cancer e da Direção Geral de Saúde.

*Resultados e Discussão:* São várias as vias de sinalização que, por estimularem o crescimento celular e inibirem a apoptose, estão envolvidas na carcinogénese da próstata. Entre elas, a via do recetor de androgénio é a mais preponderante e, também, a mais estudada. A inibição desta via, através do bloqueio da 5- $\alpha$ -redutase, é a única que, até hoje, mostrou reduzir eficazmente, em humanos, o risco de desenvolvimento de cancro da próstata. Contudo, o bloqueio farmacológico daquela enzima no sentido da quimioprevenção não é, ainda, utilizado consensualmente na prática clínica. Outras vias de sinalização, como a do PI3K/Akt/mTOR, do NF- $\kappa$ B e do Wnt/catenina- $\beta$  são, igualmente, importantes no desenvolvimento tumoral, e estão associadas a maior agressividade e resistência ao tratamento. A inflamação, pela

contínua libertação de citocinas e fatores de crescimento, promove o desenvolvimento e progressão tumorais. Além disso através da produção maciça de ROS, é criado um forte estado de *stress* oxidativo, prejudicial à viabilidade celular. Alvejar a inflamação e o *stress* oxidativo na quimioprevenção do cancro da próstata não é, contudo, eficaz. As alterações epigenéticas, através da metilação do DNA, das alterações nas histonas (metilação, acetilação e desacetilação), e da regulação pelos miRNAs, silenciam os genes supressores tumorais e aumentam a expressão dos oncogenes. No momento atual, a intervenção nos mecanismos epigenéticos para prevenir o cancro da próstata não é, ainda, uma realidade.

*Conclusão:* Apesar de serem, já, conhecidos alguns dos mecanismos fisiopatológicos integrantes da carcinogénese da próstata, a sua modulação para a quimioprevenção do cancro da próstata ainda não é uma realidade na prática clínica. Devem ser continuados os estudos no sentido de aprofundar a compreensão do papel de cada mecanismo fisiopatológico no desenvolvimento tumoral, e de esclarecer as complexas interações entre esses mesmos mecanismos.

*Palavras-chave:* Cancro da Próstata; Quimioprevenção; Fisiopatologia; Sinalização Celular; Inflamação; *Stress* Oxidativo; Epigenética.

**I – ABSTRACT**

*Introduction:* Prostate cancer remains as one of the most incident cancers, at both global and national scale. Although its treatment can be curative, it carries major co-morbidities. Therefore, prevention should be the first line strategy. This approach may be achieved by the elimination of risk factors and/or by chemoprevention, which is defined as the use of natural, synthetic or biological agents to revert, suppress or prevent the early phases of carcinogenesis or the progression from a pre-neoplastic lesion into invasive disease. In order to act on carcinogenesis, one should be familiar with the pathophysiological mechanisms involved in that process. The purpose of this work is to review the major prostate cancer risk factors and the most important pathophysiological mechanisms implicated in tumor development and progression, focusing on cell signaling pathways, on inflammation and oxidative stress, and on epigenetic alterations. It is also intended to apply that knowledge to clinical practice.

*Materials and Methods:* Reviews and original articles were searched at The Cochrane Library and Pubmed/Medline databases. Statistical data were obtained at the International Agency for Research on Cancer and Direção Geral de Saúde official websites.

*Results and Discussion:* Various signaling pathways promote prostate carcinogenesis by stimulating cellular growth and inhibiting apoptosis. The most important and the most studied one is the androgen receptor pathway. Until now inhibition of this pathway through blockage of enzyme 5- $\alpha$ -reductase is the only mechanism proven to significantly reduce the risk of prostate cancer development. Nevertheless, chemoprevention of prostate cancer by pharmacological blockage of that enzyme is not regularly used in clinical practice. Other signaling pathways, such as PI3K/Akt/mTOR, NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin, are also important in tumor development, and are associated with stronger aggressiveness and resistance to treatment. Inflammation, through continuous cytokines and growth factors release, promotes tumor development and progression. Also, during chronic inflammation there is a massive

ROS production, which contributes to oxidative stress, known to be harmful to cell viability. Despite these facts, chemoprevention of prostate cancer by reducing inflammation and oxidative stress is not effective. Epigenetic changes, particularly DNA methylation, histone modifications (methylation, acetylation and deacetylation), and miRNA interference, silence tumor suppressor genes and enhance oncogenes expression. Nevertheless, it is still not possible to prevent prostate cancer by modulating epigenetic mechanisms.

*Conclusion:* Even though some of the pathophysiological mechanisms that promote prostate carcinogenesis are partially understood, chemoprevention in clinical practice is far from being a reality. Studies should continue to better understand the role of each pathophysiological mechanism in tumor development, and to clarify the complex interactions between those mechanisms.

*Keywords:* Prostate Cancer; Chemoprevention; Pathophysiology; Cell Signaling; Inflammation; Oxidative Stress; Epigenetic

**II – LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS**

3 $\alpha$ -diol G – glucoronido de 3 $\alpha$ -diol (do inglês, *3 $\alpha$ -diol-glucuronide*)

5-AR – 5- $\alpha$ -redutase

5-ARI – inibidor da 5- $\alpha$ -redutase (do inglês, *5- $\alpha$ -reductase inhibitor*)

AAS – ácido acetilsalicílico

Akt – proteína cinase B

AR – recetor de androgénios (do inglês, *androgen receptor*)

COX – ciclooxigenase

CRPC – carcinoma da próstata resistente à castração (do inglês, *castration resistant prostate cancer*)

DHT – dihidrotestosterona (do inglês, *dihydrotestosterone*)

DHT S – sulfato de DHT (do inglês, *DHT sulfate*)

DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)

DNMT – metiltransferase do DNA (do inglês, *DNA methyltransferase*)

DST – doenças sexualmente transmissíveis

ER – recetor dos estrogénios (do inglês, *estrogen receptor*)

EZH2 – potenciador do homólogo de *zeste-2* (do inglês, *enhancer of zeste homolog 2*)

FoxO – *Forkhead box O*

GSK3 $\beta$  – cinase-3 $\beta$  da glicogénio sintase (do inglês, *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* )

GSTP1 – glutationa s-transferase P1 (do inglês, *glutathione-S-transferase P1*)

HAT - acetiltransferase da histona (do inglês, *histone acetyltransferase*)

HBP – hiperplasia benigna prostática

HCA – aminas heterocíclicas (do inglês, *heterocyclic amine*)

HDAC – desacetilase da histona (do inglês, *histone deacetylase*)

HGPIN – neoplasia prostática intraepitelial de alto grau (do inglês, *high grade PIN*)

Hh – *Hedgehog*

HSP – proteínas de choque térmico (do inglês *heat shock proteins*)

IGF-1 – fator de crescimento insulina-*like* tipo 1 (do inglês, *insulin-like growth factor-1*)

IGF-1R – recetor do fator de crescimento insulina-*like* tipo 1 (do inglês, *insulin-like growth factor receptor-1*)

IL-6 – interleucina-6 (do inglês, *interleukin-6*)

iNOS – sintase induzível do óxido nítrico (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*)

I $\kappa$ B – inibidor do  $\kappa$ B (do inglês, *inhibitor of  $\kappa$ B*)

JAK/STAT – *Janus kinase/Signal transducers and activators of transcription*

LOX – lipooxigenase

miRNA – micro-RNA

MMP – Metaloproteinase da matriz (do inglês, *matrix metalloproteinase*).

mRNA – RNA mensageiro

mTOR – alvo mamífero da rapamicina (do inglês, *mammalian target of rapamycin*)

Neurog1 – neurogenina-1

NF- $\kappa$ B – fator nuclear- $\kappa$ B (do inglês, *nuclear factor- $\kappa$ B*)

NSAIDs – anti-inflamatórios não esteroides (do inglês, *nonsteroidal anti-inflammatories drugs*)

PCa – cancro/carcinoma da próstata (do inglês, *prostate cancer/carcinoma*)

PCPT – *Prostate Cancer Prevention Trial*

PhIP – 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (do inglês, *2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine*)

PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês, *phosphatidylinositol-3-kinase*)

PIA – atrofia inflamatória proliferativa (do inglês, *proliferative inflammatory atrophy*)

PIN – neoplasia prostática intraepitelial (do inglês, *prostatic intraepithelial neoplasia*)

PIP<sub>3</sub> – 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (do inglês, *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*)

PSA – antígeno prostático específico (do inglês, *prostate-specific antigen*)

PUFA – ácidos gordos polinsaturados (do inglês, *polyunsaturated fatty acids*)

REDUCE – *Reduction by Dutasteride of Prostate Cancer Events*

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)

RNS – espécies reativas de nitrogénio (do inglês, *reactive nitrogen species*)

ROS – espécies reativas de oxigénio (do inglês, *reactive oxygen species*)

SAM – S-adenosil-L-metionina (do inglês, *S-adenosylmethionine*)

Sirt1 – sirtuína-1

TCF – fator das células T (do inglês, *T cell factor*)

TFA – ácidos gordos-*trans* (do inglês, *trans-fatty acids*)

TNF- $\alpha$  – fator- $\alpha$  de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor- $\alpha$* )

TRAMP – Adenocarcinoma transgénico da próstata de rato (do inglês, *Trangenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate*)

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês *vascular endothelial growth factor*)

### III – INTRODUÇÃO

A uma escala global, em 2012, o carcinoma da próstata (PCa) foi o segundo cancro mais frequentemente diagnosticado nos homens (15% de todos os diagnósticos oncológicos neste grupo populacional), e o quinto mais letal, apresentando uma taxa de mortalidade de 6,6% (1). Trata-se do cancro mais incidente nos Estados Unidos da América e na Europa e, respetivamente, da segunda e da terceira causa de morte por cancro. Em Portugal, em 2009, foi a neoplasia maligna mais incidente no sexo masculino, com 108,81 novos casos por cada 100000 habitantes. Em 2012, matou 1745 homens, a que corresponde uma taxa de mortalidade de 36,60 por cada 100000 habitantes (2).

A prevenção e o diagnóstico precoce são as principais armas de que dispomos para combater o cancro em geral. A quimioprevenção é uma das áreas mais promissoras em oncologia, embora não seja, ainda, utilizada de forma regular. Esta compreende o uso de agentes naturais, sintéticos ou biológicos para reverter, suprimir ou prevenir as fases iniciais da carcinogénese ou a progressão de uma lesão pré-maligna para doença invasiva (3–5). Especificamente, no caso da próstata, de acordo com Mukhtar, atrasar a carcinogénese fará com que a doença ocorra por volta dos 80-100 anos, e não por volta dos 40-50 (3). Deve-se salientar, ainda, que se distinguem três tipos de quimioprevenção: a primária, dirigida à população saudável ou que, sem ser doente, possui determinados fatores de risco, para prevenir lesões precursoras ou tumores; a secundária, focada nos indivíduos com lesões pré-malignas, com o objetivo de as fazer regredir, de modo a evitar a doença invasiva; e a terciária, destinada aos doentes diagnosticados e tratados com sucesso a um cancro em fase inicial, a fim de impedir a recorrência ou o surgimento de novos tumores primários (4,6).

Em termos de agentes quimiopreventivos, Steward e Brown indicam a existência de dois tipos de quimioprevenção, consoante a sua ação ao longo dos vários processos da carcinogénese: agentes bloqueadores, que inibem a carcinogénese, ou seja o desenvolvimento

de células neoplásicas; agentes supressores, que desregulam a promoção e progressão das células neoplásicas já iniciadas (4). Devido à potencial durabilidade da administração dos agentes quimiopreventivos, estes deverão ser de baixo custo e o mais inócuo possível (4,5,7).

O PCa constitui um alvo ideal para quimioprevenção. Uma das razões prende-se com a biologia e história natural do tumor, designadamente o surgimento de potenciais lesões pré-neoplásicas (8,9), o seu longo período de desenvolvimento (8,9) e a possibilidade de utilização de biomarcadores (8). Sabe-se que a transformação maligna na próstata está associada a um estado de inflamação crónica e dano oxidativo, aspetos que conduzem à neoplasia prostática intraepitelial (PIN), classificada em baixo ou alto grau (HGPIIN), consoante o *score* de Gleason (8,9). A HGPIIN é considerada, por alguns autores, como um potencial precursor do PCa, na medida em que partilha, com esta doença, várias características, como o aumento da incidência com a idade, a presença dos mesmos marcadores genéticos e moleculares e o facto de ambas se desenvolverem preferencialmente na zona periférica da glândula prostática (9). Acrescenta-se que os doentes diagnosticados com HGPIIN numa biopsia têm o risco de 25% de, nos 5 anos seguintes, terem biopsias diagnósticas de PCa. Apesar disso, e embora esteja presente em 9% das biopsias, a HGPIIN não é alvo de tratamento específico (8). Outra lesão a ter em conta é a *atypical small acinar proliferation* (ASAP), em que existe o risco de 50% de, em nova biopsia, se diagnosticar PCa. No que concerne ao período de desenvolvimento, aponta-se que este dure cerca de 20 a 30 anos (8). No respeitante aos biomarcadores, o antígeno prostático específico (PSA) constitui uma fonte de informação de elevado relevo, proporcionando o seguimento da situação a partir de medições da sua concentração no organismo (8). Outra das razões para a aposta na quimioprevenção do PCa prende-se com a vertente epidemiológica e económica da doença. Com efeito, trata-se de um cancro altamente incidente (1,2), associado a custos estimados em milhões de dólares (7) e cujo tratamento, quer cirúrgico, quer radioterápico, apesar de poder ser curativo, apresenta importantes

comorbilidades (7). Por todos estes motivos, a aposta na prevenção apresenta-se como uma interessante perspetiva para o futuro.

Para uma quimioprevenção eficaz do PCa, é necessário conhecer os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao seu desenvolvimento. Nesse sentido, numa primeira fase do trabalho descrever-se-ão, de forma sucinta, os fatores de risco para o PCa e as etapas evolutivas que ocorrem na transformação das células prostáticas normais em células neoplásicas. De seguida, discutir-se-ão os mecanismos fisiopatológicos responsáveis por essa transformação neoplásica, focando-se, essencialmente, nas vias de sinalização celular, na inflamação e *stress* oxidativo, e nas alterações epigenéticas, explicando como poderão ser alvo de quimioprevenção. Adicionalmente, serão referidos alguns agentes que têm vindo a ser estudados, por se acreditar interferirem naqueles mecanismos. Por fim, a modulação desses mecanismos fisiopatológicos na prática clínica será, também, objeto de análise.

#### IV – MATERIAIS E MÉTODOS

Foi efetuada uma revisão sobre artigos que debatessem os temas do desenvolvimento e prevenção do cancro da próstata, da quimioprevenção do cancro em geral, e da quimioprevenção do cancro da próstata, em particular.

