

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

TESE DE DOUTORADO

Análise imunogenética e de expressão do *HLA-G* em câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna

FRANCIS MARIA BÃO ZAMBRA

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Coorientador: Dr. Vanderlei Biolchi

Porto Alegre, maio de 2016.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética, Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral do Departamento de Fisiologia (UFRGS) e no Centro de Pesquisas Experimentais (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

APOIO FINANCEIRO

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

FIPE-HCPA – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos - Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

Dedico esta tese aos meus pais, Jorge e Clair, e ao meu irmão Diorge, pois esta conquista reflete seu apoio incondicional e exemplo de conduta e dedicação. Dedico ainda ao meu orientador de Mestrado e Doutorado, José Artur, e às demais pessoas que contribuíram para minha formação acadêmico-científica.

“DAS IDEIAS

Qualquer ideia que te agrade,

Por isso mesmo ... é tua.

O autor nada mais fez que vestir a verdade
Que dentro de ti se achava inteiramente nua ...”

Mário Quintana

Agradecimentos

Aos meus pais, Jorge Zambra e Clair Bão, agradeço pelo amor incondicional, pelo apoio constante e por todos os ensinamentos. Agradeço por terem colocado minha educação no topo de suas prioridades, por terem trabalhado arduamente para que eu tivesse a melhor educação possível e para que nunca me faltasse nada. Agradeço por terem entendido minha ausência, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim, e por serem exemplos de amor, caráter e dedicação.

Ao meu irmão Diorge Zambra, por todo amor, incentivo, pelos conselhos e ensinamentos, por sempre cuidar de mim e pelo exemplo que representa. À minha cunhada Fernanda Bueno, que é tão especial e mãe do meu futuro e já amado sobrinho humano, hehe, agradeço por todo amor, apoio e pelo privilégio que é tê-la em nossa família.

Ao Caio Cerqueira, por sempre estar ao meu lado, me apoiando, acalmando e incentivando, por todo seu amor, companheirismo, por sua lealdade, pelos ótimos momentos vividos dentro e fora da UFRGS, e por ter tornado meus dias mais leves e cheios de alegria nessa trajetória. Agradeço ainda por ter me ensinado muita coisa, por sua competência inspiradora e pela direta contribuição nesse trabalho.

Ao meu orientador, Prof. José Artur Bogo Chies (o Zécartur), agradeço pelo tanto que aprendi com ele, tanto na área profissional como pessoal, pela liberdade e oportunidade de crescimento profissional, pela amizade, confiança, disponibilidade, pelo incentivo, por lutar como um pai para que sua filha adolescente virasse gente, hehe, e pelo exemplo de pesquisador e ser humano que representa. Agradeço ainda pelo carinho que nós, filhos-orientados, sempre recebemos em forma de caixas de “negObauer” que tornam nossos dias no trabalho mais doces e felizes!

Ao Prof. Vanderlei Biolchi, por me coorientar, por sua disponibilidade, amizade, contribuição, por seu apoio e pelo que aprendi com ele.

À Prof. Ilma Brum, pela colaboração essencial para a realização desse trabalho.

A todos colegas do LBNET que de alguma forma contribuíram para o trabalho, em especial à Patrícia, Carol K., Gabriela, Lolita e ao Diego.

Ao Prof. Erick Castelli, por publicar artigos de excelente qualidade que serviram de inspiração para a proposta do meu trabalho e pela direta contribuição nesse trabalho.

À patologista Francine de Oliveira, por ter aceitado participar do estudo e por sua disponibilidade.

À Flávia, à Emily e ao Michael, do CPB/KCPA, pelo importante auxílio técnico e pela paciência.

À Sídia Jacques (PPGBM), à Vânia Hirakata (KCPA) e ao Luciano Guimarães (KCPA), pela importante assessoria estatística.

À banca de qualificação do doutorado formada pela Dra. Tatiana Roman e pelo Dr. Gustavo Fioravanti, bem como à banca de doutorado formada pela Dra. Ursula Matte, Dra. Vanessa Matteri e pelo Dr. Guido Lenz. Agradeço por eles terem dedicado seu tempo e contribuído com críticas e sugestões que só enriqueceram nosso trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Imunogenética: Maria, Joel, Lian, Michita, Jacque, Tiago, Nadine, Giovana, Rúbia, Valéria, Priscila, Ana, Bruno, Bruna, Eriza, Anne, e ao povo da UFPE, Anselmo, Catarina e Ronaldo. Agradeço pelos fortes laços de amizade criados, pelo bom ambiente de trabalho, pelos cafés, pelas cervejas e boas conversas e risadas, pela troca de conhecimento e por todo apoio.

A todos colegas do Núcleo de Bioinformática, Martiela, Bragatte, Renata, Mateus, e especialmente ao Dinler Antunes, à Marialva Sinigaglia, ao Maurício Rigo, ao Marcus Mendes e ao Gustavo Fioravanti. Agradeço pela amizade verdadeira que sei que permanecerá *ad infinitum*, pelo acolhimento, carinho, apoio, companheirismo, pela alegria constantemente proporcionada e por toda ajuda. Essa família foi muito importante nessa minha trajetória.

Ao Felipe Oliveira e à Ana Christoff, irmãos de coração, pela amizade de longa data, por terem dividido um lar comigo e cuidado de mim, salvando tantas vezes minha vida de baratas assassinas, pelo apoio, por toda ajuda e troca de ideias.

À Márcia Göetze, pela amizade, pela força, pelos desabaços e por ser uma ótima parceira de apartamento.

Ao Programa de Genética e Biologia Molecular (PPGBM-UFRRS) e ao Centro de Pesquisa Experimental (CPB-KCPA), especialmente aos respectivos secretários Elmo e Everaldo, agradeço pela disposição constante em ajudar, e pela incrível eficiência e dedicação.

À UFRRS, ao CNPq e ao FINE-KCPA, pelo apoio financeiro indispensável para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
Capítulo I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	14
Introdução	15
Câncer de Próstata.....	15
Hiperplasia Prostática Benigna.....	19
Imunidade antitumoral <i>versus</i> escape tumoral.....	20
Antígeno Leucocitário Humano G.....	22
Objetivos	29
Objetivo Geral.....	29
Objetivos Específicos.....	29
Capítulo II – <i>Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia - the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk</i>	30
Capítulo III – <i>High HLA-G protein expression levels are a common feature in prostate cancer but not in benign prostatic hyperplasia</i>	41
Capítulo IV – <i>Cytokine profile in prostate cancer and benign hyperplasia</i>	67
Capítulo V – DISCUSSÃO GERAL.....	94
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....	105
ANEXOS.....	120

Anexo I - Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos voluntários do grupo controle do Projeto.....	120
Anexo II - Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos voluntários do grupo controle do Biorrepositório - banco de DNA pré-estabelecido.....	122
Anexo III - Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos voluntários do grupo dos casos - hiperplasia prostática benigna/câncer de próstata - do Projeto.....	124
Anexo IV - Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos voluntários do grupo dos casos - hiperplasia prostática benigna/câncer de próstata - do Biorrepositório - banco de DNA pré-estabelecido.....	127
Anexo V - Aprovação do projeto de pesquisa pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaP: Câncer de Próstata

CRPC (*Castration-Resistant Prostate Cancer*): Câncer de Próstata metastático Resistente à Castração

CTL (*Cytotoxic T Lymphocyte*): Linfócito T Citotóxico

DNA (*Deoxyribonucleic Acid*): Ácido Desoxirribonucleico

FDA (*Food and Drug Administration*): Administração de Alimentos e Drogas

HLA (*Human Leukocyte Antigen*): Antígeno Leucocitário Humano

HLA-G (*Human Leukocyte Antigen G*): Antígeno Leucocitário Humano G

HPB: Hiperplasia Prostática Benigna

IFN: Interferon

IL: Interleucina

INCA: Instituto Nacional de Câncer

ISUP (*International Society of Urological Pathology*): Sociedade Internacional de Patologia Urológica

MHC (*Major Histocompatibility Complex*): Complexo Principal de Histocompatibilidade

miRNA: micro RNA

mRNA (*messenger RNA*): RNA mensageiro

NK (*Natural Killer*)

NSCLC (*Non-Small Cell Lung Cancer*): Câncer de Pulmão de Células Não-Pequeñas

pb: pares de bases

PSA (*Prostatic Specific Antigen*): Antígeno Prostático Específico

RNA (*Ribonucleic Acid*): Ácido Ribonucleico

sHLA-G: HLA-G solúvel

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*): Polimorfismo de Nucleotídeo Único

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th (*T helper*): T auxiliar

TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*): Fator de Necrose Tumoral alfa

UICC (*Union for International Cancer Control*): União Internacional para Controle do Câncer

UTR (*Untranslated Region*): Região Não Traduzida.