A pesquisa consistiu em duas fases. Na primeira, sem limitação por filtros, foi pesquisado o termo “prostate cancer chemoprevention”, através das bases de dados de literatura científica The Cochrane Library e Pubmed/Medline, usando a sua ferramenta Pubmed Clinical Queries. Na segunda fase, na base de dados Pubmed/Medline, foram definidos os filtros de pesquisa para língua inglesa e data de publicação compreendida entre 2009-2014. Foram pesquisadas combinações dos seguintes termos MeSH (Medical Subject Headings): “chemoprevention”, “chemoprevention/methods” “prostatic neoplasms”, “prostatic neoplasms/physiopathology”, “prostatic neoplasms/pathology”, “prostatic neoplasms/prevention and control”, “prostatic neoplasms/drug therapy” e “prostatic neoplasms/diet therapy”. Foram selecionadas revisões e artigos originais que complementassem a informação disponibilizada pelas revisões. Utilizou-se, igualmente, algumas das citações relacionadas (“related citations”), sugeridas pela base de dados. Finalmente, ultrapassando os limites de filtragem, fez-se referência a artigos que foram considerados relevantes na área.

Para a pesquisa dos dados estatísticos, consultaram-se os *websites* oficiais da International Agency for Research on Cancer e da Direção Geral de Saúde.

## V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. FATORES DE RISCO E EVOLUÇÃO DO CANCRO DA PRÓSTATA

O doseamento do PSA e o toque retal sistemático, ao permitirem o diagnóstico e tratamento mais precoces, têm contribuído para baixar a mortalidade associada ao PCa (9,10). No entanto, como já referido, o tratamento do PCa está associado a uma taxa relativamente alta de morbilidade, pelo que a aposta na prevenção deve ser o caminho a seguir.

Para prevenir o PCa, é importante conhecer e evitar os seus fatores de risco. A generalidade das revisões destaca a idade, a raça negra e a história familiar como os principais fatores de risco para esta doença (8,11–13). Devido à variação das evidências epidemiológicas, tem sido dado, também, cada vez maior destaque ao papel dos fatores ambientais (dieta e estilo de vida) no aumento do risco deste carcinoma. Com efeito, o consumo de gorduras, especialmente de origem animal, a obesidade, o sedentarismo, o alto consumo de ácidos gordos saturados, de ácidos gordos *trans* (TFA), de ácidos gordos polinsaturados (PUFA)  $\omega$ -6, como o ácido araquidónico e o ácido linoleico, o consumo de carnes vermelhas, bem passadas ou curadas, e o alto consumo de laticínios e de cálcio têm sido associados a um aumento do risco de PCa (11–13). Pelo contrário, à ingestão de frutas e vegetais, como os tomates e os brócolos, de soja e dos seus derivados, de chá verde, de peixe e óleo de peixe, ricos em PUFA  $\omega$ -3, como o ácido docosahexaenoico, o ácido eicosapentaenoico e o ácido  $\alpha$ -linoleico, e à prática de exercício físico tem sido atribuído um efeito preventivo sobre o risco de PCa (11–13). Intervir junto destes fatores de risco, promovendo a prática regular de exercício físico e o estabelecimento de uma dieta equilibrada, rica em produtos vegetais, parece, portanto, uma boa aposta para ajudar a prevenir o surgimento desta doença.

Eliminar a totalidade dos fatores de risco é, todavia, uma tarefa praticamente impossível, até porque o mais importante é a própria idade. Por isso, à adoção de um estilo de

vida mais saudável, podemos associar a quimioprevenção. É importante referir que, no fundo, a ingestão de alimentos saudáveis tem, por base, uma ação quimiopreventiva: a introdução, no organismo, de nutrientes que, pelo menos, não lesem os tecidos. No entanto, com a quimioprevenção no verdadeiro significado do conceito, pretende-se, através de fármacos ou produtos naturais, suprimir, atrasar, ou reverter especificamente a carcinogénese da próstata. Os motivos que tornam o PCa um candidato ideal para essa estratégia preventiva já foram apresentados: a existência de potenciais lesões pré-neoplásicas, o grande período de latência e os potenciais biomarcadores. Além disso, a alta prevalência desta doença, o seu aparecimento em idades cada vez mais jovens, e o constante aumento da esperança de vida no ser humano, devem ser, também, fatores a considerar.

Para prevenirmos o PCa pela estratégia da quimioprevenção, importa conhecer e compreender a biologia deste tumor. Contrariamente à hiperplasia benigna prostática (HBP), que deriva, essencialmente, da proliferação das células do estroma, o PCa origina-se no compartimento epitelial (10,14). Na transformação tumoral, o epitélio danificado adquire características atróficas e inflamatórias, denominando-se de atrofia inflamatória proliferativa (PIA). Esta alteração é caracterizada pelo aumento da proliferação celular e por possuir glândulas de vários tamanhos (9). Com o dano contínuo, a PIA acaba por progredir para a PIN, caracterizada pelo crescimento epitelial neoplásico dentro dos ácinos (9). Se for de alto grau (HGPIIN), é considerada como uma lesão precursora que, eventualmente, evoluirá para PCa (8,9). Conhece-se, também, a importância dos androgénios para o desenvolvimento do PCa (9,10,14). Aliás, a terapia de privação de androgénios é um dos tratamentos preconizados para esta doença. Realça-se, contudo, que a maioria dos doentes acaba por, eventualmente, desenvolver resistência a esta terapia e progride para carcinoma da próstata resistente à castração (CRPC) que não tem tratamento curativo (10).

Assim, entendendo os diferentes mecanismos fisiopatológicos que cursam com a transformação neoplásica na próstata, saberemos onde e como atuar: por exemplo, saberemos que podemos atuar numa dada via de sinalização, bloqueando determinada molécula ou enzima. Estes mecanismos, apesar de serem alvo de intenso estudo, estão longe de completamente esclarecidos. No entanto, são já conhecidas algumas alterações significativas em diferentes processos, nomeadamente a nível das vias de sinalização celular, da inflamação e da epigenética, que, de algum modo, contribuem para a carcinogénese na próstata. Interessa destacar que, como veremos, nenhum destes mecanismos ocorre isoladamente, existindo mesmo uma grande dependência entre si. Assim, a atuação terá de ser abrangente e não individualizada para um único componente.

## 2. AS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR

### 2.1. AS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR NO DESENVOLVIMENTO DO CANCRO DA PRÓSTATA

Em qualquer desenvolvimento neoplásico são múltiplas as vias de sinalização celular alteradas que, pela sua repercussão na ativação ou inibição das mais variadas moléculas, promovem a desregulação celular. Elas contribuem, assim, para o surgimento das características essenciais das células cancerígenas: autossuficiência em fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores do crescimento celular, evasão da apoptose, capacidade ilimitada de replicação, indução da angiogénese, capacidade de invasão tecidual e metastização, instabilidade genética, desregulação do metabolismo energético, evasão do sistema imunitário, e inflamação (6).

No caso específico da próstata, as vias de sinalização que parecem ter maior relevância para a carcinogénese são as do recetor de androgénios (AR), do PI3K/Akt/mTOR, do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), do Wnt/catenina- $\beta$ , a via *Hedgehog* (Hh) e a via *Notch* (10). Sarkar *et al.*, numa interessante revisão sobre este tema, advertem que os erros nas vias de sinalização

celular podem ocorrer em qualquer estágio da doença, seja numa fase inicial ou numa fase mais avançada (10).

### **2.1.1. Sinalização pela Via do Recetor de Androgénios**

Os androgénios são hormonas essenciais na fisiologia do homem. A sua ação ocorre nas várias fases da vida e desenvolvimento: na gestação, promovem a diferenciação dos órgãos genitais externos; na puberdade, induzem a maturação da próstata; e na vida adulta, contribuem para a manutenção da homeostasia daquele órgão (9). Além disso, promovem o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários masculinos, como a maior massa muscular e a voz rouca, e são essenciais para a formação dos espermatozoides.

A função dos androgénios dá-se pela sua ligação ao AR. Trata-se de um fator de transcrição dependente de ligando, pertencente à superfamília dos recetores nucleares (10) que, quando ativo, promove a transcrição de genes responsáveis pelo crescimento celular. Este recetor tem, portanto, um papel fulcral na normal função hormonal masculina.

Na próstata, o AR é expresso tanto no compartimento epitelial como no estroma (14–16). No primeiro compartimento, aquele recetor encontra-se nas células basais e nas do lúmen, sendo estas últimas dependentes dos androgénios para sobreviverem. Por sua vez, o estroma exhibe o AR nas células musculares lisas e no endotélio (15). Acresce que este fator de transcrição parece exercer diferentes funções, conforme a sua localização: no estroma promove a proliferação; no epitélio estimula a diferenciação (16).

Quando inativo, o AR localiza-se no citoplasma, ligado a proteínas de choque térmico (HSP) (10). A sua ligação aos androgénios, principalmente à dihidrotestosterona (DHT) (9,14,17), provoca uma mudança na sua conformação que o dissocia das HSP (10). O complexo DHT-AR entra, então, no núcleo celular, onde interage com o ácido desoxirribonucleico (DNA), através da ligação a elementos responsivos aos androgénios (14),

para promover a transcrição dos seus genes alvo. O AR e a DHT têm, portanto, importância capital no crescimento celular e no desenvolvimento neoplásico na próstata.

A DHT é formada, na próstata, através de duas vias. Na primeira, a 5- $\alpha$ -redutase (5-AR) atua diretamente sobre a testosterona para formar a DHT (14,18). Na segunda, o substrato androsteniona é convertido pela 5-AR num metabolito intermediário que, por ação da 17 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase, é convertido em DHT (18). Ao estar envolvida nas duas vias, rapidamente se percebe a relevância da 5-AR na formação da DHT, mesmo considerando as restantes enzimas que participam nesse processo.

Curiosamente, apesar da importância hormonal na ativação do AR, e de se saber que sem androgénios não há PCa, a maioria dos estudos, de acordo com Corona *et al.*, não encontra relação entre níveis altos de androgénios e o risco de PCa (16). Esta aparente contradição é explicada pelo modelo de saturação do AR. Segundo esta teoria, os vários AR presentes nas células têm uma capacidade máxima de ligação aos androgénios, sendo que ela se esgota com níveis hormonais fisiológicos (16). Uma vez que as células neoplásicas estão já a ser maximamente estimuladas, aumentos subsequentes na concentração hormonal não irão afetar o risco de desenvolvimento de PCa. Aliás, ainda de acordo com aqueles autores, são os baixos níveis de androgénios que estão associados ao risco de desenvolvimento de PCa e, nomeadamente, da sua maior agressividade, na medida em que criam uma pressão de seleção para fenótipos caracterizados pela independência hormonal (16).

Pelo explicado, facilmente se infere da importância da 5-AR para o desenvolvimento e crescimento do PCa. Trata-se de uma enzima com 3 isoformas, cujos níveis de expressão se alteram conforme se trate de uma próstata saudável ou de uma com algum processo patológico subjacente (9,14,15). Numa revisão, Wang *et al.* resumem essas alterações: tanto as isoformas 1 como a 2 encontram-se expressas no epitélio e estroma normais, sendo a 2 predominante no estroma. Na HBP existe, comparativamente ao normal, aumento de ambas

as isoformas, mas com predomínio da 2. Na PIN e no PCa, verifica-se, comparativamente à HBP, declínio da expressão da isoforma 2 e aumento da 1 (continuando a expressão de ambas superior à da próstata saudável) (14). Refira-se que, apesar de parecer existir alguma influência epigenética, os mecanismos que levam à variação dos níveis das diferentes isoformas não são, ainda, claros (14). Relativamente à isoforma 3, esta foi descoberta mais recentemente e parece associada aos tumores recorrentes (9,14,17).

Apesar de relativamente bem conhecida a distribuição da 5-AR na próstata, bem como a variação dos seus níveis nos processos patológicos, deve-se ter em mente que esses níveis não predizem com exatidão a capacidade de conversão de testosterona em DHT (19). A heterogeneidade das células neoplásicas deve ser considerada, pois fatores como a diferente capacidade de transporte da testosterona, para dentro ou fora da célula, podem alterar a concentração intracelular desse substrato e, assim, influenciar o grau de conversão (19). Além disso, existem, também, células neoplásicas com capacidade de usar diretamente a testosterona para ativar o AR (19) e, neste caso, a DHT já não será tão essencial.

Assinale-se que, apesar da importância da 5-AR e da DHT na ativação do AR, existem outras vias de sinalização celular, nomeadamente a do Akt, que podem, também, ter influência na ativação daquele recetor (10,16,17,20). A existência de vias alternativas para ativar o AR contribui para a sobrevivência e crescimento das células neoplásicas de modo independente aos androgénios e explica, pelo menos em parte, a razão pela qual, na maioria dos doentes tratados pela ablação androgénica, a doença acaba por recorrer e tornar-se resistente à castração (15).

Concluindo, a DHT forma-se, na próstata, pela ação da 5-AR. Aquela hormona, por sua vez, ativa o AR, levando à transcrição de genes responsáveis pela proliferação celular. Dada a relevância da via do AR no desenvolvimento do PCa e, em particular, da 5-AR, pela

sua ação no início da via, considera-se esta enzima um interessante alvo para a quimioprevenção do PCa.

### 2.1.2. Sinalização pela via da PI3K/Akt/mTOR

A proteína cinase B (Akt) interfere em vários processos celulares, nomeadamente, na proliferação, diferenciação, migração, sobrevivência, metabolismo e resistência à terapêutica (21). A Akt é uma proteína constituinte da via PI3K/Akt/mTOR, que está altamente ativada em 30% a 50% dos PCa. Esta condição está, aliás, associada ao aumento do estágio e grau tumorais e do risco de recorrência (10,20). Por outro lado, verifica-se que um dos principais reguladores negativos desta via, o gene do homólogo da fosfatase e tensina (PTEN), perde uma ou duas cópias em cerca de 70% dos PCa (17), sendo esta condição frequentemente encontrada em metástases deste carcinoma (16).

O mecanismo de ativação da Akt é complexo. A fosforilação da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) permite a formação do 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>3</sub>), que se localiza na membrana citoplasmática. Entretanto, a Akt desloca-se para a membrana para se ligar ao PIP<sub>3</sub> recém-formado. A sua translocação para a membrana citoplasmática e ligação ao PIP<sub>3</sub> permite que seja fosforilada e ativada pela proteína cinase-1 dependente de fosfoinositida (PDK1) (21). Uma vez ativa, a Akt inibe, por fosforilação (17), inúmeros fatores pró-apoptóticos, como a proteína Bad, a caspase-9 e o fator de transcrição *Forkhead box O* (FoxO) (10,17). Por outro lado, a fosforilação, por intermédio da Akt, do alvo mamífero da rapamicina (mTOR), ativa esta serina/treonina cinase, o que também estimula o crescimento tumoral (20).

Outras importantes moléculas para a ativação da via PI3K/Akt são o fator de crescimento insulina-*like* tipo 1 (IGF-1) e o seu recetor, o recetor do fator de crescimento insulina-*like* tipo 1 (IGF-1R) (10,22). Uma vez ativo, o IGF-1R recruta e fosforila outras proteínas que, posteriormente, ativam outras moléculas de sinalização, como o PI3K. A maior

expressão daquele recetor, bem como do IGF-1, está associada a um aumento do risco de PCa (10,20) e ao crescimento independente de androgénios (20). Refira-se que a sinalização IGF-1/mTOR aumenta os níveis de survivina, um proto-oncogene inibidor da apoptose (20).