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) e a hiperplasia prostática benigna (HPB) são condições tumorais prostáticas não relacionadas, de alta prevalência e que afetam homens com idade avançada. Suas etiologias não são bem compreendidas, havendo poucos fatores de risco reconhecidos, o que torna difícil a identificação dos indivíduos suscetíveis a estas doenças. A condição imunológica é um fator determinante no desenvolvimento e progressão tumoral. O antígeno leucocitário humano G (HLA-G) é uma molécula imunomodulatória relacionada a mecanismos de tolerância imunológica. Inúmeras evidências vêm apoiando o papel do HLA-G como um mecanismo de escape das células tumorais da imunidade antitumoral, sugerindo que a expressão desta molécula em pacientes com câncer possa ser prejudicial. Em condições patológicas e fisiológicas da próstata, pouco se conhece sobre o papel do HLA-G. No presente trabalho, investigamos a influência do *HLA-G* em câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. Participaram do estudo homens do sul do Brasil com CaP, HPB e indivíduos saudáveis predominantemente euro-descendentes. Inicialmente, oito polimorfismos da região 3' não traduzida (UTR) do gene *HLA-G* foram analisados em 468 indivíduos, incluindo o polimorfismo de inserção/deleção de 14 pares de bases (rs371194629), e os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) na posição +3003T/C (rs1707), +3010C/G (rs1710), +3027A/C (rs17179101), +3035C/T (rs17179108), +3142G/C (rs1063320), +3187A/G (rs9380142) e +3196C/G (rs1610696) do gene. Também foi caracterizado o perfil de expressão da proteína HLA-G em 53 tecidos cancerosos/hiperplásicos (CaP/HPB) e em porções avaliadas como normais de próstatas provenientes de pacientes com CaP e HPB. Por fim, o perfil imunológico sistêmico foi investigado em cada condição estudada através da caracterização do perfil de citocinas séricas Th1/Th2/Th17 nos três grupos (n=89). Para tanto, foram dosadas as citocinas interleucina (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e IL-17A. Nesse estudo, encontramos evidência de uma influência significativa de polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* na suscetibilidade ao CaP e nossos dados apoiam o uso da variante +3003 como um *tag* SNP para o risco de câncer de próstata. Além disso, foi possível diferenciar tecidos de próstata com câncer de tecidos com hiperplasia e tecidos normais pelo nível de expressão da proteína HLA-G.

Uma expressão elevada foi observada predominantemente nos tecidos com CaP, não sendo comum níveis elevados de expressão de HLA-G em tecidos normais e com HPB. Tais resultados fornecem evidência de considerável influência da expressão proteica de HLA-G no desenvolvimento de CaP. Como um potencial mecanismo de escape das células cancerosas da próstata da imunidade antitumoral, o HLA-G representa um potencial alvo terapêutico para CaP. Quanto ao perfil imunológico sistêmico nas condições avaliadas, observamos nível elevado de IL-10 e TNF- α diferenciando homens com CaP dos saudáveis, enquanto níveis elevados de IFN- γ e IL-17A diferenciaram pacientes com HPB dos com CaP. Concluindo, nossos dados apontam um perfil relacionado à tolerância imunológica em câncer de próstata, influenciado pelo HLA-G e capaz de favorecer o desenvolvimento deste câncer. Já em HPB, que apesar de ser uma condição tumoral, é benigna, indícios de maior responsividade do sistema imune foram encontrados.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are unrelated prostatic tumoral conditions, highly prevalent and affecting aged men. Their etiologies are not well understood, with few risk factors recognized, which make the identification of susceptible individuals to the disease difficult. The immunological condition is determinant in tumor development and progression. The human leukocyte antigen G (HLA-G) is an immunomodulatory molecule related to mechanisms of immunological tolerance. Several pieces of evidence have supported the role of HLA-G as an escape mechanism of tumor cells from antitumor immunity, suggesting that the expression of this molecule in cancer patients can be harmful. In pathological and physiological prostate conditions, little is known about the role of HLA-G. In the present work, we investigated the influence of *HLA-G* in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Men from South Brazil with PCa, BPH and healthy individuals predominantly euro-descendant were included in the study. Firstly, eight *HLA-G* 3' untranslated region (UTR) polymorphisms were analyzed in 468 individuals, including the 14 bp insertion/deletion polymorphism (rs371194629) and the single nucleotide polymorphisms (SNP) at gene position +3003T/C (rs1707), +3010C/G (rs1710), +3027A/C (rs17179101), +3035C/T (rs17179108), +3142G/C (rs1063320), +3187A/G (rs9380142) and +3196C/G (rs1610696). The profile of HLA-G protein expression was characterized in 53 cancerous/hyperplastic (PCa/BPH) and in areas evaluated as normal prostate tissues provenient from patients with PCa and BPH. Finally, the systemic immunological profile was investigated in each studied condition through the characterization of the Th1/Th2/Th17 serum cytokine profile in the three groups (n=89). For that, the concentration of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ), and IL-17A cytokines was measured. In this study, we found evidence of a significant influence of *HLA-G* 3'UTR polymorphisms in PCa susceptibility and our data support the use of the +3003 variant as a tag SNP for PCa risk. In addition, it was possible differentiate prostate tissues with cancer from with hyperplasia and normal tissues through the level of HLA-G protein expression. An elevated expression was observed predominantly in PCa tissues, but elevated level of HLA-G expression was not common in normal and BPH prostate tissues. These results

provide evidence of a considerable influence of HLA-G protein expression in PCa development. As a possible escape mechanism of prostate tumor cells from antitumor immunity, HLA-G represents a potential therapy target in PCa. About the systemic immunological profile in the evaluated conditions, high IL-10 and TNF- α level differentiated PCa patients from healthy men, while high IFN- γ and IL-17A level differentiated BPH from PCa patients. In conclusion, our data point out to a profile related to immunological tolerance in PCa, influenced by HLA-G and able to favour the cancer development. In BPH, a benign tumor condition, the data point out to a higher responsiveness of the immune system.

Capítulo I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

INTRODUÇÃO

Câncer de Próstata

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo mais comum de câncer nos homens e o quarto tipo mais comum no mundo (Ferlay *et al.*, 2013). Representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade relacionada ao câncer nos homens do mundo ocidental (Agarwal *et al.*, 2012). No Brasil, o CaP é o segundo mais incidente tipo de câncer na população geral e também no sexo masculino, e a segunda principal causa de morte por câncer entre os homens (DATASUS, 2014; INCA, 2016). O número de casos novos estimado para o ano de 2016, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), é de 61.200. Desconsiderando os cânceres de pele do tipo não melanoma, o CaP é o mais incidente entre os homens em todas regiões do Brasil, incluindo a região Sul (95 casos/100.000 homens), Centro-Oeste (67/100.000), Sudeste (62/100.000), Nordeste (51/100.000) e Norte (29/100.000). A capital do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, apresenta frequência elevada da doença, com cerca de 126 casos a cada 100 mil homens (INCA, 2016).

Apesar da alta prevalência do câncer de próstata, poucos fatores de risco estão bem estabelecidos. Dentre eles, destaca-se a idade. O CaP é raro antes dos 50 anos, mas sua incidência e mortalidade aumentam significativamente após esta idade (Gronberg, 2003; INCA, 2016). A hereditariedade é outro fator envolvido na etiologia da doença. Homens com um ou mais membros da família acometidos por CaP têm um risco de 2 a 11 vezes maior de desenvolvê-lo quando comparados com aqueles que não possuem histórico familiar (Reiter & Kernion, 2002). Além de fatores genéticos, outros fatores como etnia, influências hormonais (androgênio), ambientais e dieta podem contribuir para um risco aumentado de desenvolver CaP (Carter & Partin, 2002).

O adenocarcinoma de próstata é um dos tipos de tumores malignos com maior importância clínica em virtude de sua frequência elevada. Nos estágios iniciais, ele parece limitar-se à próstata. Quando não tratado, geralmente invade órgãos próximos (vesículas seminais, uretra e bexiga) e espalha-se para órgãos mais distantes (ossos, fígado e pulmões), provocando sérias consequências (Lefort & Almeida, 2004). Um dos

agravantes do CaP para os afetados é que os tumores só produzem manifestações clínicas quando a neoplasia atinge a cápsula prostática, isto é, quando a doença já apresenta-se relativamente avançada (IARC, 2010). Assim, o CaP caracteriza-se por uma evolução silenciosa. Muitos pacientes não apresentam sintomas na fase inicial da doença ou, quando apresentam, estes são semelhantes aos da hiperplasia prostática benigna (HPB). Geralmente associados ao trato urinário, tais sintomas incluem necessidade de urinar com maior frequência, jato urinário fraco, dificuldade de urinar, dentre outros. Na fase avançada, o CaP pode provocar dor óssea, sintomas urinários ou, quando mais grave, infecção generalizada ou insuficiência renal (INCA, 2016).

O diagnóstico para câncer de próstata passa por exame de toque retal e dosagem dos níveis séricos do antígeno prostático específico (PSA). O PSA pode apresentar-se elevado em várias situações, como hiperplasia prostática benigna, manipulações urológicas, prostatites, retenção urinária, não sendo um marcador específico do CaP. Além disso, níveis normais de PSA podem ser observados em até 27% dos pacientes com este tipo de câncer, o que complica seu uso como marcador diagnóstico (Goldstraw *et al.*, 2007). Assim, havendo indícios da doença por estes exames iniciais, é realizada ultrassonografia pélvica ou prostática transretal que indicará a necessidade de biópsia prostática transretal. O diagnóstico final de CaP é determinado pela histopatologia do tecido prostático obtido por biópsia. A análise do tecido permite a identificação da graduação histológica pelo escore de Gleason, que indica a taxa de crescimento tumoral e sua tendência à disseminação (INCA, 2016). O sistema de escore de Gleason baseia-se nos diferentes padrões histológicos do tumor (arquitetura tecidual). Cada fragmento de tecido obtido por biópsia (de 10 a 12 fragmentos) é particularmente avaliado e identificado por um escore de Gleason (Kunz & Epstein, 2003; Epstein *et al.*, 2005; 2016). Os tecidos são analisados sob microscópio óptico geralmente através de lente objetiva de 4x de aumento, podendo ser utilizado aumento de 10x, conforme o caso (Gordetsky & Epstein, 2016). No sistema de escore de Gleason são considerados cinco padrões histológicos aos quais se atribui um valor de 1 a 5, do tecido mais ao menos diferenciado. Valores mais altos representam maior agressividade tumoral (Epstein, 2010). Como o câncer de próstata é morfologicamente heterogêneo, o sistema de escore de Gleason foi criado considerando os dois padrões