Por sua vez, a desfosforilação e inativação da Akt permite a ativação de fatores pró-apoptóticos. Destaca-se, como exemplo, o FoxO que, quando ativo, migra para o núcleo celular, onde estimula a transcrição do RhoB, um gene supressor tumoral fortemente indutor da apoptose (21).

A sequência de eventos moleculares ativadores da Akt, nomeadamente o recrutamento de membrana daquela proteína, tem sido estudada no sentido da criação de agentes que bloqueiem a carcinogénese e induzam a apoptose das células malignas. Won *et al.* descrevem, por exemplo, os seus trabalhos com o composto experimental NSC126188. Este apresentou citotoxicidade seletiva para as células neoplásicas e induziu, de modo dependente da dose, a apoptose das células do PCa (21). Pelas suas características, este composto apresenta-se como um promissor agente de quimioprevenção ou quimioterapia.

Os brócolos, ricos em sulforafanos, também parecem ter algum efeito na inibição da via Akt. Num estudo com um modelo animal (o do adenocarcinoma transgénico da próstata de ratos (TRAMP)), Keum *et al.* dividiram uma população de ratos TRAMP em três grupos: um de controlo; um tratado, por via oral, com 3 g de pastilhas, constituídas por 60 mg de brócolos; e outro submetido à administração, também *per os*, de 3 g de pastilhas, compostas por 240 mg de brócolos. No grupo sujeito à maior dose de brócolos, foi verificada a inibição da fosforilação da Akt, que se repercutiu numa menor atividade das proteínas subsequentes da sua via molecular e na supressão do crescimento tumoral na próstata (23). Neste grupo experimental observou-se, também, a estimulação do fator-2 relacionado com o NF-E2 (Nrf2), uma molécula envolvida na expressão de genes antioxidantes (5), com consequente indução da expressão da hemeoxigenase-1 (HO-1) (23), o que também contribuiu para a

supressão do crescimento do PCa (23). Finalmente, também no grupo sujeito a uma maior dose de brócolos, os autores observaram a ativação da caspase-3 e da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), que estava associada à indução da Bax e à supressão do Bcl-XL, demonstrando que a administração de brócolos também contribuiu para a ativação da apoptose mitocondrial (23). Estes vegetais parecem possuir, assim, vários alvos moleculares úteis na redução do crescimento tumoral. Por isso, apresentam-se, também, como um interessante alimento para a quimioprevenção do PCa.

Convém realçar, por fim, a extensa ligação entre a via PI3K/Akt/mTOR e outras moléculas e vias de sinalização celular. Por exemplo, o aumento da expressão do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), frequentemente observado no PCa avançado e, portanto, associado a pior prognóstico, ativa a via do PI3K/Akt (20). Por outro lado, como discutido previamente, a ativação da via PI3K/Akt/mTOR leva à ativação do AR, promovendo o crescimento hormono-independente (10,16,17). Além disso, através da fosforilação e ativação de diversas moléculas, a Akt regula a via do NF- $\kappa$ B (10). Finalmente, a via PI3K/Akt, através da inibição da cinase-3 $\beta$  da glicogénio sintase (GSK3 $\beta$ ), e consequente aumento da catenina- $\beta$ , influencia a sinalização pela via do Wnt (22). Como discutiremos adiante, esta via é importante na expressão de alguns oncogenes.

### **2.1.3. Sinalização pela via do NF- $\kappa$ B**

A via de sinalização do NF- $\kappa$ B tem um importante papel em vários processos celulares, como o crescimento tumoral, a apoptose, a inflamação e a resposta ao *stress* (5,10).

Habitualmente, na célula em repouso, o NF- $\kappa$ B encontra-se ligado ao seu inibidor, o inibidor do  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), estando, portanto, inativo. A estimulação por citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, conduz à fosforilação e degradação proteossómica do I $\kappa$ B, permitindo a libertação do NF- $\kappa$ B e a sua migração para o núcleo a fim de promover a transcrição dos seus genes alvo (5).

Apesar do seu envolvimento em vários processos, a inflamação parece ser, efetivamente, a condição em que a ação do NF- $\kappa$ B é mais preponderante, numa espécie de ciclo vicioso: para além de ser ativada por mediadores inflamatórios, aquela proteína induz, ainda mais, a formação e libertação de enzimas e mediadores inflamatórios, como a ciclooxigenase (COX), a sintase induzível do óxido nítrico (iNOS) e a interleucina-6 (IL-6) (5,22). Desta maneira, o NF- $\kappa$ B contribui para a propagação e manutenção de um estado de inflamação e *stress* oxidativo crónicos, prejudiciais à viabilidade celular.

Como nota final, esclarece-se que a ativação do NF- $\kappa$ B tem sido frequentemente observada no PCa, e que parece ainda maior nos doentes com metástases nodulares (10), o que sugere a sua intervenção na metastização. Aliás, numa revisão efetuada por Sarkar *et al.*, há a referência a alguns artigos em que se evidencia que o bloqueio do NF- $\kappa$ B, em células de tecido prostático neoplásico humano, levou à supressão da angiogénese, da invasão e da metastização (10).

#### **2.1.4. Sinalização pela via do Wnt/catenina- $\beta$**

A via do Wnt tem um importante papel no desenvolvimento embrionário, influenciando a proliferação e a diferenciação celulares e as interações epitélio-mesenquimatosas (10). Permite, desta forma, a formação e o crescimento dos diferentes tecidos do organismo.

A influência da via do Wnt está intimamente relacionada com a ação da catenina- $\beta$  (10). Trata-se de uma molécula que, quando estável, se acumula no citoplasma e, posteriormente, migra para o núcleo celular, onde se junta ao fator das células T (TCF). O complexo TCF-catenina- $\beta$  vai, então, ligar-se a promotores específicos, para induzir, em células dependentes e independentes de androgénios (24), a transcrição de genes relevantes para a proliferação e invasão celular, como o da ciclina D1, o da metaloproteinase da matriz

(MMP) MMP-2 ou o da MMP-4 (10,22,24). Paralelamente, de modo independente do TCF, a catenina- $\beta$ , por influência do Wnt, pode aumentar a função do AR (10,22).

A catenina- $\beta$  é de tal modo importante para o desenvolvimento e progressão do PCa que é encontrada no núcleo das células de 20% a 40% dos CRPC, estando os seus níveis associados a um *score* de Gleason mais elevado (24). Ela tem sido, por isso, estudada como um possível alvo para a quimioprevenção deste carcinoma. Saleem e os seus colaboradores verificaram que o lupeol, um constituinte das azeitonas, das mangas e dos morangos, entre outros, promove a degradação citoplasmática da catenina- $\beta$ , através do complexo GSK3 $\beta$ -axina, diminuindo, assim a expressão dos oncogenes já mencionados (24).

Refira-se, por fim, que além da catenina- $\beta$ , outras moléculas da via do Wnt exibem expressão inapropriada no PCa, nomeadamente o próprio ligando Wnt ou as suas proteínas de ligação (10). A sinalização através da via do Wnt parece, portanto, necessária para a progressão do PCa.

### **2.1.5. Outras vias de Sinalização Celular**

Para além das analisadas acima, outras moléculas e vias de sinalização celular estão envolvidas na carcinogénese na próstata. Por exemplo, a sinalização Hh, fisiologicamente influente durante a vida embrionária na polaridade tecidual e na diferenciação e proliferação celulares, através de sinais autócrinos e parácrinos, está patologicamente ativa em várias neoplasias. No referente, particularmente, ao PCa, verifica-se que esta sinalização está associada à progressão e crescimento acelerados do tumor. Aliás, a sinalização Hh autócrina pelas células tumorais parece ser mesmo um requisito fundamental para a proliferação, viabilidade e invasão tumorais (10).

Por seu turno, a sinalização *Notch*, importante na regulação e manutenção de células estaminais, essenciais para o desenvolvimento numa fase precoce da vida, também parece ter influência no prognóstico do PCa. As consequências da sinalização *Notch* aberrante são,

contudo, algo contraditórias, na medida em que alguns estudos apontam para o desenvolvimento, metastização e recorrência do PCa, enquanto outros sugerem um efeito supressor tumoral. Como indicam Sarkar *et al.*, a explicação para a disparidade de resultados pode prender-se com o facto de as consequências da sinalização *Notch* anormal poderem ser dependentes do contexto celular e *timing* em que ocorrem (10).

Também os estrogénios podem ter algum papel no PCa. Verifica-se que o recetor- $\alpha$  do estrogénio (ER- $\alpha$ ) tem influência na iniciação da sinalização parácrina do estroma sobre o epitélio, estimulando, portanto, o crescimento tumoral. Por sua vez, o ER- $\beta$  tem um efeito antiproliferativo direto sobre as células epiteliais. Tendo em conta que a administração de toremifeno em doses baixas inibe, de modo específico, o ER- $\alpha$ , a modulação seletiva destes recetores tem sido investigada para a prevenção do PCa. Apesar de os resultados dos ensaios pré-clínicos e de fase II serem animadores, um ensaio clínico de fase III sobre o efeito do tratamento com o toremifeno, administrado durante 3 anos em homens diagnosticados com HGPIN, não revelou qualquer redução no risco de progressão para PCa (25).

Outras moléculas influentes no desenvolvimento do PCa são as cinases da família Src. Estas cinases, importantes na adesão, motilidade e invasão tumorais, e na angiogénese, encontram-se altamente expressas no PCa, estando, mesmo, relacionadas com o crescimento independente de androgénios (20). Similarmente as proteínas da família do recetor do fator de crescimento dos fibroblastos (FGFR), bem como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e os seus recetores, e as proteínas do eixo da endotelina têm a sua expressão aumentada no PCa, estando associados a doença progressiva (20). Por sua vez, o aumento da expressão das *chaperones*, responsáveis pela estabilização de proteínas-chave da sinalização celular, como a Akt, está relacionado com a resistência celular à apoptose (20).

A descrição pormenorizada da bioquímica e das cascatas de reações moleculares de cada via ultrapassa os objetivos deste trabalho. Aliás, seria de todo impossível fazê-lo, dado o

grande número de vias envolvidas e a extrema complexidade de cada uma delas. Pretende-se, ao invés, entender que são várias as vias de sinalização celular que influenciam, de alguma forma, o desenvolvimento e a progressão do PCa. Tendo isso em conta, podemos investigar e descobrir produtos que, intervindo em pontos-chave da sinalização celular, contribuam para a quimioprevenção daquela doença. Realça-se, por fim, a grande interdependência entre as várias vias de sinalização. Por isso, quanto mais abrangente for a atuação, mais eficaz será na prevenção do PCa.

## 2.2.AS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR COMO ALVOS PARA A QUIMIOPREVENÇÃO DO CANCRO DA PRÓSTATA

Ao longo do texto, para exemplificar a importância de determinada molécula ou via de sinalização no desenvolvimento do PCa, foram já ilustrados alguns compostos, naturais e farmacológicos que, por terem a capacidade de modular a respetiva via de sinalização celular, têm vindo a ser estudados para a quimioprevenção do PCa.

Neste ponto, salienta-se que a maioria das moléculas e vias de sinalização celular, anteriormente discutidas, estão integradas em estudos para a produção de fármacos eficazes no tratamento do PCa (20). No que concerne, especificamente, à quimioprevenção desta doença, relembra-se que, das várias vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento e progressão deste cancro, a via do AR é, sem dúvida, a mais importante. Por isso, é, também, a mais estudada com vista à sua prevenção. Deste modo, esta secção do trabalho será fundamentalmente dedicada à inibição dessa via.

Como vimos, o crescimento e desenvolvimento do PCa é fortemente dependente dos androgénios, nomeadamente da DHT. Diversos estudos demonstraram que a privação dessas hormonas baixa o PSA e o crescimento tumoral (8). Aliás, a terapêutica padrão do PCa metastizado é a ablação hormonal, que resulta no bloqueio da sinalização pelo AR. Contudo, como notado por Rosenberg *et al.*, esta terapia apresenta vários efeitos laterais, como

disfunção erétil, perda da libido e efeitos metabólicos, como, por exemplo, a desmineralização óssea, resultantes do decréscimo dos níveis de testosterona (9).

A estratégia de quimioprevenção do PCa mais comumente aceita passa, portanto, pela inibição da sinalização do AR sem, contudo, alterar os níveis de testosterona, o que é conseguido bloqueando a produção específica de DHT, através da modulação da 5-AR. Welén e Damber, numa revisão, corroboram a ideia de que a inibição da 5-AR é benéfica, citando um estudo em que, numa pequena população da República Dominicana, uma mutação genética com perda de função da 5-AR preveniu o desenvolvimento do PCa (15).

O facto de existirem, hoje em dia, dois inibidores da 5-AR (5-ARIs), finasterida e dutasterida, com bons resultados no tratamento da HBP impulsionou o seu estudo para a prevenção do desenvolvimento do PCa.

A finasterida inibe apenas a 5-AR do tipo 2, logo apenas tem redução parcial na produção de DHT. Foi realizado um grande ensaio clínico, o *Prostate Cancer Prevention Trial* (PCPT) (26), cuja finalidade foi estudar o efeito daquele fármaco na prevenção do PCa. O PCPT foi um verdadeiro marco na história da quimioprevenção do cancro: tratou-se do primeiro estudo mundial a demonstrar uma redução do risco de um cancro com a utilização de um fármaco: cerca de 25% de redução do risco relativo. Este ensaio clínico, já revisto por uma grande variedade de autores, englobou cerca de 18000 homens saudáveis, com idade superior a 55 anos, PSA inferior a 3 ng/ml e toque retal normal, divididos num grupo placebo e noutro no qual foram administradas 5 mg de finasterida id, durante 7 anos. No PCPT observou-se, efetivamente, uma redução significativa da incidência de PCa relativamente ao placebo (8–10,15,17,26,27). No entanto, concomitantemente a esta observação, registou-se, de forma surpreendente, uma maior incidência de tumores de alto grau (*score* de Gleason 7-10) (8–10,15,17,26,27). Este inesperado resultado pode ter-se devido, contudo, a vieses que surgiram durante a realização do PCPT. Por um lado, o facto de a finasterida atuar,

predominantemente, sobre os tumores moderadamente diferenciados, torna o doseamento do PSA e o toque retal mais sensíveis (9). Acrescenta-se que, com o intuito de se realizar igual número de biopsias nos dois grupos experimentais, os valores do PSA, no grupo da finasterida, foram corrigidos (com fator de correção de 2 e, posteriormente, de 2.3), o que pode ter conduzido à realização inapropriada de mais biopsias neste grupo (9,27). Assim, se a finasterida exercer os seus efeitos apenas sobre os tumores moderadamente diferenciados, mantendo-se os tumores de alto grau inalterados, mais tumores deste último tipo poderiam ser detetados no grupo de tratamento. Por outro lado, a diminuição do volume prostático, causada pelo fármaco, possibilita a análise de uma maior percentagem da sua área, o que aumenta a probabilidade de deteção de pequenos tumores de alto grau (9,15). Além disso, deve ser referido que as alterações na histologia da próstata, causadas pela finasterida, poderão ter originado, também, alguma confusão, na medida em que mimetizam um tumor de alto grau (27).

Também Stanczyk *et al.* estudaram o efeito da finasterida em indivíduos em risco de cancro da próstata. Em homens com PSA superior a 4 ng/ml, o tratamento com finasterida baixou o PSA e a DHT do soro, e aumentou a testosterona e a androsteniona. Adicionalmente, os autores verificaram quedas acentuadas na concentração de glucoronido de  $3\alpha$ -diol ( $3\alpha$ -diol G), de sulfato de DHT (DHT S) e, a menor nível, de glucoronido de androsterona (18). Estes compostos são metabolitos inativos dos androgénios, que surgem na cascata de reações após a ação da 5-AR (18). Os resultados encontrados apoiam o uso de 5-ARIs para a quimioprevenção do PCa. Os mesmos autores sugerem, ainda, que considerando a marcada diminuição na concentração de  $3\alpha$ -diol G e de DHT S, estes compostos poderão servir como marcadores da atividade da 5-AR durante o tratamento com 5-ARIs (18).

Apesar do aparente benefício do tratamento com finasterida, Welén e Damber citam um estudo onde, surpreendentemente, se verificou uma associação positiva entre uma variante

com baixa atividade da 5-AR do tipo 2 e o aumento do risco de desenvolvimento de PCa mais agressivo (15). Tendo em conta os resultados algo conflituosos, a administração a longo prazo da finasterida para a prevenção do PCa merece, sem dúvida, alguma ponderação.

O outro 5-ARI que tem sido estudado é a dutasterida. Este fármaco bloqueia a 5-AR do tipo 1 e do tipo 2. Suprime, por isso, mais de 90% da produção de DHT. Além disso, tem maior semivida do que a finasterida. O seu efeito quimiopreventivo foi estudado no ensaio clínico *Reduction by Dutasteride of Prostate Cancer Events* (REDUCE) (28). Viu-se que, quando comparada com o placebo, a dutasterida reduziu o risco de PCa em 23% (8,9,17,28). No entanto, após 3-4 anos de tratamento foi registado um maior número de casos de cancros agressivos no grupo da dutasterida (28,29). Numa análise subsequente, Andriole *et al.* sugerem que este efeito aparentemente contraditório se deveu a vieses causados pela retirada, após 2 anos de estudo, dos doentes a quem fora, entretanto, diagnosticado PCa, notando que foram retirados mais doentes do grupo de controlo (29). Formando um modelo em que não era retirado nenhum doente, aqueles autores concluíram não existir diferenças significativas no número de casos de PCa de maior grau entre o grupo da dutasterida e o grupo placebo (29). Além disso, à semelhança da finasterida, também a dutasterida reduz o volume prostático, o que pode ter facilitado a deteção de tumores de alto grau (29).

O potencial efeito da dutasterida como agente quimiopreventivo é também apoiado por Barqawi *et al.* Numa coorte com 148 homens com tumores de baixo grau, dividida num grupo no qual foi administrada dutasterida, e num grupo de controlo, sem dutasterida, estes autores observaram que 73,7% dos doentes do grupo de controlo agravaram a doença, comparativamente aos 49,5% dos sujeitos a tratamento com dutasterida (30).

Para além da sua atividade inibitória sobre a 5-AR, outros efeitos benéficos da dutasterida e da finasterida devem ser destacados. Em primeiro lugar, aqueles fármacos, devido à sua homologia estrutural com a DHT, exercem efeitos antagónicos diretamente sobre

o AR (31). Contudo, como evidenciam Chhipa *et al.*, este efeito é específico de determinados tipos celulares e depende, não de mutações do AR, mas sim de outros fatores, como os níveis de *chaperones*, o grau de acetilação ou metilação do AR, ou a capacidade de retenção da DHT por parte das células (31). Em segundo lugar, a dutasterida e a finasterida têm a capacidade de bloquear, em algumas células cancerígenas, alguns mediadores do *uptake* celular de androgénios (19), diminuindo, assim, a concentração intracelular de testosterona e, portanto, a disponibilidade de substrato para a 5-AR ou para o AR.

Tendo em conta os resultados promissores dos 5-ARIs para a quimioprevenção do PCa, tem sido equacionada a sua administração durante a vigilância ativa de homens diagnosticados com aquela doença. A vigilância ativa implica identificar e acompanhar os doentes com PCa de baixo risco, habitualmente com doseamento do PSA, toque retal e biopsias (32). Esta estratégia permite reduzir o tratamento desnecessário nos indivíduos com doença insignificante e oferecer tratamento curativo apenas àqueles em que a enfermidade progride (32). Numa revisão, Al Edwan e Fleshner debruçam-se sobre esta matéria, citando dois estudos onde foi analisado o uso de 5-ARIs na vigilância ativa (33). No primeiro, um estudo do tipo coorte, observou-se uma taxa de progressão mais baixa nos doentes a quem foram administrados 5-ARIs e uma menor probabilidade destes indivíduos abandonarem a vigilância ativa (33). No segundo, um grande ensaio clínico sobre o uso de dutasterida (*The Reduction by Dutasteride of Clinical Progression Events in Expectant Management*), foram observados 302 doentes, de idades compreendidas entre os 50 e os 80 anos, diagnosticados com cancro com estadiamento clínico T1c-T2a e *score* de Gleason de 6 ou menos, divididos num grupo com dutasterida e num placebo. Comparativamente ao grupo de controlo, os indivíduos com dutasterida experimentaram um declínio da taxa de progressão da doença de cerca de 40%. Verificou-se, também neste grupo, uma menor probabilidade de deteção de cancro em biopsias subsequentes e uma melhor qualidade de vida (33). Este estudo confirma

o efeito da dutasterida na quimioprevenção do PCa, bem como o seu potencial uso na vigilância ativa.

Com a possibilidade de associar 5-ARIs à vigilância ativa para o PCa torna-se importante perceber quais são os fatores de risco, no momento do diagnóstico, para progressão da doença. Um estudo conduzido por Margel *et al.*, também sobre doentes sob vigilância ativa nos quais foi administrada dutasterida, concluiu que a idade avançada e o aumento da densidade do PSA são os parâmetros que estão mais associados à progressão patológica da doença (32). Realça-se que, nos doentes com dutasterida, o doseamento do PSA foi útil para identificar o aumento do grau do PCa, mas não do volume tumoral (32). Além disso, a dutasterida não influenciou a velocidade do PSA (32). Os autores rematam que a densidade do PSA é o parâmetro que mais deve ser valorizado no momento do diagnóstico, pelo que recomendam que os doentes cuja densidade do PSA seja mais elevada, e que estejam interessados na vigilância ativa, sejam avaliados com ressonância magnética endorretal ou com biopsia alargada (32). Depois, para a subsequente monitorização dos doentes, avaliações repetidas do PSA não foram consideradas ideais para avaliar a progressão patológica e não devem, portanto, substituir as biopsias (32).

Embora os estudos com inibidores dos androgénios mostrem, no geral, uma redução do risco relativo de PCa, nos homens de alto risco, de cerca de 25% (8), os efeitos adversos da administração farmacológica a longo prazo devem ser considerados. Estes podem incluir o desenvolvimento de CRPC e distúrbios associados à função sexual (8,9). Ademais, no estudo REDUCE verificou-se um aumento de problemas cardíacos no grupo da dutasterida (9,28). Os efeitos dos fármacos sobre outras linhas celulares também devem ser considerados: por exemplo, Wang *et al.* citam um estudo onde se verificou que, sob a ação da finasterida, os fibroblastos, presentes no estroma de células neoplásicas prostáticas, promoveram o crescimento das células cancerígenas (14). Aumentar, a qualquer custo, a esperança de vida

de um doente, por si só, não tem o mínimo interesse. Como em todas as situações da medicina, o conforto e a qualidade de vida do doente têm de estar sempre na mente do médico.

Logicamente, a via de sinalização mais afetada pelos 5-ARIs é a do AR. Contudo, numa revisão, Sarkar *et al.* indicam que a finasterida tem, também, influência na via do Akt, induzindo a apoptose, e que a dutasterida, similarmente através de vias alternativas, mostrou ter influência na proliferação, viabilidade e apoptose de células neoplásicas prostáticas (10). Estes resultados explanam a extensa interligação entre as diferentes vias de sinalização celular.

Concluindo, a inibição da 5-AR, resultando no bloqueio da produção de DHT e, conseqüentemente, no comprometimento da sinalização pelo AR, perfila-se como um método promissor para a quimioprevenção do PCa. Evidentemente, a procura da dose e do *timing* ideal de administração dos fármacos, bem como a pesquisa de novos compostos que influenciem esta via de sinalização, não devem ser descurados. Por fim, o papel das restantes vias de sinalização e a sua relação com o AR devem, também, ser melhor compreendidos. O ideal será, como já referido, conseguir a perturbação simultânea das várias vias envolvidas na carcinogénese da próstata.

### 3. A INFLAMAÇÃO E O *STRESS OXIDATIVO*

#### 3.1. A INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO E DO *STRESS OXIDATIVO* NO CANCRO DA PRÓSTATA

A inflamação faz parte da resposta do organismo à agressão com libertação inicial de citocinas pró-inflamatórias, de fatores de crescimento e estimulação da angiogénese. É, habitualmente, autolimitada, com resolução pela libertação de, por exemplo, citocinas anti-inflamatórias e antiproteases (34). No entanto, se a inflamação tender para a cronicidade torna-se prejudicial. Nesta situação, por vários processos, existe um aumento da proliferação celular, no sentido de substituir as células lesadas, havendo para isso uma produção e

libertação contínua de citocinas pró-proliferativas, pró-angiogénicas e pró-reparadoras teciduais (35). A inflamação crónica ocasiona, assim, a “matéria-prima” necessária para o desenvolvimento tumoral (35).

As interações estroma-epitélio são fundamentais para a perpetuação do estado inflamatório. A contínua secreção de citocinas pró-inflamatórias induz o crescimento fibromuscular e a proliferação do estroma e epitélio prostáticos, por mecanismos de regulação autócrina ou parácrina, seja através da indução de mais citocinas ou fatores de crescimento (por exemplo, o fator-7 do crescimento dos fibroblastos (FGF-7)), ou da estimulação da via da ciclooxigenase (COX) e da lipooxigenase (LOX) (34,35). Estas são as moléculas centrais na inflamação e a sua expressão encontra-se ampliada no PCa. O aumento da COX é, aliás, preditor de pior prognóstico (5,13). Aquelas enzimas conduzem à produção de eicosanóides pró-inflamatórios, como a prostaglandina E2, implicada na promoção da proliferação celular, angiogénese e inibição da apoptose, o ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico, que parece levar ao crescimento de células sensíveis e insensíveis aos androgénios, e o leucotrieno B4, entre muitas outras moléculas (5,11,13).

Outra importante molécula na inflamação é o NF- $\kappa$ B. Este conjunto proteico, capaz de amplificar a resposta inflamatória no ambiente tumoral, tem a sua expressão aumentada significativamente na HGPIN e no PCa (34). O NF- $\kappa$ B, além de ativar a COX e a LOX, está envolvido na inibição da apoptose e na estimulação da ativação da IL-6 e de outros mediadores inflamatórios (5,22). A IL-6, por sua vez, além de ser um importante mediador inflamatório, tem um forte caráter mitogénico, e pode mesmo contribuir para a ativação do AR e, assim, para o crescimento prostático independente de androgénios (22,34).

A IL-6 tem, também, uma forte ação na promoção da angiogénese. Este processo, que consiste na formação de uma nova rede vascular para o fornecimento de oxigénio e nutrientes às células tumorais, é um elemento chave na carcinogénese. A angiogénese reflete, também, a

ligação entre a inflamação crónica e o cancro. Durante a neovascularização ocorre estimulação do endotélio, degradação proteolítica da membrana basal e da matriz extracelular, migração e proliferação das células endoteliais, e reorganização estrutural dos novos vasos. Através da ativação da via de sinalização JAK/STAT, a IL-6 aumenta a expressão do VEGF, o mediador mais importante da neovascularização. Lamy *et al.* observaram que a IL-6 pode ser inibida por compostos fitoquímicos, principalmente derivados da salsa e do aipo (36). Desta forma, bloqueia-se a formação dos neovasos, cortando-se o aporte sanguíneo necessário ao crescimento tumoral. Aqueles autores concluíram, por isso, que a inibição da IL-6 pode ser uma arma para a quimioprevenção do cancro (36).

A evolução para um estado de inflamação crónica contribui, também, para o *stress* oxidativo excessivo do organismo (5,37). *Stress* oxidativo é um desequilíbrio no estado oxidação-antioxidação de uma célula, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e à deficiente capacidade antioxidante celular (37).

Refira-se, contudo, que até certo nível, o *stress* oxidativo, pelo seu papel na ativação e desativação de vários fatores de transcrição, enzimas e canais membranares, é fundamental para a regulação fisiológica de diversas funções celulares (37). Este desequilíbrio, quando dinâmico e moderado é, portanto, crucial para a sobrevivência celular. O problema, no PCa e noutros cancros, surge pela excessiva produção de ROS e pela concomitante diminuição da capacidade de os eliminar. Assim, o *stress* oxidativo leva ao dano de diversas moléculas, como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, podendo mesmo culminar em mutações genéticas (5,37).

Com efeito, na inflamação crónica, a ativação da resposta imune adaptativa leva a um aumento e ativação das células de resposta imune inata. Estas, pela produção exagerada e contínua de ROS e de espécies reativas de nitrogénio (RNS), perturbam os normais processos biológicos celulares (5,22,37), resultando, por exemplo, na oxidação e hipermetilação do

DNA, em alterações da membrana celular e na inativação, ou na alteração do efeito, de diversas proteínas, nomeadamente as responsáveis pela regulação da sinalização celular, culminando com a ativação de genes responsáveis pela proliferação tumoral (37).

O *stress* oxidativo é combatido por enzimas antioxidantes, como a glutathione S-transferase P1 (GSTP1). Esta acelera a desoxidação dos produtos formados durante a inflamação e está, geralmente, aumentada na PIA. No entanto, por mecanismos epigenéticos, nomeadamente pela metilação do seu promotor, a transcrição do gene codificador daquela proteína pode estar diminuída, tornando a próstata mais vulnerável ao dano oxidativo (35,37). Verificou-se que a hipermetilação do gene GSTP1 está presente em cerca de 6,3% das PIA, 68,8% das HGPIN e 90,9% dos PCa (35).

Acrescente-se que, além do papel da inflamação e do silenciamento epigenético de genes antioxidantes, já explicados, outros mecanismos contribuem para o excessivo *stress* oxidativo que se verifica no PCa. Mutações no DNA nuclear e mitocondrial, alterações no metabolismo mitocondrial ou mesmo certos fatores dietéticos e ambientais cursam com um aumento da produção e acumulação de ROS no organismo. Os próprios AR e androgénios, através dos seus efeitos metabólicos ou pela ativação de vias de sinalização pró-oxidativas também contribuem para o *stress* oxidativo (37). O *stress* oxidativo é, portanto, um fator constantemente presente no PCa, pelo que a sua modulação poderá ser útil na prevenção desta doença.

Recuperando o papel da inflamação, em si, no desenvolvimento do PCa, refira-se que a ativação das células de respostas inata e adaptativa, verificada durante a inflamação crónica leva, também, à perda da arquitetura tecidual, através do dano e destruição teciduais, elevando o risco de invasão e metastização de um cancro já iniciado e, portanto, da sua agressividade (5,22).