mais comuns encontrados no tecido tumoral (Gleason & Mellinger, 1974) (Gordetsky & Epstein, 2016). O padrão dito primário é o predominante no tumor (perfazendo mais de 50% do padrão total observado). O padrão secundário é o segundo mais prevalente (representa de 5% a 50% do tecido tumoral). A soma dos graus dos dois padrões resulta num escore final, de 2 a 10 (Epstein, 2010). O escore de Gleason é apresentado como uma equação matemática. No exemplo $3 + 4 = 7$, o escore de Gleason é apresentado como $7(3+4)$ (Gordetsky & Epstein, 2016). Em casos que o câncer apresenta apenas um padrão histológico, o valor deste padrão é utilizado duas vezes, por exemplo, escore de Gleason $6(3+3)$. Para determinação de prognóstico e terapia, os médicos costumam considerar o escore de Gleason do fragmento de biópsia que apresentar câncer com grau mais elevado (Kryvenko & Epstein, 2016). O sistema de escore de Gleason é um dos mais poderosos preditores de prognóstico no CaP e tem passado por revisões e atualizações. No ano de 2014 ocorreram algumas mudanças nesse sistema após a Conferência de Consenso sobre Escore de Gleason em Câncer de Próstata da Sociedade Internacional de Patologia Urológica - ISUP (Epstein *et al.*, 2005; 2016). Uma mudança importante na prática é que o menor escore de Gleason utilizado passou a ser o 6, embora a escala vá de 2 a 10. Isso porque os padrões 1 e 2 são agora considerados alterações precoces que não necessariamente representam câncer (Kryvenko & Epstein, 2016). Por fim, os pacientes também são diagnosticados através do sistema de estadiamento tumoral. O mais utilizado é o Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, preconizado pela União Internacional para Controle do Câncer - UICC (INCA, 2016). Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença e determina o estadiamento do tumor primário (de órgão-confinado a totalmente invasivo - T1 a 4), o envolvimento ou não de nódulos linfáticos (N0 ou 1) e a presença e grau de metástases à distância (M0 e 1a-c) – Figura 1. Estas características tumorais aliadas ao escore de Gleason auxiliam na determinação do prognóstico e escolha do tratamento do paciente (Shen & Abate-Shen, 2010; INCA, 2016).

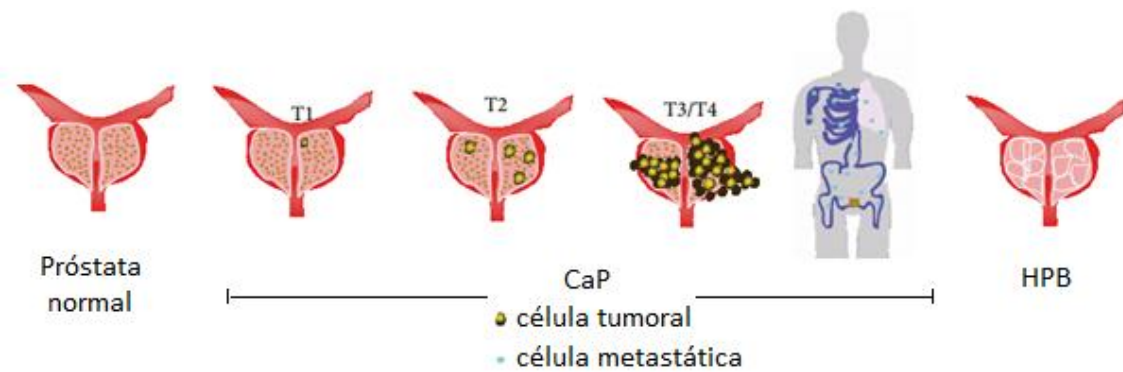


Figura 1. Representação esquemática de condições prostáticas: normal, câncer de próstata (CaP) e hiperplasia prostática benigna (HPB). T1 a T4 são os estadiamentos tumorais do CaP e definem a localização e disseminação do câncer. Adaptado de Cannistraci *et al.*, 2014.

As terapias padrão atualmente disponíveis para pacientes com câncer de próstata localizado limitam-se à prostatectomia radical (remoção cirúrgica da próstata) ou radioterapia, podendo ser curativas. Para pacientes com CaP localmente avançado utiliza-se radioterapia ou cirurgia em combinação com terapia hormonal – privação/bloqueio androgênico (INCA, 2016). Dos pacientes com diagnóstico de CaP, cerca de 40% desenvolvem doença metastática (Omlin & de Bono, 2012). Para estes pacientes com CaP metastático ou para aqueles com recidiva da doença, a terapia de privação de androgênio em geral é eficaz inicialmente, mas a resistência desenvolve-se na maioria dos casos, levando à doença sintomática e à morte. O padrão atual de tratamento para CaP metastático resistente à castração (CRPC, quando o paciente desenvolve resistência ao tratamento hormonal) é a quimioterapia baseada em docetaxel, que apresenta cerca de 19 meses de sobrevida ao paciente, mas está associada a efeitos adversos significativos e não é curativa. Assim, existe grande necessidade de abordagens terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas para estes pacientes, bem como necessidade de melhorias nos métodos diagnósticos para que a doença seja diagnosticada mais precocemente, quando a chance de cura é maior (Higano *et al.*, 2010).

Hiperplasia Prostática Benigna

A hiperplasia prostática benigna é uma anormalidade proliferativa do tecido epitelial e fibromuscular da zona de transição da área periuretral da próstata (McNeal, 1990). É um processo natural que ocorre nos homens e determina o crescimento progressivo da glândula prostática. Nesse processo, a hiperplasia do estroma prostático e das células epiteliais resulta na formação de nódulos relativamente nítidos – Figura 1 (Foster, 2000). É importante mencionar que a HPB não é considerada uma precursora do câncer de próstata (Packer & Maitland, 2016). Muito frequente entre os homens, sua prevalência é dependente da idade, com evidência histológica de HPB comum por volta dos 80 anos, quando aparentemente todos os homens apresentam alguma evidência histológica desse processo (Kesarwani & Mittal, 2010).

A etiopatogênese da HPB ainda não é bem esclarecida (McVary *et al.*, 2011). Os únicos fatores de risco claramente definidos são a idade e os hormônios androgênicos. Assim como em câncer de próstata, a incidência de HPB aumenta consideravelmente com a idade (Frydenberg & Lawrentschuk, 2012). Abaixo dos 40 anos, apenas cerca de 10% dos homens apresentam HPB (Tang & Yang, 2009); aos 50 anos, de 40 a 50%, e já aos 70 anos, cerca de 90% dos homens são afetados (Kirby, 2000; Roehrborn, 2005). Além disso, os fatores genéticos, étnicos e alimentares também podem influenciar no desenvolvimento da HPB. Homens com um ou mais parentes de primeiro grau afetados têm um risco maior de desenvolver esta condição, bem como aqueles com histórico familiar de próstatas mais volumosas ou de indivíduos mais jovens acometidos. A incidência de HPB é maior em negros que em caucasianos, assim como seu desenvolvimento é mais precoce entre Afro-descendentes. A menor incidência é observada em asiáticos (Ekman, 2000; Frydenberg & Lawrentschuk, 2012).

A HPB ocorre em diferentes graus, de modo que em alguns homens o crescimento pode ser excessivo e levar à obstrução do fluxo de urina. Assim, a HPB vai manifestar-se clinicamente com sintomas referentes ao trato urinário, podendo ainda estar associada à disfunção sexual. Os sintomas urinários incluem mudança no ritmo miccional, dor ou dificuldade para urinar, esvaziamento incompleto da bexiga, jato fraco de urina, dentre outros. No entanto, estes sintomas podem ser ocasionados por

várias outras condições além da HPB, sendo o CaP uma delas, conforme previamente mencionado (Frydenberg & Lawrentschuk, 2012). Nem todos os homens irão apresentar sintomas. Estima-se que de 25% a 50% dos homens com HPB têm algum grau de sintomas urinários e estes podem recorrer a alguma forma de tratamento. Embora não represente risco de morte, a HPB pode ter um impacto bastante significativo na qualidade de vida do homem (Shabbir & Mumtaz, 2004; Tang & Yang, 2009).

O diagnóstico da HPB passa por uma série de avaliações, dentre elas a análise do escore internacional de sintomas prostáticos, exame do toque retal, dosagem do PSA sérico, ultrassonografia transretal e abdominal, e biópsia da próstata. Assim como no caso do CaP, o diagnóstico final da HPB é determinado apenas pela análise histopatológica (Frydenberg & Lawrentschuk, 2012). O tratamento frequentemente é medicamentoso (visando retrair a próstata ou relaxar a bexiga) ou cirúrgico, por prostatectomia aberta (enucleação da porção interna da próstata) ou ressecção transuretral da próstata (retirada de fragmentos prostáticos) (van Rij & Gilling, 2015).

Imunidade antitumoral *versus* escape tumoral

Alguns mecanismos imunológicos efetores são capazes de reconhecer e destruir células tumorais *in vitro* e *in vivo*, e mecanismos distintos podem ser eficazes em diferentes tipos de tumores. Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) são provavelmente os efetores antitumorais mais importantes da imunidade antitumoral *in vivo*, embora também estejam envolvidos nesse processo as células *Natural Killer* (NK) e os macrófagos (Abbas *et al.*, 2011). Nesse contexto, as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) também são extremamente importantes para o desenvolvimento da resposta celular, mediada por linfócitos T (Rhodes & Trowsdale, 1999).

O complexo MHC constitui-se de um conjunto de genes e a maioria destes genes codificam diversas moléculas de superfície celular, as moléculas do MHC, que podem atuar no reconhecimento e apresentação de antígenos (como os antígenos

tumorais) às células efectoras do sistema imune. O MHC desempenha importantes funções na regulação do sistema imunológico. Na espécie humana, esse complexo gênico denomina-se sistema HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) (Rhodes & Trowsdale, 1999). No entanto, mesmo que as células efectoras do sistema imune possam reconhecer antígenos tumorais (apresentados na superfície das células cancerosas por certas moléculas do MHC) como “estranhos” e mesmo que a imunovigilância possa limitar o crescimento de alguns tumores, algumas vezes o sistema imune não consegue impedir o desenvolvimento do câncer no organismo (Abbas *et al.*, 2011). Uma das explicações para tal fato é a de que muitas neoplasias, dentre elas o câncer de próstata, apresentam mecanismos de escape à imunovigilância e à resposta imune antitumoral do hospedeiro (Slovin, 2012; Klotz & Emberton, 2014).

Diferenças quanto aos padrões de expressão gênica entre células cancerosas e normais têm sido analisadas há muito tempo. Em meados dos anos 1970, pesquisadores já haviam observado a ocorrência de alterações na expressão de moléculas do MHC de classe I em tumores de camundongo e do homem. Porém, apenas em meados dos anos 1980 considerou-se que estas alterações poderiam representar um importante mecanismo de escape tumoral à resposta imune específica (Algarra *et al.*, 2000). Atualmente, alterações da expressão gênica relacionadas às moléculas HLA de classe I já foram constatadas em diversos tipos de cânceres (Garrido *et al.*, 1997; Algarra *et al.*, 2000).

Recentes avanços na área da imunogenética e biologia do câncer têm permitido uma melhor compreensão das interações entre o sistema imune e os tumores, impulsionando o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento do câncer. Muitas destas estratégias são destinadas a induzir (potencializar) uma atividade antitumoral eficaz no hospedeiro. Exemplo disso são as vacinas antitumorais que vem sendo desenvolvidas e testadas (Jacobs & Ullrich, 2012). A recente aprovação da vacina Sipuleucel-T (*Dendreon Corporation*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento do câncer de próstata representa um avanço significativo nessa área, bem como um estímulo para novos estudos (Agarwal *et al.*, 2012). Porém, estas imunoterapias ainda mostram-se insatisfatórias para a regressão completa do tumor. Vários estudos indicam que esses resultados decepcionantes podem ser explicados por

diversos fatores, incluindo a evasão tumoral do reconhecimento imunológico, a imunossupressão induzida pelo câncer e a indução ineficiente da imunidade adaptativa específica. Quanto a estes aspectos, há reconhecida necessidade de mais estudos pois para aumentar as chances de sucesso terapêutico, estes deverão ser solucionados (Buonaguro *et al.*, 2011). Assim, esclarecimentos quanto aos processos de imunomodulação e quanto às vias imunossupressoras induzidas pelo câncer podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes contra o câncer (Jacobs & Ullrich, 2012).

Antígeno Leucocitário Humano G

Diversas estratégias das células tumorais minimizam o reconhecimento por diferentes mecanismos efetores imunológicos. A alteração na expressão gênica do HLA de classe I, citada anteriormente, é um dos mecanismos mais frequentemente utilizados pelas células tumorais para seu escape do reconhecimento e destruição por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e células *Natural Killer* (Lampen & van Hall, 2011). Neste contexto de escape da resposta imune, o HLA-G tem chamado a atenção em diversos tipos de cânceres (Sheu & Shih, 2010).

O gene *HLA-G* localiza-se na região genômica do MHC, sobre o braço curto do cromossomo 6 humano (região 6p21.3), e é classificado como um HLA de classe I não clássico (Hunt *et al.*, 2005). Esta classificação como HLA não clássico se deu pelo fato deste gene diferir dos demais genes HLA de classe I quanto à diversidade genética, expressão, além de estrutura e funções da molécula codificada (Carosella *et al.*, 2008a). O *HLA-G* é pouco polimórfico (há apenas 51 alelos *versus* 3356 alelos *HLA-A*, 4179 *HLA-B* e 2902 *HLA-C*) (Robinson *et al.*, 2015), exibe um padrão de expressão proteica restrito no organismo e apresenta propriedades imunorregulatórias e imunossupressoras (Curigliano *et al.*, 2013). Este gene codifica a molécula HLA-G, inicialmente descrita na interface materno-fetal, em citotrofoblastos (Ellis *et al.*, 1986; Geraghty *et al.*, 1987; Kovats *et al.*, 1990). Através do processamento (*splicing*) alternativo do transcrito primário codificado pelo *HLA-G*, são geradas sete isoformas proteicas, sendo quatro associadas à membrana celular (HLA-G1 a -G4) e três

isoformas solúveis (HLA-G5 a -G7), conforme ilustra a Figura 2 (Moreau *et al.*, 2002; Carosella *et al.*, 2003).

A atividade da molécula HLA-G se dá por sua interação com receptores expressos em células imunológicas ou não imunológicas. Através de tais interações, a proteína HLA-G é capaz de inibir a função citolítica e induzir a apoptose de CTLs e células NK, de impedir a proliferação de células B, T CD4⁺ e CD8⁺, de direcionar as células T CD4⁺ para um perfil de imunossupressão e de tolerizar células dendríticas. O HLA-G também pode promover um perfil de citocinas Th2 e induzir a geração de células T reguladoras (Donadi *et al.*, 2011; Carosella *et al.*, 2015). Assim, devido às funções que exerce, o HLA-G é reconhecido como uma molécula tolerogênica (Carosella *et al.*, 2008b). A expressão proteica do HLA-G não é normalmente detectada em tecidos saudáveis. Nestas condições, sua expressão é restrita a poucos tipos teciduais, como placenta, timo, córnea, células hematopoiéticas e ilhotas pancreáticas. Porém, sua expressão já foi observada em várias situações patológicas, como câncer, infecções virais, doenças autoimunes e inflamatórias (Carosella *et al.*, 2015).

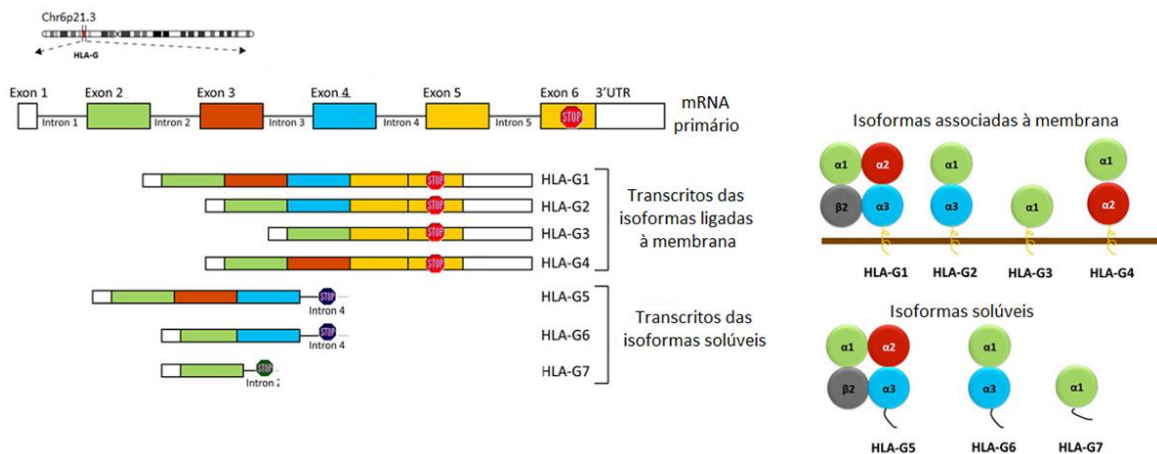


Figura 2. Transcrito primário (mRNA) e isoformas proteicas do *HLA-G*. O transcrito primário do *HLA-G* apresenta um códon de parada prematuro no éxon 6 (sinal vermelho de *stop*). Em função disso, a porção final do éxon 6 e o éxon 8 são sempre transcritos, mas nunca traduzidos, e esta é considerada a 3'UTR do gene. O éxon 7 é sempre excluído durante o processamento do mRNA. As isoformas HLA-G1 a -G4 são associadas à membrana celular (presença da porção transmembrana e da cauda citoplasmática). HLA-G5 a -G7 são isoformas solúveis. Adaptado de Donadi *et al.*, 2011.