Nakai e Nonomura dividem as evidências de uma associação positiva entre inflamação e PCa em epidemiológicas e patológicas. No que concerne às evidências epidemiológicas, estes autores realçam a existência de estudos que apontam para uma relação positiva entre a história de prostatite e a história de PCa, sugerindo que os homens com prostatite têm maior risco relativo de PCa (35). Nakai e Nonomura assinalam, contudo, que esses estudos são influenciados por vieses de deteção e de lembrança. No referente às evidências patológicas, como já mencionado, a PIA ocorre, à semelhança da HGPIN e do PCa, predominantemente na zona periférica da glândula prostática (34,35). Além disso, constatou-se que 40% das HGPIN evoluem a partir da PIA (35). Também relativo às evidências patológicas, os autores referem a, já citada, hipermetilação do gene GSTP1 na PIA, na PIN e no PCa, bem como a existência, em igual frequência (5%), de uma mutação inativadora do gene supressor tumoral p53 nas hiperplasias pós-atróficas, variantes da PIA, e nas HGPIN (35). Por fim, num estudo caso-controlo muito recente, cuja população pertenceu ao grupo de controlo do, já referido, PCPT, verificou-se que o risco de desenvolvimento de PCa, particularmente o de alto grau, era maior nos indivíduos em que a biopsia revelava inflamação no tecido benigno da próstata. Observou-se, além disso, que a inflamação decorria principalmente no estroma, e que a maioria das células inflamatórias presentes era composta por macrófagos e linfócitos, o que é indicativo da cronicidade da inflamação (38).

Narayanan *et al.*, num estudo em modelo animal, também evidenciam o envolvimento da inflamação no PCa. Estes autores observaram uma elevação no número de monócitos junto às HGPIN e na área perivascular, bem como aumento da atividade da iNOS nos macrófagos. Esta enzima, induzida por numerosos estímulos, como as citocinas inflamatórias, o NF- $\kappa$ B, a hipoxia ou via do Wnt, está envolvida na produção de RNS (5), estando, portanto, implicada na lesão celular. Com efeito, aqueles autores verificaram que o aumento da atividade da iNOS estava relacionado com a progressão tumoral, tendo observado um aumento significativo do

NF- $\kappa$ B (4 vezes superior), do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e do VEGF, nas fases de HGPIN e PCa. Observaram, também, que o tratamento com celecoxib, um inibidor da COX, aumentou significativamente a taxa de apoptose e reduziu as PIN, com declínio concomitante da iNOS, do NF- $\kappa$ B e inibição moderada da infiltração dos monócitos. Houve, também, inibição do VEGF e o do TNF- $\alpha$ , que pareceu associada à taxa da apoptose. Estes resultados evidenciam o papel do estroma na inflamação e microambiente do tumor, e sugerem, também, o efeito antitumoral do celecoxib (39).

Uma vez percebido que a inflamação contribui de algum modo para a carcinogénese da próstata, interessa saber se há algum estímulo específico para despoletar uma neoplasia a partir da reação inflamatória daquela glândula. No entanto, esse estímulo inicial permanece pouco claro. Destacam-se, como possíveis gatilhos, fatores dietéticos, certos poluentes, fatores genéticos, refluxo urinário ou mesmo infeções (34). Todavia, os micro-organismos diretamente relacionados com a transformação maligna também não são conhecidos. A *Propionibacterium acnes* tem maior prevalência nos doentes com HBP e PCa, e parece alterar a proliferação celular, permitindo o crescimento das células infetadas (35). No referente a vírus, o vírus xenotrópico relacionado com o vírus da leucemia em murinos (XMRV) é o mais estudado, mas o seu papel na carcinogénese é pequeno (35). Por fim, apesar de existir, sem dúvida, uma relação entre doenças sexualmente transmissíveis (DST) e prostatite, não há, ainda, nenhum consenso entre quais os micro-organismos responsáveis pelas DST que possam ser específicos para o PCa (35). Realce-se, nesta altura, que existem quatro tipos de prostatite (prostatite bacteriana aguda; prostatite bacteriana crónica; prostatite crónica/síndrome da dor pélvica crónica; prostatite inflamatória assintomática) e que, como indicado pelos nomes, nem todas são bacterianas. Aliás, é interessante constatar que a próstata pode, por si só, induzir uma reação inflamatória, na medida em que pode expressar células apresentadoras de antígenos e todos os recetores toll-like (TLRs) (34).

Como vimos, certos componentes da dieta contribuem para o aumento do risco de PCa. Isto ocorre, em grande medida, por poderem causar um estado inflamatório. O consumo de carne vermelha é um dos fatores de risco. Cozinhá-la a altas temperaturas produz aminas heterocíclicas (HCA) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sendo ambos compostos carcinogénicos (11–13). No que concerne às HCA, uma das mais estudadas é o 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP). Após a sua ingestão e modificação no organismo, o PhIP transforma-se num éster que se liga aos resíduos guanina do DNA, causando a sua mutação (35). Por outro lado, o PhIP induz um aumento dos mastócitos, fonte de TNF- $\alpha$ , contribuindo para a prostatite e, assim, para a carcinogénese (35). Aquela amina heterocíclica é um potencial alvo para a quimioprevenção. Apesar de não terem observado, ao exame histológico, alterações inflamatórias óbvias, Tang *et al.* confirmaram, num estudo em modelo animal, que o PhIP induz a carcinogénese na próstata, e que a nobelitina, um flavonoide derivado dos citrinos, tem a capacidade de reduzir a proliferação celular na próstata, inibindo tanto a evolução de PIN em PCa, como o próprio desenvolvimento da lesão pré-neoplásica (40). Os autores citam outros estudos, para explicar que aquele composto parece exercer os seus efeitos através do bloqueio do ciclo celular nas fases G1 e G2/M; da indução da apoptose, pelo aumento da expressão da Bax e declínio da Bcl-2; e da inibição da proliferação das células musculares lisas vasculares.

Curiosamente, ainda referente ao papel da dieta e inflamação no risco de PCa, Brasky *et al.*, encontraram uma relação inversa entre a percentagem de TFA no sangue e o risco de PCa de alto grau, e uma associação positiva entre o ácido eicosapentaenoico e o risco de PCa de alto grau (41). Uma vez que os TFA e os PUFA  $\omega$ -6 são considerados pró-inflamatórios e os PUFA  $\omega$ -3 anti-inflamatórios e com capacidade imunomoduladora, os resultados observados por aqueles autores não são os esperados (41). Além de levantarem dúvidas sobre de que modo, realmente, a inflamação influencia o PCa, estes resultados mostram que, antes

de se fazerem recomendações clínicas para mudanças na dieta e de se usarem suplementos para prevenir a doença, é necessário compreender o real efeito dos nutrientes sobre as diferentes condições clínicas (38).

### 3.2. A INFLAMAÇÃO E O *STRESS* OXIDATIVO COMO ALVOS PARA A QUIMIOPREVENÇÃO DO CANCRO DA PRÓSTATA

Uma vez conhecida a importância da inflamação no desenvolvimento do PCa, sugere-se que a regulação ou inibição daquela condição clínica poderá ter um efeito preventivo sobre a doença. Mais ainda, o conhecido efeito benéfico do ácido acetilsalicílico (AAS) na prevenção do cancro colo-retal conduziu ao estudo dos anti-inflamatórios para a prevenção de outros cancros, entre eles o PCa (42).

Evidências *in vitro* têm confirmado a influência da regulação da inflamação na inibição do crescimento de células cancerígenas da próstata, quer com fármacos (39), quer com produtos naturais. Swami *et al.*, por exemplo, observaram que a genisteína, um derivado da soja, diminuiu a expressão da COX e a consequente síntese de prostaglandinas, com concomitante declínio da proliferação de células neoplásicas (43). Também os estudos em modelos animais apontam para um efeito benéfico da regulação da inflamação na prevenção do PCa (42).

Choe *et al.*, num estudo de coorte, observaram que a anticoagulação com varfarina ou enoxaparina, ou a antiagregação com AAS ou clopidogrel, em doentes tratados por radioterapia ou cirurgia, estavam associadas a uma redução no risco de morte específica por PCa. Esta redução foi aferida, maioritariamente, nos doentes de alto risco e com doença avançada, e foi mais acentuada com a administração de AAS. O uso deste fármaco pode reduzir o risco de metástases, na medida em que as células neoplásicas se disseminam de forma hematogénica protegidas pelas plaquetas; portanto, inibir a agregação plaquetar poderá ser útil na prevenção das metástases e, assim, prolongar a sobrevivência dos doentes (44).

Numa recente revisão, Bosetti *et al.* observam que, no geral, o AAS, se administrado regularmente, reduz o risco de PCa em cerca de 10%. Esta relação é independente da maior ou menor agressividade do tumor, e não parece ter relação com a frequência, dose ou duração da administração daquele fármaco (45). No entanto, há que referir que os estudos em humanos, sejam eles estudos epidemiológicos observacionais, ensaios clínicos, caso-controlo ou de coorte, têm mostrado alguma inconsistência de resultados. No caso de outros anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), que não o AAS, as evidências, segundo Bosetti *et al.* e Silva *et al.*, apontam para um efeito ainda menos consistente (42,45).

Bosetti *et al.* indicam, ainda, algumas justificações para a aparente disparidade entre os resultados observados. Erros na medição da exposição ao AAS, diferenças na definição do uso deste fármaco, não ter sido tomada em conta outras possíveis medicações que o doente possa ter feito, bem como vieses de deteção, criados pelo maior contacto médico e doseamentos mais regulares do PSA por quem toma AAS, aumentando a probabilidade de diagnóstico de PCa, são algumas das razões apresentadas por aqueles autores (45).

Outro aspeto a ter em conta diz respeito aos efeitos adversos dos NSAIDs. A inibição da COX-1 está associada a um risco acrescido de hemorragia e de desenvolvimento de úlceras gástricas, principalmente a partir dos 60 anos. Por outro lado, a inibição demasiado pronunciada da COX-2 leva a um risco aumentado de episódios trombóticos (46). Além disso, o rofecicob, quando estudado para a quimioprevenção do PCa, apresentou uma inesperada toxicidade cardiovascular (42). O uso de derivados destes fármacos, com melhor perfil de segurança pode ser uma solução. Por exemplo, um derivado do sulindac mostrou eficácia *in vitro* na supressão do crescimento de células de PCa. Curiosamente, aquele composto não teve atividade sobre a COX, tendo atuado através da inibição do AR (47).

No que se refere ao *stress* oxidativo, importa compreender que causa lesões irrecuperáveis no DNA (37), pelo que é essencial prevenir estas lesões. A estratégia para a

quimioprevenção consistirá, então, no restabelecimento do equilíbrio oxidação-antioxidação celular. Uma maneira de o conseguir será reduzindo a resposta inflamatória. Tendo em conta a, já discutida, estreita relação entre inflamação e *stress* oxidativo, facilmente se infere que, diminuindo o estado inflamatório estaremos, indiretamente, a contribuir para uma menor agressão oxidativa celular. Outra hipótese de atuação será a modulação direta do desequilíbrio entre a produção de ROS e a sua eliminação. Compostos como as vitaminas C, D e E, os carotenoides, o selénio, os polifenóis do chá verde, e os licopenos, presentes na dieta de forma natural ou em suplementos, têm vindo a ser amplamente estudados nesse sentido. Os resultados têm sido, contudo, bastante inconsistentes (22,37,48).

São várias as explicações avançadas para a discrepância de resultados observada. Por um lado, os estudos baseados na dieta podem apresentar erros na mensuração da ingestão dos nutrientes (48), ou podem ser falseados pelas associações entre diferentes compostos (48), na medida em que o hipotético efeito de determinado nutriente poderá ser mascarado pelo efeito de outro. Além disso, numa dada população, há a possibilidade de a ingestão de alguns nutrientes não variar grandemente entre indivíduos (48), não sendo, portanto, possível a comparação entre os diferentes constituintes alimentares ou doses. Deve ser, também, considerado o facto de que as diferentes ROS exibem, entre si, diferentes reatividades. Deste modo, a propensão para a eliminação, por intermédio dos antioxidantes, pode, também, variar entre cada ROS (37). Por outro lado, os antioxidantes não limitam a produção de ROS *per se*; pelo contrário, protegem as células dos seus efeitos (37). A contínua produção de ROS continuará, por isso, a ser uma ameaça para a próstata e para organismo no geral, pelo que o ideal será conseguir bloquear a sua formação. Lembra-se, nesta altura, o efeito fisiológico do *stress* oxidativo moderado, pelo que terá de ser atingido um equilíbrio de forma a não lesar as células pelo excesso de ROS, mas também não as danificar pela sua ausência absoluta. Outro fator a ter em conta é o reduzido número de moléculas antioxidantes transportadas para

o tecido prostático, que não é suficiente para fazer face à quantidade de ROS produzida (37). Nesse sentido, devem ser envidados esforços no aprimoramento das propriedades físico-químicas dos antioxidantes, com vista à obtenção de uma maior disponibilidade daquelas moléculas na próstata. Finalmente, outro problema comumente apontado é o facto de os ensaios clínicos realizados serem, na sua generalidade, pequenos em tamanho e duração (48).

Concluindo, no que à inflamação diz respeito, apesar de, no geral, se apontar para um efeito benéfico, embora reduzido, do AAS e dos NSAIDs na prevenção do PCa, ainda não existem dados suficientemente fortes para que tal se transponha para recomendações clínicas. Sobre o *stress* oxidativo, a redução da inflamação terá, como consequência obrigatória, o declínio da produção de ROS. Por seu turno, as evidências da modulação direta do desequilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS, por intermédio de produtos dietéticos, são, ainda, bastante inconsistentes, pelo que aqueles produtos não devem, para já, ser recomendados nesse sentido.

#### 4. EPIGENÉTICA

##### 4.1. O PAPEL DA EPIGENÉTICA NO CANCRO DA PRÓSTATA

A epigenética, fundamental para o controlo de vários processos biológicos, como o desenvolvimento e diferenciação celulares, e a adaptação a diferentes condições ambientais (49), consiste em fenómenos de regulação da expressão génica, sem que ocorra alteração na sequência ou no número de pares de bases (49–53).

Os principais mecanismos de regulação epigenética consistem na metilação do DNA, nas alterações nas histonas e na modulação da expressão génica através de microRNAs (miRNAs). (49–54) A ocorrência de cada um deles não é um fenómeno isolado; de facto, apesar de a ordem hierárquica por que acontecem ser desconhecida, todos eles apresentam uma importante inter-relação entre si (50). Importa compreender que perturbações no normal funcionamento destes fenómenos epigenéticos estão envolvidas no desenvolvimento de várias

doenças (49), nomeadamente do cancro, estando, nesta enfermidade, implicadas quer na iniciação quer na progressão (53). Aliás, de acordo com Ho *et al.*, o conceito de que as mutações genéticas, devidas a danos no DNA produzidos pela interação entre fatores ambientais e endógenos, são a condição mais importante na carcinogénese está, cada vez mais, posto em causa: as alterações epigenéticas têm vindo a ser defendidas como sendo tão ou mais relevantes do que as genéticas (52). Com efeito, verifica-se que as alterações epigenéticas, bastante comuns nas lesões pré-malignas, ocorrem com maior frequência do que as mutações genéticas (53).