Em 1998 foi descoberta a expressão aberrante do HLA-G em melanoma, o que desencadeou uma série de estudos quanto ao papel do *HLA-G* na imunobiologia do câncer (Paul *et al.*, 1998). A expressão gênica do *HLA-G* tanto em nível de RNA mensageiro (mRNA) como de proteína já foi observada em diversos tipos de tecidos neoplásicos (câncer renal, de pulmão, de mama, dentre outros) e correlacionada a parâmetros clínicos variados. A molécula HLA-G pode ser expressa na superfície celular, nos fluidos do corpo e em exossomos derivados de tumores (Yan, 2011). A expressão proteica do HLA-G é detectada preferencialmente nas lesões tumorais e raramente nos tecidos não tumorais adjacentes (Yie & Hu, 2011). Como a molécula HLA-G apresenta efeitos inibitórios sobre as células imunocompetentes e induz a geração de células imunossupressoras, pesquisadores baseiam-se na hipótese de que sua expressão é um mecanismo de escape tumoral que contribui para o desenvolvimento do câncer, uma vez que as células malignas conseguem escapar da imunovigilância e da resposta imune antitumoral do hospedeiro (Amiot *et al.*, 2011). Os resultados obtidos até o momento têm apoiado esta hipótese (Rebmann *et al.*, 2007; Rouas-Freiss *et al.*, 2014; Carosella *et al.*, 2015). Exemplo disso é que a proteína HLA-G é expressa nos tecidos de câncer primário e metastático, mas não nos tecidos saudáveis e de regressão do tumor de pacientes com melanoma (Paul *et al.*, 1999). Outro exemplo é o de que o glioma primário pode ser protegido da destruição por células T e NK alogênicas pela expressão de HLA-G1; e que HLA-G solúvel de pacientes com neuroblastoma pode inibir a lise celular mediada por CTLs e células NK (Wiendl *et al.*, 2002; Morandi *et al.*, 2007). Dentre os estudos realizados nesse sentido, o nível de expressão da molécula HLA-G em lesões malignas pode variar de 0% a 100% em diferentes tipos tumorais. Sua expressão é 0% (ou não detectada) em melanoma uveal e carcinoma de laringe, por exemplo, e 90,9% em casos de carcinoma epidermóide de esôfago (Yan, 2011).

O HLA-G tem apresentado relevância clínica em diversos tipos de cânceres. No carcinoma hepatocelular, a expressão proteica do HLA-G está fortemente correlacionada com estágios mais avançados da doença, é mais frequente entre os idosos (Lin *et al.*, 2010a) e está associada com menor sobrevida e/ou maior recorrência da doença (Wang *et al.*, 2011). Correlação semelhante foi relatada quanto a pacientes

com câncer gástrico, colorretal, câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) e câncer de células escamosas do esôfago, nos quais a expressão de HLA-G nas lesões malignas está fortemente correlacionada ao estágio da doença e mau prognóstico (Yan, 2011). Também já se observou que, entre pacientes com câncer de mama, aqueles cujas células malignas expressam HLA-G apresentam menor sobrevida livre da doença ou menor sobrevida do que aqueles cujas células malignas não expressam esta molécula (He *et al.*, 2010). Por outro lado, para alguns tipos de cânceres, como o renal e de bexiga, não foi possível estabelecer associação entre a expressão do HLA-G e parâmetros clínicos (Li *et al.*, 2009; Gan *et al.*, 2010).

As formas solúveis do HLA-G (sHLA-G) são bastante avaliadas em fluidos do corpo ou efusões malignas de pacientes com câncer (Sheu & Shih, 2010). Nestes pacientes, os níveis de sHLA-G no plasma apresentam-se frequentemente aumentados. Entre pacientes com câncer de pulmão de células não-pequenas, adenocarcinoma de pulmão, carcinoma de células escamosas e carcinoma indiferenciado, os níveis de sHLA-G são elevados apenas para NSCLC (Schütt *et al.*, 2010). Estes níveis elevados no plasma foram associados com estágio avançado da doença e menor sobrevida dos pacientes (Lin *et al.*, 2010b). Os níveis de sHLA-G também parecem úteis na distinção entre câncer colorretal e doenças colorretais benignas (Zhu *et al.*, 2011). Assim, a determinação dos níveis de sHLA-G no plasma tem se mostrado útil para diagnóstico, distinção entre indivíduos saudáveis, com tumores malignos ou benignos, e como marcador prognóstico.

Estudos apontam para um importante papel de estratégias de escape tumoral no câncer de próstata, incluindo a indução de citocinas imunossupressoras direcionadas para uma resposta do tipo Th2, imunossupressão e indução de morte de células T, presença de células T reguladoras em tumores da próstata (Miller & Pisa, 2007). Como a maioria dos pacientes com CaP é imunocompetente, acredita-se que a perda de capacidade do sistema imune do hospedeiro em combater o câncer represente um estado de tolerância imunológica (Rajarubendra *et al.*, 2011). Apesar das diversas evidências de que os tumores no CaP promovem tolerância imunológica desde o início da doença (Slovin, 2012) e dos inúmeros estudos sobre HLA-G em outros tipos de cânceres, pouco se sabe sobre a influência do HLA-G no CaP e nas condições

prostáticas de modo geral. Inicialmente, um trabalho realizado nesse sentido foi o de Langat e colaboradores (2006). Estes pesquisadores não estavam interessados no papel do HLA-G no câncer de próstata em si, mas numa possível influência desta molécula sobre a receptividade imunológica da mulher ao esperma do homem, no contexto da reprodução humana (Langat *et al.*, 2006). Através da análise de tecidos de próstata normal, com HPB e com CaP, a expressão do mRNA do *HLA-G* (-G1, -G2, -G5 e -G6) foi detectada em todos os tipos teciduais. Além disso, foi avaliada isoladamente a expressão das isoformas *HLA-G1*, *-G2/-G6* e *-G5*. Dentre estas, apenas a proteína solúvel HLA-G5 foi detectada nos tecidos de próstata. A expressão de HLA-G5 foi forte nos tecidos de próstata normal e nas secreções prostáticas presentes no lúmen glandular destes tecidos. Em HPB, a expressão de HLA-G5 foi reduzida em alguns casos e intensa em outros. Por fim, a expressão de HLA-G5 foi reduzida ou não detectável no CaP, embora detectável nas suas secreções prostáticas (Langat *et al.*, 2006). Posteriormente, Larsen e colaboradores (2011) realizaram um estudo da expressão de HLA-G em órgãos do sistema reprodutivo masculino (Larsen *et al.*, 2011) e relataram uma fraca expressão do HLA-G5/-G6 em tecidos com HPB (Larsen *et al.*, 2011). Até o momento, estes são os dados disponíveis sobre HLA-G em condições prostáticas (Langat *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2011; Hviid, 2015).

Conforme comentado até aqui, há muitos estudos demonstrando a expressão aberrante da proteína HLA-G em diversos tipos tumorais e sugerindo que tal expressão envolve um mecanismo de escape da imunovigilância. No entanto, os mecanismos que regulam tal expressão e o papel das variantes genéticas do *HLA-G* sobre a carcinogênese ainda são pouco estudados sendo pobremente compreendidos (Carosella *et al.*, 2015). Estudos mostram que as regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR) do gene *HLA-G* contém sequências envolvidas na regulação da expressão da molécula HLA-G tanto transcricionalmente, como pós-transcricionalmente (Castelli *et al.*, 2011).

Em particular, a 3'UTR do gene *HLA-G* é uma região polimórfica que tem despertado nosso interesse. Recentemente, oito polimorfismos frequentes nesta região foram avaliados e caracterizados em uma população Brasileira (Castelli *et al.*, 2010). Já se sabe que alguns deles influenciam o perfil de expressão do *HLA-G* (Castelli *et al.*, 2010; 2014a). Mais que isso, certas variantes da 3'UTR, onde há sítios de

ligação a microRNAs (miRNAs), parecem controlar a disponibilidade e estabilidade do mRNA, apontando para um possível controle da expressão gênica do *HLA-G* por miRNAs – Figura 3 (Castelli *et al.*, 2009; Porto *et al.*, 2015). Os miRNAs são pequenos RNAs não-codificantes envolvidos principalmente na regulação pós-transcricional da expressão gênica. Através da ligação aos mRNAs alvo, os miRNAs podem induzir a degradação destes mRNAs ou reprimir sua tradução (Bartel, 2009). O mRNA do *HLA-G* tem sido detectado em diversos tecidos do organismo, mas a expressão proteica é limitada a poucos tipos celulares, conforme já mencionado (Vianna *et al.*, 2007; Langat *et al.*, 2006). Assim, é provável que haja um fino controle sobre a expressão do *HLA-G* (Veit & Chies, 2009).