Uma vez que as alterações epigenéticas são de carácter reversível (49,51–54) e ocorrem cedo no desenvolvimento do cancro (49,50), sugere-se que a compreensão desses mecanismos poderá ter implicações significativas no prognóstico do PCa, quer a nível do tratamento, quer a nível da quimioprevenção.

De seguida, descrevem-se sucintamente os três mecanismos de regulação epigenética enunciados.

#### **4.1.1. Metilação do DNA**

A metilação do DNA dá-se pela ação das metiltransferases do DNA (DNMT) (49–53), que transferem um grupo metilo da S-adenosil-L-metionina (SAM) para uma citosina próxima de guanina (locais CpG) (49,51–53). De um modo geral, a metilação do promotor de um gene associa-se à inativação da transcrição desse gene e, portanto, ao seu silenciamento (50–54).

A metilação do DNA é um importante evento fisiológico, estando envolvida, por exemplo, na lionização e no silenciamento de genes específicos de linhagens germinativas e de elementos repetitivos do DNA (52). Todavia, a transferência de grupos metilo para o DNA está, também, implicada no desenvolvimento do cancro. Verifica-se, nesta patologia, uma alteração geral no padrão de metilação do DNA, constatando-se que o genoma está, na sua

globalidade, hipometilado, com a exceção de determinados genes específicos, que se encontram hipermetilados (50–52).

No PCa, a hipometilação global do DNA está associada à instabilidade cromossómica (49,52,53) e à progressão e metastização da doença (52,53). Foram, também, reportados alguns genes específicos (50,51) e sequências repetitivas do DNA como estando hipometilados (52,53). Contudo, a maioria dos genes com influência no PCa, sobretudo aqueles com funções supressoras tumorais (49,51,53), nomeadamente as da reparação do DNA, da destoxificação, da apoptose e do controlo do ciclo celular (52), está hipermetilada. Por exemplo, os supressores tumorais INK4a, APC (50) e RASSF1a (50,52) são genes que se encontram silenciados por hipermetilação (50). Já vimos, também, a importância da metilação do gene GSTP1 no PCa (35,50,52), na medida em que o silenciamento daquele gene diminui as defesas contra o *stress* oxidativo.

Para além da influência no desenvolvimento do PCa, também a sua progressão local pode ser afetada pela metilação do DNA. Constatou-se, por exemplo, que aquele carcinoma exhibe hipermetilação do gene da caderina-e (50,52). Este gene codifica a molécula de adesão celular homónima, que tem um importante papel na adesão intercelular, na polaridade celular e na arquitetura tecidual (55). A sua inativação é fundamental para a transição epitélio-mesenquimatosa (50), na medida em que irá provocar a desorganização do arranjo e coesão “normais” entre as células tumorais, do que resulta a ligação destas aos tecidos adjacentes e consequente invasão. Numa recente meta-análise, Chang *et al.* confirmaram que o grau de metilação do promotor do gene da caderina-e é significativamente superior no PCa comparativamente à próstata normal, comprovando que o silenciamento da transcrição da caderina-e está relacionado com esta doença (55). No entanto, aqueles autores sugerem que esta alteração está relacionada com a carcinogénese da próstata no geral, e não com a fase de progressão em particular, na medida em que não encontraram diferenças significativas quando

compararam os níveis de metilação em tumores de *score* de Gleason elevado ou baixo, ou entre aqueles com maior ou menor crescimento (55).

Cooper e Foster apontam que a perda de *imprinting* genómico também pode estar relacionada com o desenvolvimento de PCa (50). O *imprinting* inibe a expressão de um dos alelos de um gene, de acordo com o sexo do progenitor, permitindo a expressão específica do alelo recebido do outro progenitor. Aqueles autores indicam que no PCa, contrariamente ao que sucede na HBP, existe expressão bialélica do gene IGF-II, o que indica que houve reativação do alelo materno (50). Parece, portanto, que a perda do *imprinting* materno do gene IGF-II contribui para o desenvolvimento do PCa. Lembra-se, neste ponto, que o IGF-II relaciona-se com a via do Akt, ativando-a, promovendo, assim, a proliferação celular. Uma vez que os mecanismos de *imprinting* se explicam pelos fenómenos de metilação do DNA, a evidência dada por aqueles autores exemplifica como as alterações nos normais mecanismos epigenéticos podem culminar no desenvolvimento do PCa.

Refira-se, por fim, que a metilação desadequada dos genes ocorre desde cedo no desenvolvimento do cancro (50–52), sendo encontrada, inclusivamente, nas HGPIN (51,52). Além disso, ela parece estar relacionada com a idade do doente (50).

#### **4.1.2. Alterações nas Histonas**

As histonas são proteínas que interagem umas com as outras e com o DNA para formar o nucleossoma (52). Após a sua tradução, estas proteínas são sujeitas a fenómenos epigenéticos, no sentido do controlo da expressão génica (49,50,52,54).

São vários os mecanismos de modificação das histonas; no PCa, os mais importantes são a acetilação e a metilação daquelas proteínas (49,50,52,53). Através deles ocorre uma alteração na afinidade das caudas das histonas para com o DNA, provocando uma mudança conformacional da cromatina (53). A cromatina ficará, então, aberta ou condensada, o que, respetivamente, vai permitir ou impedir o acesso dos fatores de transcrição ao DNA e, por

consequente, a expressão génica. Refira-se que os padrões globais de modificação das histonas aparentam ter significado prognóstico na generalidade dos cancros, e, no caso específico da próstata, parecem ligados ao risco de recorrência (50).

No que concerne à acetilação ou desacetilação das histonas, constata-se que a primeira leva à abertura da cromatina, permitindo transcrição génica, enquanto a segunda condensa-a, suprimindo a transcrição (49,53). Ho *et al.* anotam que nas células cancerígenas existe um desequilíbrio naqueles mecanismos, com maior predominância da desacetilação, resultando no conseqüente silenciamento de genes supressores tumorais (52). Ainda, de acordo com estes autores, os declínios globais da acetilação das histonas relacionam-se com o agravamento do grau do cancro e do risco de recorrência (52).

A acetilação das histonas é catalisada pelas acetiltransferases das histonas (HAT) (49,50,52). É interessante assinalar que estas enzimas exercem, também, a sua ação sobre outras famílias de proteínas (50). Verificou-se, por exemplo, que o tratamento com DHT leva à acetilação do AR, o que permite a sua ativação (50) e conseqüente proliferação celular.

Por sua vez, a desacetilação das histonas e proteínas não histonas ocorre por intermédio das desacetilases das histonas (HDAC) (49,50,53). Estas enzimas são divididas em quatro classes, conforme a sua homologia, tamanho, expressão subcelular e número de domínios enzimáticos (49). De um modo geral, existe no PCa aumento da atividade das HDAC (52). Por exemplo, a maior expressão da HDAC1 parece influenciar a progressão da doença no sentido da independência hormonal (50,52), na medida em que a acumulação daquela enzima coincide com a perda de sensibilidade aos androgénios (52).

Um caso especial é o das HDAC de classe III, as chamadas sirtuínas. Segundo Ho e os seus colaboradores, também elas têm a sua expressão aumentada no PCa (52). Cooper e Foster sugerem, contudo, um papel diferente da sirtuína-1 (SirT1) para esta enfermidade. De acordo com estes autores, nos cancros do cólon e da mama, a SirT1 tem ação no

silenciamento de alguns genes da via do Wnt, tendo-se constatado que a sua hiporregulação resulta na reativação destes genes (50). Ou seja, neste caso, a Sirt1 terá uma ação supressora tumoral. Dada a importância da via do Wnt no PCa, Cooper e Foster sugerem que este mecanismo poderá ter, também, alguma relevância nesta patologia. Enfatiza-se que existem evidências de que as sirtuínas podem tanto ser oncogénicas como supressoras tumorais (52). Interessa, pois, esclarecer, qual o verdadeiro papel destas enzimas no cancro. Ho *et al.* alvitraram que tal dependerá de vários fatores, como o nível de expressão dessas enzimas e o momento da doença (52).

No que respeita à metilação das histonas, esta ocorre por intermédio das metiltransferases das histonas (49), e pode dar-se num resíduo de arginina ou lisina (49,52,53). A metilação da arginina resulta em ativação da transcrição (52); a da lisina, por sua vez, apesar de ser, tradicionalmente, associada ao silenciamento da transcrição, sabe-se hoje que, pode ser tanto ativadora como silenciadora, dependendo da posição do resíduo de lisina em questão (49,50,52,53). Por exemplo, metilação na lisina 9 da histona do tipo 3 (H3K9) (49,50,52), H3K27 (49,50) ou H4K20 (49) silencia a transcrição; contrariamente, metilação em H3K4 (49,50), H3K36 ou H3K79 (49) ativa-a. A este conceito, Cooper e Foster denominam de código das histonas (50).

Como exemplo da influência da metilação das histonas na carcinogénese da próstata, destaca-se o potenciador do homólogo de *zeste-2* (EZH2), uma metiltransferase das histonas, que está envolvida na inativação de genes supressores tumorais (50,52), e cuja expressão está aumentada no PCa e associada ao risco de recorrência bioquímica da doença (53). O EZH2 intervém, por exemplo, no silenciamento da via de sinalização celular Ras, inibidora do crescimento celular. Também o gene MSMB, que codifica um inibidor do PCa chamado PSP94, parece ser silenciado por aquela proteína (50).

A metilação do DNA, catalisada pelas DNMT, e as várias modificações nas histonas parecem exibir uma estreita relação entre si. Por exemplo, o EZH2 intervém no silenciamento da transcrição através da metilação direta das histonas ou pela sua associação às DNMT (50). Além disso, a metilação do DNA está, geralmente, associada a um menor grau de acetilação das histonas, devido à ação das HDAC (52). Todavia, Cooper e Foster citam alguns autores que contradizem esta ideia, defendendo que os vários mecanismos epigenéticos são independentes uns dos outros. Cooper e Foster refletem que esta independência poderá ser explicada por mecanismos específicos de cada tecido e tumor (50). Uma maior compreensão da relação entre os diferentes mecanismos epigenéticos é, portanto, necessária.

#### **4.1.3. Silenciamento Mediado por miRNAs**

Os miRNAs são pequenos ácidos ribonucleicos (RNA) não codificantes, com cerca de 20-22 nucleótidos (49,51,53) que, fisiologicamente, ao perturbarem a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) e degradarem-no, ou ao emparelharem-se com ele de modo imperfeito, regulam a expressão génica impedindo a tradução (49,51,53). Através destes mecanismos, os miRNAs modulam, por exemplo, o desenvolvimento e a diferenciação celulares (53).

A desregulação dos miRNAs e o conseqüente silenciamento da expressão de determinados genes a nível pós-transcrição estão implicados na iniciação e progressão do cancro (49). Verifica-se que as células neoplásicas aumentam a expressão de vários miRNAs que suprimem proteínas supressores tumorais e baixam a dos que alvejam oncoproteínas (54). Além disso, tem surgido evidência de que os miRNAs têm, também, a capacidade de se dirigirem aos promotores da transcrição, mediando quer o silenciamento quer a ativação génica (50). Isto acontece na medida em que alvejam regiões génicas específicas para a metilação do DNA ou a modificação das histonas (53). Além disso, os miRNAs podem modular a expressão das DNMT (53).

Também neste ponto se evidencia a relação entre os vários mecanismos epigenéticos, na medida em que os padrões de metilação do DNA e de acetilação das histonas parecem regular os miRNAs (52,53).

#### 4.2.A EPIGENÉTICA COMO ALVO PARA A QUIMIOPREVENÇÃO DO CANCRO DA PRÓSTATA

O carácter reversível dos mecanismos epigenéticos (49,52–54) e a sua ocorrência desde cedo na carcinogénese (49,50), tornam aqueles mecanismos interessantes alvos para a quimioprevenção do PCa.

Em primeiro lugar, merece atenção o facto de que as alterações epigenéticas podem ser herdadas de uma geração para a seguinte (50,53). São exemplos a influência da dieta materna e os efeitos epigenéticos causados pelo tabaco no pai (50). Por isso, a título preventivo, e com vista à adoção de um estilo de vida saudável, deve ser lembrado aos pais que os seus hábitos poderão ter repercussões na saúde dos filhos.

Em segundo lugar, é interessante constatar que as alterações epigenéticas podem servir como marcadores do PCa (50,51,53). Numa interessante revisão sobre esta matéria, Chiam *et al.*, explicam que quer a metilação do DNA, quer as alterações nas histonas, quer os miRNAs estão em estudo para a marcação da doença a vários níveis, nomeadamente a sua deteção ou o estabelecimento de um grau de prognóstico (53). Para já, os resultados mais promissores são a nível da metilação do DNA. Por exemplo, a identificação da metilação do gene da GSTP1 com a metilação do APC tem sensibilidade de quase 100% para a deteção do PCa (50,53). Outro gene também selecionado como marcador do PCa é o da neurogenina-1 (Neurog1). Este gene tem um importante papel na iniciação da neurogénese e na inibição da diferenciação dos astrócitos (56) e, apesar de a sua influência concreta no PCa ser desconhecida, sabe-se que o seu promotor está altamente metilado nesta doença, estando o gene, portanto, silenciado (56). Num estudo, Shu *et al.* evidenciaram, *in vitro*, que a curcumina, um derivado do açafrão, atua a vários níveis no sentido da reexpressão do

Neurog1, inibindo: 1) diretamente a atividade das DNMT, bloqueando a metilação do promotor daquele gene; 2) de forma geral as HDAC; e 3) a metilação no resíduo H3K27, que já discutimos tratar-se de uma marca repressiva. De forma surpreendente, os autores observaram, ainda, inibição das HAT. Shu *et al.* acreditam que isso aconteceu para estabilizar todo o genoma (56). Conclui-se, assim, que a curcumina exerce efeitos benéficos na reexpressão de genes suprimidos no PCa, tendo, portanto, potencial quimiopreventivo. Além disso, destaca-se o papel do Neurog1 como marcador da carcinogénese na próstata e, possivelmente, como potencial meio de monitorizar a resposta ao tratamento.

Apesar da existência de evidências promissoras, Chiam e os seus colaboradores advertem que o uso da epigenética para a marcação do PCa na prática clínica está, ainda, distante da realidade, na medida em que é difícil transpor o que se observa *in vitro* para ensaios clínicos. As razões apontadas para tal passam pelo desconhecimento do verdadeiro significado dos candidatos a biomarcadores para carcinogénese da próstata, pela inconsistência dos resultados experimentais e pela ausência de tecnologia adequada para análise. Além disso, como as alterações epigenéticas ocorrem naturalmente com a idade, é preciso considerar se, para determinado biomarcador, a sua expressão modificada se deve à idade ou ao PCa (53).

A capacidade de as HAT acetilarem outras proteínas, que não as histonas, também merece alguma consideração. Um exemplo é a acetilação e a ativação do AR, após a estimulação androgénica. Como já vimos, este recetor é o mais importante fator de transcrição para o desenvolvimento do PCa. Lee *et al.* observaram, *in vitro*, que as catequinas (fitonutrientes com forte ação antioxidante) do chá verde, induzem a morte celular no PCa através da sua atividade anti-HAT (57). Também o extrato de semente de uva inibe a acetilação do AR, de modo dose-dependente, e, por conseguinte, suprime a transcrição mediada por aquele recetor e aumenta a apoptose das células hormono-dependentes (58). A

inibição da acetilação dependente de androgénios do AR impede a sua translocação para o núcleo, bloqueando, deste modo, a sua atividade. Assim, sugere-se como área de investigação futura o uso dos inibidores das HAT na prevenção do PCa.