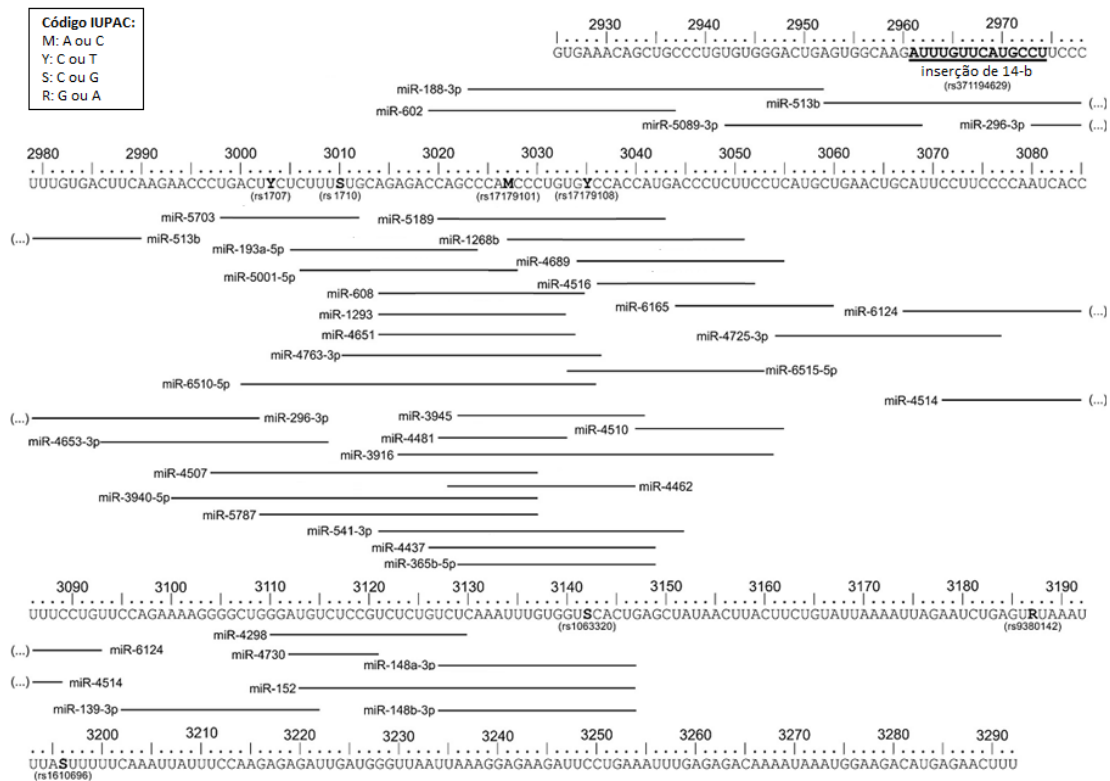


Figura 3. Principais sítios polimórficos na região 3'UTR do gene *HLA-G* e miRNAs que potencialmente podem se ligar a esta região (conforme a variante genética presente) e influenciar o perfil de expressão proteica do *HLA-G*. Adaptado de Porto *et al.*, 2015.

De fato, alguns trabalhos já estão demonstrando que a expressão do *HLA-G* pode ser controlada por miRNAs que se ligam à 3'UTR do mRNA, como o miR-148a e o miR-152, e análises *in silico* têm apontado para outros possíveis miRNAs envolvidos

nesse processo, incluindo o miR-4462, -4492, -193a-5p, -559, -6515-5p (Veit & Chies, 2009; Castelli *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010; Manaster *et al.*, 2012; Porto *et al.*, 2015). A expressão aberrante de miRNAs e de seus alvos gênicos tem sido observada em CaP e HPB, podendo alterar o crescimento celular, invasão e o potencial metastático de células malignas. Estas anormalidades de expressão têm sido consideradas como importantes biomarcadores para diagnóstico e prognóstico (Hassan *et al.*, 2012; Cannistraci *et al.*, 2014).

Até o momento, não há uma imunoterapia totalmente efetiva para os diferentes tipos de câncer, apesar do grande número de estudos nesta área. Não está claro se a falha na regressão tumoral completa ocorre devido aos mecanismos de escape tumoral ou ao desenvolvimento de imunoterapias inadequadas, ou à combinação destes dois elementos. Nesse sentido, a compreensão da resposta imune regulada pelo *HLA-G* pode ser relevante para a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer e no estabelecimento de bases para futuras abordagens terapêuticas (Sheu & Shih, 2010). Conforme mencionado anteriormente, tem sido possível correlacionar de forma significativa a progressão tumoral e o prognóstico de diversos tipos de tumores malignos com o ganho de expressão proteica do *HLA-G* (Yan, 2011). No entanto, quanto ao CaP, que representa uma das principais causas de morte entre homens no mundo (Agarwal *et al.*, 2012), ainda não se tem informação suficiente a este respeito. Além disso, a aparente incapacidade dos pacientes em desencadear uma resposta imune efetiva contra o CaP, ressalta a importância de um estudo sobre o *HLA-G* em CaP. O conhecimento quanto aos aspectos relacionados à expressão gênica do *HLA-G* e quanto à sua influência local e sistêmica em pacientes com tumores prostáticos, como CaP e HPB, além de contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que ajudem a ultrapassar a tolerância imunológica induzida pelo câncer, poderá contribuir futuramente para novos métodos de diagnóstico, prognóstico, monitoramento da doença, escolha do tratamento mais adequado e, conseqüentemente, para melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a influência do gene *HLA-G* no desenvolvimento do câncer de próstata e no quadro clínico da doença, buscando correlacionar parâmetros genéticos, moleculares, clínicos e imunológicos, comparando estes dados com os de pacientes com hiperplasia prostática benigna e indivíduos/amostras controle.

Objetivos Específicos

- Avaliar oito variantes polimórficas da região 3'UTR do gene *HLA-G* em indivíduos com CaP, HPB e em indivíduos controle, descrevendo as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas. As variantes incluem o polimorfismo de inserção/deleção de 14 pb na posição +2960 (rs66554220), assim como os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados nas regiões +3003C>T (rs1707), +3010C>G (rs1710), +3027A>C (rs17179101), +3035C>T (rs17179108), +3142C>G (rs1063320), +3187A>G (rs9380142) e +3196C>G (rs1610696) do *HLA-G*.
- Mensurar e avaliar os níveis de expressão da proteína HLA-G em amostras de tecidos da próstata derivadas de pacientes com CaP e HPB e no tecido saudável não-tumoral proveniente da próstata destes mesmos pacientes.
- Verificar o padrão qualitativo e quantitativo de citocinas Th1/Th2/Th17 no soro dos pacientes e indivíduos controle, investigando o perfil imunológico dos pacientes.
- Coletar os dados clínico-patológicos dos pacientes e relacioná-los com os dados laboratoriais obtidos.

Capítulo II

Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia - the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk

[Artigo completo publicado na revista *HLA* (antiga *Tissue Antigens*)]

Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia – the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk

F. M. B. Zambra¹, V. Biolchi², C. C. S. de Cerqueira³, I. S. Brum⁴, E. C. Castelli⁵ & J. A. B. Chies¹

1 Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

2 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário Univates, Lajeado, RS, Brazil

3 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Centro Nacional Patagónico, Puerto Madryn, Chubut, Argentina

4 Department of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

5 Department of Pathology, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP, Brazil

Key words

+3003 locus; 3' untranslated region; benign prostatic hyperplasia; haplotype; prostate cancer; untranslated region-4

Correspondence

José Artur Bogo Chies, PhD

Departamento de Genética

Instituto de Biociências

UFRGS

Caixa Postal 15053

CEP 91501-970

Porto Alegre, RS

Brazil

Tel: +55 51 3308 6740

Fax: +55 51 3308 7311

e-mail: jabchies@terra.com.br

Received 23 October 2015; revised 6

January 2016; accepted 13 January 2016

doi: 10.1111/tan.12741

Abstract

Human leukocyte antigen G (HLA-G) is an immunomodulatory molecule with important roles both physiologically as well as an escape mechanism of cancer cells. In this study, we evaluated the impact of eight polymorphisms at the 3' untranslated region (3'UTR) of the HLA-G gene in the development of prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH). A total of 468 DNA samples of Brazilian men predominantly Euro-descendant with PCa ($N = 187$), BPH ($N = 152$) and healthy control individuals ($N = 129$) were evaluated. The HLA-G 3'UTR region was amplified by polymerase chain reaction (PCR), sequenced and genotyped to identify the 14 bp insertion/deletion (rs371194629), +3003T/C (rs1707), +3010C/G (rs1710), +3027A/C (rs17179101), +3035C/T (rs17179108), +3142G/C (rs1063320), +3187A/G (rs9380142) and +3196C/G (rs1610696) polymorphisms. Regression logistic and chi-square tests were performed to verify the influence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in PCa and/or BPH susceptibility, as well as in PCa progression (clinicopathological status). Our data showed the UTR-4 haplotype as a risk factor to PCa in comparison with control [odds ratio (OR) 2.35, 95% confidence interval (CI) 1.39–3.96, $P_{\text{adjusted}} = 0.003$] and BPH groups (OR 1.82, 95% CI 1.15–2.86, $P_{\text{adjusted}} = 0.030$). Further, the 'non-14bp Ins_ + 3142G_ + 3187A' haplotype (OR 1.56, 95% CI 1.10–2.20, $P_{\text{adjusted}} = 0.036$), the +3003CT genotype (OR 4.44, 95% CI 1.33–4.50, $P_{\text{adjusted}} = 0.032$) and the +3003C allele (OR 2.33, 95% CI 1.38–3.92, $P_{\text{adjusted}} = 0.016$) also conferred susceptibility to PCa. Our data suggest an important influence of HLA-G 3'UTR polymorphisms in PCa susceptibility and support the use of the +3003 variant as a tag SNP for PCa risk.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most prevalent nonskin malignancy in western world men and is an important global health problem (1). Despite its vast prevalence, few risk factors are well established and recognized, which make the discrimination of individuals susceptible to the disease difficult. Predisposition to PCa is a multifactorial trait, and age, ethnic ancestry and family history are risk factors already well established, with the latter indicating an important genetic contribution to PCa risk (2). Studies have suggested an important role of tumor escape strategies in PCa, including the induction of immunosuppressive cytokines with a shift toward a Th2 type response, immunosuppression and induction of T-cell death, and presence of

regulatory T-cells inside prostate tumors [reviewed by (3)]. As most PCa patients are immunocompetent, it was suggested that the loss of capacity of the host immune system to combat the cancer could represent a state of immunological tolerance (4).

The human leukocyte antigen G (HLA-G) is an immunomodulatory molecule related to several mechanisms of tolerance. Since the discovery of the HLA-G protein expression in cancer (5), several pieces of evidence have supported a considerable role of HLA-G in the escape of tumor cells from immunosurveillance and antitumor immune response (6). In healthy conditions, the expression of HLA-G is limited to a few cell types. However, a significant expression occurs in some pathological situations, such as cancer, with distinct expression levels

according to the affected tissue (7). The HLA-G proteins can inhibit cytotoxicity of T and natural killer cells, induce T-cell apoptosis, induce Th2-type cytokines and unresponsiveness of immunocompetent cells against tumor antigens, contributing to cancer development by allowing the tumor cells to escape immune system-mediated destruction [reviewed by (8)].

Little is known about the influence of HLA-G in PCa development, although there is important evidence that these tumors promote immune tolerance early in the disease (9). So far, the expression of HLA-G full-length mRNAs (associated with the full-length membrane bound HLA-G molecule) and a short soluble isoform named HLA-G5 (produced by alternative splicing) was observed in cancer tissues and prostate secretions (10). Nevertheless, the mechanisms that regulate HLA-G gene expression and the role of HLA-G genetic variants on carcinogenesis are still little studied and poorly understood [reviewed by (11)]. The 3' untranslated region (3'UTR) of the HLA-G gene is a regulatory and polymorphic region, which encompasses genetic variants that may influence in the expression profile of this gene through post-transcriptional control mechanisms (12, 13). Among these variants, we should highlight the 14 bp insertion/deletion (Ins/Del) polymorphism at position +2960, the +3142G/C and +3187A/G SNPs, whose alleles 14 bp insertion (14–19), +3142G (20–23) and +3187A (24) were previously associated to low mRNA availability and low HLA-G production. In addition, five other HLA-G 3'UTR variable sites, not associated with differential HLA-G expression so far, lay inside potential binding sites to several microRNAs and, in consequence, may alter the levels of HLA-G production (21, 25). The variation sites positions refer to the adenine of the first translated ATG as nucleotide +1 and do consider the presence of the 14-bp fragment in the 3'UTR segment (8, 13).

The aim of this study is to evaluate the possible influence of HLA-G variable sites and 3'UTR haplotypes in the development of PCa and benign prostatic hyperplasia (BPH) in 468 Brazilian men from Porto Alegre (capital of the southernmost state of Brazil).

Materials and methods

Study population

In this case–control study, DNA samples were obtained from 468 individuals (187 PCa and 152 BPH patients and 129 healthy control subjects) diagnosed at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), located in South Brazil, between 2004 and 2009. The ethnicity [according to the classification system of the national agency for geography and statistics, *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística* – IBGE (26), that corresponds to White, Brown, Black and other] was self-categorized by the individuals when data was collected. The ethnic distribution did not differ significantly between control, BPH and PCa groups ($P_{\text{global}} = 0.072$), and included predominantly

White/Euro-descendant individuals (Table 1). Inclusion criteria for PCa, BPH and controls were previously described by Zambra *et al.* (27). Factors such as ethnic origin, age, Gleason score, tumor stage and total serum prostate-specific antigen (PSA) levels at diagnosis were recorded. The study was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from all subjects.

Genotyping

The amplification of 3'UTR of the HLA-G gene was performed by PCR. In a previous study of our research group (28), it was not possible genotyping, after sequencing, the SNP at position +3196C/G (one end of the sequence). To analyze this SNP, the method described by Castelli *et al.* (12) was adapted using a distinct reverse primer to extend the amplified fragment. The genomic DNA (10–100 ng) of each individual was prepared in a final volume of 25 μL containing 10 pmol of each primer – HLA-G8F-5' TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT 3' (12) and GMIRNAR-5' CTGGTGGGA-CAAGTTCTACTG 3' (29), 0.2 mM of each dNTP, 2.0 mM of MgCl_2 , PCR buffer 1X and 1.0 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, Brazil). Samples were submitted to 94°C for 5 min followed by 32 cycles of 94°C for 30 s, 65.5°C for 30 s and 72°C for 1 min, and by a final extension step at 72°C for 5 min. The amplified PCR products resulting in a 537-bp fragment when the 14 bp insertion allele was present (or 523 bp to 14 bp deletion allele), which were visualized under UV irradiation in a 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. PCR products were directly sequenced using the reverse primer GMIRNAR (to avoid the overlaps of sequence in 14 bp heterozygous samples) in an ABI 3730 XL DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's manual. All the variable sites detected were individually annotated.

Statistical analysis

The analysis of differences between means in the continuous variables was performed by ANOVA one-way test. The median differences of serum PSA and prostate volume values between groups were verified by the Kruskal–Wallis non-parametric test, following by Dunn's test. Allelic and genotypic frequencies were computed by direct counting method. The Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) for genotypic data was tested for each locus through ARLEQUIN software version 3.0 (30), that uses a modified version of Markov chain random walk algorithm (31). Pairwise linkage disequilibrium (LD) was tested for SNPs for each group using the MLOCUS program (32, 33). Given the LD between alleles from analyzed polymorphisms, but unknown gametic phase, the softwares PHASE version 2.1 (34, 35) and MLOCUS (32, 33) were used to estimate the most likely haplotypes pair for each sample and the haplotypic frequencies, and the results were compared.

Table 1 Characteristics of the sample assessed in the HLA-G 3'UTR study

	Control (N = 129)	BPH (N = 152)	PCa (N = 187)
Ethnicity (euro-descendant) ^{a, b}	102 (84.5%)	129 (90.2%)	150 (82.0%)
Age (years) ^b			
Mean ± SD	57.56 ± 7.76	62.59 ± 8.92	63.55 ± 6.81
Range	41–75	40–80	46–76
PSA (ng/mL) ^{b, c}	0.80 (0.57–1.14)	2.05 (0.77–4.57)	7.37 (5.41–11.10)
Prostate volume (cm ³) ^{b, c}	20.05 (18.20–25.00)	34.20 (30.00–49.00)	35.00 (29.00–43.00)
Tumor stage ^{a, d}			
(T1 + T2)			71 (57.7%)
(T3 + T4)			52 (42.3%)
Gleason score ^a			
4 (2 + 2)			1 (0.6%)
5 (3 + 2)			1 (0.6%)
6 (3 + 3)			89 (52.7%)
7 (3 + 4)			32 (18.9%)
7 (4 + 3)			26 (15.4%)
8 (3 + 5)			1 (0.6%)
8 (4 + 4)			10 (5.9%)
9 (4 + 5)			7 (4.1%)
9 (5 + 4)			2 (1.2%)

BPH, benign prostatic hyperplasia; PCa, prostate cancer; PSA, prostate-specific antigen; SD, standard deviation; UTR, untranslated region.

^aNumber of cases and percentages.

^b*P*-value – ethnicity – PCa vs BPH vs control: *P*_{global} = 0.072. Age – BPH or PCa vs control: *P* < 0.001; PCa vs BPH: *P* = 0.504. PSA – BPH or PCa vs control, and PCa vs BPH: *P* < 0.001. Prostate volume – BPH or PCa vs control: *P* < 0.001; PCa vs BPH: *P* = 0.468.

^cMedians and 25/75 percentiles (median was used because of non-Gaussian distribution).

^dThere was no information available on pathologic tumor stage for 64 (34.2%) patients and on grade stage for 18 (9.6%) patients. Five (2.7%) patients were submitted to radiotherapy.

For association analysis, the PCa individuals were classified in two subgroups based on biopsy Gleason score, ≤6(3 + 3) and ≥7(3 + 4), as representative of less and more aggressive disease, respectively. Based on tumor stage, the PCa patients were also dicotomically divided, as having evidence of localized PCa (T1 and T2 stages) or extraprostatic/advanced disease (T3 and T4 stages). Logistic regression models (age-adjusted) or chi-square tests were used to verify association of haplotypes, genotypes and alleles of HLA-G 3'UTR polymorphisms with risk of PCa or BPH, as well as PCa progression risk (through Gleason score and tumor stage subgroups). Bonferroni correction for multiple comparisons was applied multiplying the *P*-value resulting from all association analyses by the number of comparisons of each test, so resulting in the *P*_{adjusted} of Bonferroni that have to be less than 0.05 to reach statistical significance. The significance level was set at α = 0.05 (two-tailed) for all our tests. Statistical analyses were performed using the software SPSS version 18.0 for windows (SPSS, Inc., Chicago, IL) and winPEPI (36).

Results

Sample

In this case–control study, 468 samples divided into three groups were analyzed: control (*N* = 129 individuals), BPH (*N* = 152) and PCa (*N* = 187). The characteristics of the

studied population are presented in Table 1. Ethnicity information was evaluated by self-assessment of skin color, as aforementioned. A similar ethnic distribution was observed between the studied groups (*P*_{global} = 0.072), which were composed by participants predominantly White/Euro-descendants (84.5% control, 90.2% BPH and 82.0% PCa). The average age of the control group was lower than the other groups (both *P* < 0.001), but did not differ between BPH and PCa groups. The median of serum PSA levels were significantly different between groups (all *P* < 0.001). The prostate volume median was lower in the control group (20.0 cm³) in comparison with BPH (34.2 cm³) and PCa groups (35.0 cm³), both *P* < 0.001. Between BPH and PCa groups, there was no significant difference in this characteristic (*P* = 0.468). Among the PCa patients, the biopsy Gleason score was ≤6(3 + 3) in 91 (53.8%) individuals, and ≥7(3 + 4) in 78 (46.2%) individuals. About tumor stage, 71 (57.7%) PCa patients had organ-confined disease (T1 or T2) at the time of surgery, while 52 (42.3%) men had extraprostatic tumor (T3 or T4) – Table 1.