Também as HDAC podem exercer a sua função sobre outras proteínas, que não as histonas. Como exemplo, menciona-se a p21, uma proteína inibidora das cinases dependentes das ciclinas, que bloqueia o ciclo celular na passagem da fase G1 para a fase S (59). Quando desacetilada, a p21 perde essa capacidade. Sidana *et al.* demonstraram, *in vitro* e *in vivo*, que a administração crónica de ácido valpróico, um antiepilético com capacidade inibitória das HDAC, aumenta a p21 e bloqueia o ciclo celular, diminuindo, por conseguinte, a proliferação celular. No seu artigo, Sidana e os seus colaboradores relatam, ainda, outros benefícios do ácido valpróico para a prevenção do PCa, nomeadamente as suas propriedades indutoras da apoptose e da diferenciação celular e bloqueadoras da angiogénese (59).

São várias as revisões que sumarizam os estudos sobre os efeitos e a eficácia dos mais variados compostos naturais na modulação dos mecanismos epigenéticos com vista à quimioprevenção do cancro em geral e da próstata em particular (49,51,52,54).

No referente à metilação do DNA, Ho *et al.* fornecem uma interessante perspetiva sobre como modulá-la, através de estratégias dietéticas, com o objetivo de prevenir o PCa. Os autores dividem as estratégias em três categorias:

- 1) Dadores de grupos metilo que contribuam diretamente para o *pool* de metilo e que sejam substratos envolvidos na metilação do DNA;
- 2) Agentes que afetem, indiretamente, o *pool* de grupos metilo, através da modulação da atividade de enzimas que regulam esse *pool*, e;
- 3) Compostos que atuem como inibidores das DNMT (52).

Sobre os pontos 1 e 2, aqueles autores realçam que as DNMT, para exercerem a sua atividade, necessitam da SAM como dadora dos grupos metilo, e que o declínio do

fornecimento de moléculas de metilo à SAM induz a metilação preferencial de determinados genes, resultando no já referido padrão de hipometilação global do DNA e hipermetilação de genes específicos (52). Por isso, Ho *et al.* sugerem que diminuir a disponibilidade de grupos metilo no organismo, através do declínio do consumo de folatos, metionina, colina ou zinco, entre outros, terá efeitos prejudiciais. Aliás, a menor ingestão destes nutrientes está relacionada com um aumento do desenvolvimento PCa (52), pelo que é desaconselhada. Ainda sobre a modulação da ação da SAM, outra hipótese proposta é a estimulação da catecol-O-metilo transferase (COMT), responsável pela conversão da SAM em S-adenosil-L-homocisteína, um potente inibidor das DNMT (49,51,52). No que respeita ao ponto 3, são vários os compostos que parecem modular, *in vitro*, e de modo dependente da dose, diretamente a atividade das DNMT. Entre eles, destacam-se as catequinas do chá verde (49,51,52), as isoflavonas de soja e os sulforafanos (49,52).

É de notar, todavia, a existência de uma grande inconsistência de resultados (51,52). Esta discrepância pode ser explicada, pelo menos em parte, por diferentes métodos de análise e condições de cultura, pela especificidade celular ou genética dos vários compostos (51), pelas diferentes doses e formulações utilizadas, ou pelo *timing* e estágio dos tumores no momento da administração (52). Deste modo, mais estudos com protocolos bem definidos e reprodutíveis são necessários.

Relativamente às alterações nas histonas, apesar de assente que tanto a metilação como a acetilação são importantes, o segundo mecanismo tem sido, sem dúvida, o mais estudado, quer na vertente farmacológica quer na dietética (52). Nomeadamente, o uso de inibidores das HDAC apresenta-se como uma perspetiva futura bastante interessante. Com base em evidências *in vitro* e *in vivo*, estão já em curso vários ensaios clínicos para estudar a sua eficácia (52).

É evidente que o uso de inibidores das HDAC vai aumentar a acetilação global das histonas e, conseqüentemente, desequilibrar a relação acetilação/desacetilação. Interessantemente, porém, parece haver especificidade celular na resposta à acetilação, pois apenas as células neoplásicas aparentam ser afetadas, resultando na sua diferenciação celular, no bloqueio do ciclo celular e na apoptose (52).

Têm sido vários os compostos naturais estudados com atividade inibitória das HDAC, como os sulforafanos, o selénio, a curcumina ou as catequinas do chá verde. No geral, os resultados, pelo menos *in vitro*, têm sido bastante promissores (49,52,54). O facto de inibirem as HDAC de maneira competitiva e não competitiva, e de os seus efeitos exercerem-se sobre múltiplos mecanismos (49,52) são aspetos bastante relevantes, pois como temos vindo a discutir, são imensos os genes, proteínas e moléculas envolvidos no desenvolvimento do PCa.

Os possíveis efeitos secundários da modulação dos mecanismos epigenéticos merecem uma consideração. Ho *et al.*, por exemplo, relatam a ocorrência de cardiotoxicidade em alguns estudos com fármacos inibidores das HDAC e das DNMT (52). Sobre esta matéria, Henning *et al.* reconhecem que a evidência dos estudos em humanos é pequena e que as modificações dietéticas produzem efeitos subtis nas alterações epigenéticas. Todavia, aqueles autores defendem que, atendendo aos factos de os produtos naturais terem reduzida toxicidade e de serem administrados de forma repetitiva e a longo prazo, existem interessantes perspetivas quanto ao seu emprego na modulação dos mecanismos epigenéticos com vista à quimioprevenção (51).

Como conclusão, salienta-se que a atuação sobre os vários mecanismos epigenéticos em simultâneo poderá trazer maiores benefícios para a quimioprevenção do que o foco em apenas um deles em particular (51). Torna-se, então, essencial compreender plenamente os diversos processos por que ocorrem os vários mecanismos epigenéticos, as relações entre eles, bem como esclarecer quais os compostos, doses e formas de administração ideais. Como

avisam Abbas e os seus colaboradores, apesar de existirem evidências promissoras, elas são, na sua grande maioria, apenas indicativas e não descritivas dos vários mecanismos de ação, pelo que devem ser envidados esforços adicionais na sua compreensão (54). Finalmente, Ho *et al.* alertam para que as relações entre a genética e a epigenética sejam, também, tidas em conta, na medida em que a suscetibilidade individual à doença e a eficácia de determinado composto são, provavelmente, determinadas por mecanismos de controlo genético e epigenético (52). Além disso, como salientado por Thakur *et al.*, os defeitos epigenéticos, reversíveis, podem culminar em defeitos genéticos, irreversíveis (49). Portanto, atuar no momento certo é crucial para a quimioprevenção.

## VI – CONCLUSÃO

O PCa, pela sua prolongada história natural, por possuir lesões pré-neoplásicas bem estabelecidas e pela existência de biomarcadores, nomeadamente o PSA, que, apesar da sua baixa especificidade para esta doença, permite, de uma maneira mais ou menos fidedigna, monitorizar a sua evolução, é um alvo ideal para a quimioprevenção. Atrasar a carcinogénese na próstata fará com que a doença ocorra numa idade já avançada, não a tornando, por isso, na causa de morte mais provável do doente. Além disso, a quimioprevenção nos indivíduos jovens evitará o desenvolvimento do PCa, bem como as importantes comorbilidades que acompanham o tratamento com intuítos curativos desta doença, proporcionando-lhes, deste modo, uma maior qualidade de vida.

A complexidade de mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento do PCa é grande. O conhecimento de como e quando ocorrem, e de quais as moléculas e reações envolvidas, permitir-nos-á atuar sobre esses mecanismos de modo a suprimir ou, pelo menos, atrasar a carcinogénese. Apesar de ainda longe de completamente esclarecidos, conhece-se, já, a influência de alguns aspetos fulcrais, nomeadamente no que concerne ao papel da sinalização celular, da inflamação e *stress* oxidativo, e das alterações epigenéticas na iniciação, promoção e progressão do PCa. Os mecanismos envolvidos nestes processos surgem, assim, como interessantes alvos para a quimioprevenção desta doença.

No que toca à sinalização celular, é de enfatizar o elevado número de vias e moléculas envolvidas, quer na promoção, quer na inibição, do desenvolvimento tumoral. A estratégia para a prevenção passará, logicamente, pelo bloqueio das primeiras e estimulação das segundas. Refira-se que, apesar da importância de todas as vias de sinalização celular, a do AR é a mais preponderante. Com efeito, as células neoplásicas da próstata são dependentes dos androgénios para sobreviverem. Nesse sentido, a inibição da ação daquele recetor hormonal permite reduzir o crescimento tumoral e conduzir as células malignas para a apoptose. Como

a supressão geral dos androgénios traz, associadamente, alguns efeitos secundários, devidos à quebra nos níveis de testosterona, a estratégia passa pela supressão seletiva da principal hormona atuante nas células prostáticas: a DHT. Conseguimo-la através do bloqueio da 5-AR. Com efeito, esta é uma enzima extremamente importante para o PCa, tendo-se verificado que os seus níveis estão aumentados nesta doença. Efetivamente, a inibição da 5-AR, através do uso de 5-ARIs, nomeadamente a finasterida e a dutasterida, apresenta resultados bastante promissores na redução da incidência daquele carcinoma. Apesar de estes fármacos ainda não constarem nas normas para a prevenção do PCa, a sua utilização em doentes de alto risco poderá ser considerada, desde que sejam tomadas as devidas precauções como, por exemplo, o doente ser informado de que se trata de um tratamento *off-label*, com alguns riscos e com desfecho a longo prazo ainda incerto.

Ainda no respeitante à sinalização celular, o papel das outras vias envolvidas na carcinogénese da próstata, como as do PI3K/Akt/mTOR, do NF- $\kappa$ B, do Wnt/catenina- $\beta$ , entre outras, também deve ser considerado. Na realidade, também estas vias estão comumente ativas no PCa, sendo, inclusive, preditoras de mau prognóstico. Destaca-se, por exemplo, que o crescimento hormono-independente e a resistência ao tratamento são, pelo menos em parte, da responsabilidade destas vias de sinalização. Por isso, e tendo em conta a extensa relação e interdependência entre os diferentes mecanismos envolvidos na sinalização celular, para uma quimioprevenção realmente eficaz, teremos de ser capazes de atingir e modular várias vias e moléculas em simultâneo. Infelizmente, no estado atual da arte médica, isso ainda não é possível.

No referente à inflamação, é hoje bem aceite a sua relação com o PCa. Com efeito, a PIA é observada, habitualmente, na zona periférica da próstata, onde também ocorrem a PIN e o PCa. Além disso, uma grande percentagem das PIN evolui a partir das PIA. Ademais, o aumento da expressão da COX, enzima central do processo inflamatório, observado no PCa, é

preditor de pior prognóstico. O estado inflamatório, pela contínua produção de citocinas e fatores de crescimento, estimula a proliferação celular, a angiogénese e a evasão da apoptose, fundamentais para o crescimento e sobrevivência tumorais. Além disso, a inflamação contribui para a lesão de células normais que, deste modo, serão substituídas pelas malignas. Neste ponto, realça-se a importância da via do NF- $\kappa$ B na amplificação e perpetuação de um estado inflamatório crónico e, portanto, de uma constante agressão celular.

Relembre-se, ainda, que a inflamação e o *stress* oxidativo estão intimamente relacionados. Com efeito, as células inflamatórias são responsáveis pela libertação de ROS que, pelos seus efeitos nos lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, danificam as membranas celulares, alteram ou inativam diversas proteínas, perturbando, conseqüentemente, a sua normal atividade, e lesam o DNA, culminando na sua hipermetilação ou em mutações génicas. Também a contribuir para o elevado *stress* oxidativo no PCa está a diminuição da capacidade antioxidante celular que pode, por exemplo, resultar do silenciamento de genes com aquela função, devido ao efeito da lesão no DNA por parte das ROS.

Tendo em consideração estes aspetos, a inflamação e o *stress* oxidativo têm sido investigados no sentido da sua intervenção na quimioprevenção do PCa. Os resultados são, contudo, inconsistentes e as evidências a favor são, ainda, fracas. Para além das razões para a discrepância nos resultados observados, já discutidas ao longo do trabalho, talvez a explicação passe pelo facto de que a inflamação e o *stress* oxidativo podem, por si só, não ser suficientes para a indução do desenvolvimento tumoral. Assim, devem ser envidados esforços no sentido da sua integração nos restantes aspetos responsáveis pelo crescimento neoplásico, com vista a uma quimioprevenção global mais eficaz.

Finalmente, no que concerne à epigenética, a ideia que as alterações neste domínio são tão ou mais importantes do que as mutações genéticas para o PCa é cada vez mais aceite pela comunidade científica. Alterações no padrão de metilação do DNA, na estrutura da cromatina,

pelas modificações nas histonas, e a influência de miRNAs contribuem, no seu conjunto, para a iniciação e progressão do PCa.

No que refere à metilação do DNA, verifica-se, nesta doença, um padrão de hipometilação global do genoma, que contribui para a instabilidade cromossómica, e de hipermetilação específica de determinados genes, nomeadamente, dos supressores tumorais, que estão, portanto, inativos.

Sobre as alterações nas histonas, os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento do PCa são a sua acetilação e metilação. De um modo simples, a acetilação das histonas diminui a sua afinidade ao DNA, abrindo a cromatina, e permitindo o acesso de fatores de transcrição, responsáveis pelo crescimento tumoral. Por seu turno, a desacetilação das histonas condensa a cromatina impedindo, assim, a transcrição de genes supressores tumorais.

No que respeita à metilação das histonas, deve ser realçado que o conceito de código das histonas, em que elas exibem marcas repressivas ou ativadoras, está cada vez mais implementado. Esta ideia põe, de certo modo, em causa a noção original de que a metilação das histonas contribui a condensação da cromatina, impedindo a transcrição génica. Efetivamente, sabe-se hoje que, dependendo da marca que exibam (ou que, em determinado momento da carcinogénese seja metilada), a metilação pode tanto inibir como promover a transcrição génica.

Por fim, relativamente à ação dos miRNAs no desenvolvimento do PCa, deve ser salientado que, nesta doença, se verifica um aumento da expressão dos miRNAs silenciadores dos genes supressores tumorais e um declínio dos silenciadores dos oncogenes. Além disso, a sua ação no silenciamento dos supressores tumorais parece dar-se quer a nível da transcrição génica, quer a nível da tradução.

Pelo seu carácter reversível e pelo facto de ocorrerem desde cedo na carcinogénese, as alterações epigenéticas são alvos importantes para a quimioprevenção do PCa. Contudo, também neste ponto as evidências não permitem, para já, a recomendação de algum produto específico com vista à redução do risco desta doença.

Finalmente, o facto de a quimioprevenção do PCa, apesar de promissora, não ser, ainda, uma realidade merece algumas reflexões. Em primeiro lugar, importa considerar a consistência dos resultados obtidos. De facto, para além dos 5-ARIs, nenhum outro composto provou, até hoje, reduzir eficazmente a incidência do PCa em grandes ensaios clínicos. Sem evidências suficientemente fortes sobre a eficácia e a segurança dos vários produtos em estudo, os resultados laboratoriais, mesmo que prometedores, não poderão ser transpostos para a prática clínica. Por outro lado, contrariamente ao que sucede na quimioterapia, os sucessos na área da quimioprevenção não são muito divulgados junto das sociedades (3). Além disso, a falta de interesse da indústria farmacêutica para a quimioprevenção do PCa, o desconhecimento geral dos médicos sobre esta possibilidade, resultando num menor recrutamento de doentes de alto risco para ensaios clínicos, o receio do público dos efeitos laterais e, ainda, a falta de apoio estatal no fornecimento de fundos para a pesquisa nesta área (3) têm, no seu conjunto, contribuído para que, hoje em dia, ainda não seja possível ao clínico prescrever determinado fármaco ou produto natural para a quimioprevenção do PCa.

Concluindo, o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na carcinogénese do PCa permite, para além da investigação terapêutica, pesquisar maneiras de prevenir aquela doença. São já conhecidos alguns aspetos fundamentais que podem ser modulados, nomeadamente no que diz respeito à sinalização celular, à inflamação e à epigenética. A investigação futura deve, portanto, concentrar-se no melhoramento da eficácia, nas doses, no *timing* de administração e na segurança dos diferentes compostos já identificados. Além disso, a procura de novos produtos e a investigação para melhorar a

compreensão das extremas relações entre os diferentes mecanismos também não devem ser esquecidas. Lembra-se que, quanto mais abrangente for a quimioprevenção, mais eficaz será e, portanto, mais perto estará de ser uma realidade.

**VII – AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Carlos Rabaça, meu orientador, pela oportunidade de explorar o tema da Quimioprevenção do Cancro da Próstata e pelo acompanhamento e esclarecimento pronto das dúvidas que surgiram ao longo deste projeto.

À Professora Doutora Anabela Mota Pinto, minha coorientadora, pela oportunidade de trabalhar na área da Fisiopatologia, pela disponibilidade e prontidão de resposta e pelas pertinentes sugestões e conselhos que permitiram enriquecer este trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Helena Donato, Diretora do Serviço de Documentação do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pela formação na área da pesquisa bibliográfica, de inestimável valor para a realização deste trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Rita Guerreiro, da Biblioteca das Ciências da Saúde da Universidade de Coimbra, pela pronta disponibilidade e ajuda na aquisição dos vários artigos analisados.

À minha Mãe, pelos valiosos conselhos ao longo de todo este processo e pela revisão e correção final do trabalho. Pelo carácter, orgulho, exemplo e força de sempre.

Ao meu irmão Francisco, pela companhia de todas as horas.

Aos meus avós, Lucinda e António, pelo carinho, paciência, orgulho e ajuda constantes, não só na realização deste trabalho, como ao longo de todo o meu percurso académico.

Ao meu tio Mário, aos meus padrinhos, Paulo e Helena, e ao meu primo André, pela sempre presente palavra de otimismo.

A todas as outras pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para o sucesso deste percurso que agora finda.

**VIII – REFERÊNCIAS**

1. International Agency for Research on Cancer. Fact Sheets by Cancer [Internet]. Globocan 2012. 2012 [cited 2015 Jan 14]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
2. Miranda N, Portugal C, Nogueira PJ, Farinha CS, Soares A, Alves MI, et al. Portugal – Doenças Oncológicas em números – 2014. Lisboa: Direção Geral de Saúde; 2014. 11;12;45 p.
3. Mukhtar H. Chemoprevention: making it a success story for controlling human cancer. *Cancer Lett.* 2012;326(2):123–7.
4. Steward WP, Brown K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *Br J Cancer.* 2013;109(1):1–7.
5. Tan AC, Konczak I, Sze DM-Y, Ramzan I. Molecular pathways for cancer chemoprevention by dietary phytochemicals. *Nutr Cancer.* 2011;63(4):495–505.
6. Wu X, Patterson S, Hawk E. Chemoprevention--history and general principles. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25(4-5):445–59.
7. Ting H, Deep G, Agarwal C, Agarwal R. The strategies to control prostate cancer by chemoprevention approaches. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen.* 2014;760:1–15.
8. Nambiar D, Singh RP. Advances in prostate cancer chemoprevention: a translational perspective. *Nutr Cancer.* 2013;65(S1):12–25.
9. Rosenberg MT, Froehner M, Albala D, Miner MM. Biology and natural history of prostate cancer and the role of chemoprevention. *Int J Clin Pract.* 2010;64(13):1746–53.
10. Sarkar F, Li Y, Wang Z, Kong D. Novel targets for prostate cancer chemoprevention. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(3):195–212.
11. Venkateswaran V, Klotz LH. Diet and prostate cancer: mechanisms of action and implications for chemoprevention. *Nat Rev Urol.* 2010;7(8):442–53.

12. Ma RW-L, Chapman K. A systematic review of the effect of diet in prostate cancer prevention and treatment. *J Hum Nutr Diet.* 2009;22(3):187–99.
13. Cheetham PJ, Katz AE. Diet and Prostate Cancer: A Holistic Approach to Management. In: Tewari A, editor. *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective.* London: Springer London; 2013. p. 355–67.
14. Wang K, Fan D-D, Jin S, Xing N-Z, Niu Y-N. Differential expression of 5-alpha reductase isozymes in the prostate and its clinical implications. *Asian J Androl.* 2014;16(2):274–9.
15. Welén K, Damber J-E. Prostate diseases--role of sex steroids and their inhibitors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(2):355–67.
16. Corona G, Baldi E, Maggi M. Androgen regulation of prostate cancer: Where are we now? *J Endocrinol Invest.* 2011;34:232–43.
17. Li J, Kim J. Molecular profiles of finasteride effects on prostate carcinogenesis. *Cancer Prev Res.* 2009;2:518–24.
18. Stanczyk FZ, Azen CG, Pike MC. Effect of finasteride on serum levels of androstenedione, testosterone and their 5 $\alpha$ -reduced metabolites in men at risk for prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013;138:10–6.
19. Wu Y, Godoy A, Azzouni F, Wilton JH, Ip C, Mohler JL. Prostate Cancer Cells Differ in Testosterone Accumulation, Dihydrotestosterone Conversion, and Androgen Signaling Response to Steroid 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitors. *Prostate.* 2013;73(13):1470–82.
20. Ramsay AK, Leung HY. Signalling pathways in prostate carcinogenesis: potentials for molecular-targeted therapy. *Clin Sci.* 2009;117(6):209–28.
21. Won K-J, Kim BK, Han G, Lee K, Jung Y-J, Kim H-M, et al. NSC126188 induces apoptosis of prostate cancer PC-3 cells through inhibition of Akt membrane translocation, FoxO3a activation, and RhoB transcription. *Apoptosis.* 2014;19(1):179–90.

22. Wertz K. Lycopene effects contributing to prostate health. *Nutr Cancer*. 2009;61(6):775–83.
23. Keum Y-S, Khor TO, Lin W, Shen G, Kwon KH, Barve A, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of broccoli sprouts on the suppression of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: implication of induction of Nrf2, HO-1 and apoptosis and the suppression of Akt-dependent kinase p. *Pharm Res*. 2009;26(10):2324–31.
24. Saleem M, Murtaza I, Tarapore RS, Suh Y, Adhami VM, Johnson JJ, et al. Lupeol inhibits proliferation of human prostate cancer cells by targeting beta-catenin signaling. *Carcinogenesis*. 2009;30(5):808–17.
25. Taneja SS, Morton R, Barnette G, Sieber P, Hancock ML, Steiner M. Prostate cancer diagnosis among men with isolated high-grade intraepithelial neoplasia enrolled onto a 3-year prospective phase III clinical trial of oral toremifene. *J Clin Oncol*. 2013;31(5):523–9.
26. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, et al. The Influence of Finasteride on the Development of Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(3):215–24.
27. Marberger M, Adolfsson J, Borkowski a., Fitzpatrick J, Kirk D, Prezioso D, et al. The clinical implications of the Prostate Cancer Prevention Trial. *BJU Int*. 2003;92(7):667–71.
28. Andriole GL, Bostwick DG, Brawley OW, Gomella LG, Marberger M, Montorsi F, et al. Effect of Dutasteride on the Risk of Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2010;362:1192–202.
29. Andriole GL, Bostwick DG, Gomella LG, Marberger M, Montorsi F, Tammela TL, et al. Modeling and analysis of Gleason score 8-10 prostate cancers in the REDUCE study. *Urology*. 2014;84(2):393–9.

30. Barqawi AB, O'Donnell CI, Siomos VJ, Hou AH. The effect of short-term dutasteride intake in early-stage prostate cancer: analysis of 148 patients who underwent three-dimensional prostate mapping biopsy. *Urology*. 2010 Nov;76(5):1067–71.
31. Chhipa RR, Halim D, Cheng J, Zhang HY, Mohler JL, Ip C, et al. The Direct Inhibitory Effect of Dutasteride or Finasteride on Androgen Receptor Activity is Cell Line Specific. *Prostate*. 2013;73(14):1483–94.
32. Margel D, Nandy I, Wilson TH, Castro R, Fleshner N. Predictors of pathological progression among men with localized prostate cancer undergoing active surveillance: a sub-analysis of the REDEEM study. *J Urol*. 2013;190(6):2039–45.
33. Al Edwan G, Fleshner N. 5-Alpha Reductase Inhibitors in Patients on Active Surveillance: Do the Benefits Outweigh the Risk? *Curr Urol Rep*. 2013;14(3):223–6.
34. Hamid ARAH, Umbas R, Mochtar CA. Recent Role of Inflammation in Prostate Diseases: Chemoprevention Development Opportunity. *Acta Med Indones - Indones J Intern Med*. 2011;43(1):59–65.
35. Nakai Y, Nonomura N. Inflammation and prostate carcinogenesis. *Int J Urol*. 2013;20(2):150–60.
36. Lamy S, Akla N, Ouanouki A, Lord-Dufour S, Béliveau R. Diet-derived polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the interleukin-6/STAT3 pathway. *Exp Cell Res*. 2012;318(13):1586–96.
37. Paschos A, Pandya R, Duivenvoorden WCM, Pinthus JH. Oxidative stress in prostate cancer: changing research concepts towards a novel paradigm for prevention and therapeutics. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013;16(3):217–25.
38. Gurel B, Lucia MS, Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Kristal AR, et al. Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer

in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(5):847–56.

39. Narayanan NK, Nargi D, Horton L, Reddy BS, Bosland MC, Narayanan BA. Inflammatory processes of prostate tissue microenvironment drive rat prostate carcinogenesis: preventive effects of celecoxib. *Prostate.* 2009;69(2):133–41.

40. Tang MX, Ogawa K, Asamoto M, Chewonarin T, Suzuki S, Tanaka T, et al. Effects of nobiletin on PhIP-induced prostate and colon carcinogenesis in F344 rats. *Nutr Cancer.* 2011;63(2):227–33.

41. Brasky TM, Till C, White E, Neuhaus ML, Song X, Goodman P, et al. Serum phospholipid fatty acids and prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *Am J Epidemiol.* 2011;173(12):1429–39.

42. Silva MT, Galvao TF, Zimmerman IR, Pereira MG, Lopes LC. Non-aspirin Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs for the Primary Chemoprevention of Non-gastrointestinal Cancer: Summary of Evidence. *Curr Pharm Des.* 2012;18(26):4047–70.

43. Swami S, Krishnan A V, Moreno J, Bhattacharyya RS, Gardner C, Brooks JD, et al. Inhibition of prostaglandin synthesis and actions by genistein in human prostate cancer cells and by soy isoflavones in prostate cancer patients. *Int J Cancer.* 2009;124:2050–9.

44. Choe KS, Cowan JE, Chan JM, Carroll PR, D'Amico A V., Liauw SL. Aspirin use and the risk of prostate cancer mortality in men treated with prostatectomy or radiotherapy. *J Clin Oncol.* 2012;30(28):3540–4.

45. Bosetti C, Rosato V, Gallus S, La Vecchia C. Aspirine and Prostate Cancer Prevention. In: Cuzick J, Thorat MA, editors. *Prostate Cancer Prevention.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 93–100.

46. Cuzick J, Otto F, Baron JA, Brown PH, Burn J, Greenwald P, et al. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):501–7.
47. Zhang Y, Zhang J, Wang L, Quealy E, Gary BD, Reynolds RC, et al. A novel sulindac derivative lacking cyclooxygenase-inhibitory activities suppresses carcinogenesis in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Cancer Prev Res.* 2010;3(7):885–95.
48. Vance TM, Su J, Fontham ETH, Koo SI, Chun OK. Dietary antioxidants and prostate cancer: a review. *Nutr Cancer.* 2013;65(6):793–801.
49. Thakur VS, Deb G, Babcook MA, Gupta S. Plant phytochemicals as epigenetic modulators: role in cancer chemoprevention. *AAPS J.* 2014;16(1):151–63.
50. Cooper CS, Foster CS. Concepts of epigenetics in prostate cancer development. *Br J Cancer.* 2009;100(2):240–5.
51. Henning SM, Wang P, Carpenter CL, Heber D. Epigenetic effects of green tea polyphenols in cancer. *Epigenomics.* 2013;5(6):729–41.
52. Ho E, Beaver LM, Williams DE, Dashwood RH. Dietary factors and epigenetic regulation for prostate cancer prevention. *Adv Nutr.* 2011;2(6):497–510.
53. Chiam K, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T. Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses. *Cancer Lett.* 2014;342(2):248–56.
54. Abbas A, Patterson W, Georgel PT. The epigenetic potentials of dietary polyphenols in prostate cancer management. *Biochem Cell Biol.* 2013;91(6):361–8.
55. Chang Z, Zhou H, Liu Y. Promoter methylation and polymorphism of E-cadherin gene may confer a risk to prostate cancer : a meta-analysis based on 22 studies. *Tumor Biol.* 2014;35(10):10503–13.

56. Shu L, Khor TO, Lee J-H, Boyanapalli SSS, Huang Y, Wu T-Y, et al. Epigenetic CpG Demethylation of the Promoter and Reactivation of the Expression of Neurog1 by Curcumin in Prostate LNCaP Cells. *AAPS J.* 2011;13(4):606–14.
57. Lee Y-H, Kwak J, Choi H-K, Choi K-C, Kim S, Lee J, et al. EGCG suppresses prostate cancer cell growth modulating acetylation of androgen receptor by anti-histone acetyltransferase activity. *Int J Mol Med.* 2012;30:69–74.
58. Park SY, Lee Y-H, Choi K-C, Seong A-R, Choi H-K, Lee O-H, et al. Grape Seed Extract Regulates Androgen Receptor-Mediated Transcription in Prostate Cancer Cells Through Potent Anti-Histone Acetyltransferase Activity. *J Med Food.* 2011;14:9–16.
59. Sidana A, Wang M, Shabbeer S, Chowdhury WH, Netto G, Lupold SE, et al. Mechanism of growth inhibition of prostate cancer xenografts by valproic acid. *J Biomed Biotechnol.* 2012;12:1–9.