In the present series, we detected eight variable sites at the HLA-G 3'UTR segment, that includes the presence or absence of a 14b segment (14 bp Ins/Del, rs371194629) and single nucleotide variations at positions +3003 T/C (rs1707), +3010C/G (rs1710), +3027A/C (rs17179101), +3035C/T (rs17179108), +3142G/C (rs1063320), +3187A/G (rs9380142) and +3196C/G (rs1610696). These variables sites

Table 2 Distribution of the HLA-G 3'UTR haplotypes among cases and control groups

Haplotype name	Polymorphisms at HLA-G 3'UTR haplotypes								Haplotypic frequencies		
	14 bp	+3003	+3010	+3027	+3035	+3142	+3187	+3196	Control: N ^a (%)	BPH: N ^a (%)	PCa: N ^a (%)
UTR-1	Del	T	G	C	C	C	G	C	69 (26.7)	93 (30.6)	104 (28.0)
UTR-2	Ins	T	C	C	C	G	A	G	78 (30.2)	85 (27.9)	86 (23.1)
UTR-3	Del	T	C	C	C	G	A	C	42 (16.3)	45 (14.8)	55 (14.8)
UTR-4	Del	C	G	C	C	C	A	C	23 (8.9)	33 (10.9)	69 (18.5)
UTR-5	Ins	T	C	C	T	G	A	C	20 (7.8)	24 (7.9)	17 (4.6)
UTR-6	Del	T	G	C	C	C	A	C	14 (5.4)	13 (4.3)	25 (6.7)
UTR-7	Ins	T	C	A	T	G	A	C	12 (4.7)	11 (3.6)	16 (4.3)

BPH, benign prostatic hyperplasia; PCa, prostate cancer; UTR, untranslated region.

^a $N_{\text{control}} = 129$, $N_{\text{BPH}} = 152$, $N_{\text{PCa}} = 186$ individuals.

were already described for the HLA-G 3'UTR segment (12). In addition, all the variable sites detected did present frequencies higher than 1% for the minor allele and they can be considered true polymorphisms considering the population from Porto Alegre (Brazil).

The distribution of allelic and genotypic frequencies of the eight polymorphisms of 3'UTR of HLA-G gene among control, BPH and PCa groups is shown in Table S1, *Supporting Information*. The heterozygosity observed did not differ from the expected one for all genotypes in all sample group, indicating that genotypic distribution of each polymorphism did fit HWE expectations (data not shown). LD was detected between most pairs of polymorphic sites in control, BPH and PCa groups ($P < 0.05$) – Tables S2–S4. A perfect LD ($D' = 1$; $r^2 = 1$) was observed between the SNP +3010C/G and +3142G/C ($P < 0.001$) in control and BPH groups, and also between 14 bp Ins/Del and +3027A/C ($P < 0.001$) in PCa group (data not shown). LD was not observed among the SNP +3003 T/C and +3027A/C (in control and BPH groups) or +3035C/T (in control group), corroborating data for these polymorphic sites in others studies (12, 37, 38). Altogether, our results suggest a strong LD between HLA-G 3'UTR polymorphic sites.

In order to infer the haplotypes of each individual, 10 independent runs with different seed values were performed using the PHASE software (37). The results of all runs were concordant and these results were also in agreement with those obtained with the MLOCUS software. A total of seven HLA-G 3'UTR haplotypes were identified through these analyses, previously named as UTR-1 to UTR-7 (12). The PHASE method resulted in haplotypic inferences probabilities ranging from 0.991 to 1.0 for 467 out of the 468 subjects. The haplotypic inference for one PCa patient was poor (probability of 0.549 by PHASE), so because of uncertainty this sample was excluded from the haplotypic analyses. The inferred haplotypes were designated according to Castelli *et al.* (12) and its frequencies are presented in Table 2.

HLA-G 3'UTR polymorphisms in PCa and BPH

The association between the inferred haplotypes and the eight HLA-G 3'UTR genetic variants, including the 14 bp Ins/Del polymorphism and the SNPs +3003 T/C, +3010C/G, +3027A/C, +3035C/T, +3142G/C, +3187A/G and +3196C/G with PCa or BPH risk was assessed by logistic regression models. Age at diagnosis was included as a covariate in these analyses because it is a well-known risk factor to PCa and BPH, and also because of the age differences among control and cases.

A residuals analysis was performed to verify discrepancies regarding to haplotypes (without corrections for age or multiple comparisons) indicating a significantly higher frequency of the UTR-4 haplotype among PCa when compared with controls ($P = 0.001$) and BPH ($P = 0.006$). Moreover, a borderline P -value was observed for the UTR-2 haplotype ($P = 0.050$) comparing PCa and controls. Given that the residuals analysis indicated a possible influence of UTR-2 as a protective factor for PCa, and UTR-4 as a risk factor, we performed association tests between each one of these haplotypes *vs* all other haplotypes (Table 3). Hence, through the results of logistic regression (age-adjusted) for UTR-2, no statistically significant differences were observed among the groups. However, UTR-4 was confirmed as a risk factor for PCa in comparison with controls (OR 2.35, 95% CI 1.39–3.96, $P_{\text{adjusted}} = 0.003$) and BPH (OR 1.82, 95% CI 1.15–2.86, $P_{\text{adjusted}} = 0.030$).

To further explore the data from this study and considering that the 14 bp insertion, +3142G and +3187A alleles were previously associated with low HLA-G protein expression (15, 16, 19, 20, 24), as well as that the haplotypes composed by these alleles were associated with intermediary (UTR-2) and very low (UTR-5 and -7) soluble HLA-G levels (39), we grouped haplotypes encompassing all these three alleles (UTR-2, -5 and -7), now named as Ins_G_A and compared *vs* all other haplotypes (UTR-1, -3, -4 and -6) (see Table 3) regarding the subjects clinical conditions. The 'non-Ins_G_A' haplotypes were associated with risk to PCa development (OR 1.56, 95% CI 1.10–2.20, $P_{\text{adjusted}} = 0.036$) when PCa and control groups were compared (Table 3).

Table 3 Odds ratio analysis for PCa and BPH development according to haplotypes of HLA-G gene 3'UTR^a

Haplotypes	PCa Control					BPH Control					PCa BPH						
	%	%	OR	95% CI	<i>P</i> ^b	<i>P</i> ^c	%	%	OR	95% CI	<i>P</i> ^b	%	%	OR	95% CI	<i>P</i> ^b	<i>P</i> ^c
UTR-2	23.1	30.2	0.69	0.47–1.00	0.052	—	28.0	30.2	0.85	0.58–1.25	0.396	23.1	28.0	0.81	0.57–1.16	0.256	—
Others UTRs	76.9	69.8					72.0	69.8				76.9	72.0				
UTR-4	18.5	8.9	2.35	1.39–3.96	0.001	0.003	10.9	8.9	1.30	0.73–2.31	0.380	18.5	10.9	1.82	1.15–2.86	0.010	0.030
Others UTRs	81.5	91.1					89.1	91.1				81.5	89.1				
Non-Ins_G_A ^d	68.0	57.4	1.56	1.10–2.20	0.012	0.036	60.5	57.4	1.16	0.81–1.65	0.412	68.0	60.5	1.34	0.97–1.85	0.076	—
Ins_G_A ^d	32.0	42.6					39.5	42.6				32.0	39.5				

BPH, benign prostatic hyperplasia; PCa, prostate cancer; UTR, untranslated region.

^aSample size is $N_{\text{control}} = 129$, $N_{\text{BPH}} = 152$, $N_{\text{PCa}} = 186$ individuals.

^b*P*-values obtained by multinomial logistic regression between PCa or BPH vs control (reference category), and binary logistic regression between PCa vs BPH (reference category); age-adjusted; without Bonferroni correction.

^c*P*-values adjusted by Bonferroni correction (P_{adjusted}). All reported *P*-values in b and c are statistically significant when 0.05 or less.

^dIns_G_A haplotypes are composed by alleles (14bp ins, +3142G and +3187A) previously associated to low HLA-G expression levels. We compared Ins_G_A group (= UTR-2, -5, -7) vs all other haplotypes (the non-Ins_G_A group = UTR-1, -3, -4, -6).

Then, in order to investigate if a given polymorphic variant could explain the haplotypic association results, we assessed the independent effect of each SNP in logistic regression models age-adjusted. These tests comparing the genotypic frequencies of PCa and control groups suggested the 14 bp Del/Del (OR 2.55, 95% CI 1.23–5.30, $P = 0.012$), +3003CT (OR 4.44, 95% CI 1.33–4.50, $P = 0.004$), +3010GG (OR 2.36, 95% CI 1.18–4.70, $P = 0.015$), +3142CC (OR 2.28, 95% CI 1.15–4.54, $P = 0.018$), +3196CC (OR 3.21, 95% CI 1.27–8.11, $P = 0.014$) and +3196CG (OR 3.04, 95% CI 1.17–7.92, $P = 0.023$) as risk factors to PCa. However, after correction for multiple comparisons, only the +3003CT genotype remained significant ($P_{\text{adjusted}} = 0.032$). No differences were found in genotypic frequencies comparing PCa vs BPH and BPH vs control groups (Table 4).

The 14 bp Del, +3003C, +3010G and +3142C allelic frequencies were higher in the PCa group when compared with controls ($P = 0.017$, $P = 0.002$, $P = 0.012$, $P = 0.016$, respectively). However, after Bonferroni correction, only the +3003C allele remained as a risk factor to PCa (OR 2.33, 95% CI 1.38–3.92, $P_{\text{adjusted}} = 0.016$). Only the frequency of the +3003C allele was different comparing PCa vs BPH ($P = 0.011$), but the significance was lost after Bonferroni correction ($P_{\text{adjusted}} = 0.088$). No differences were observed in allelic frequencies between BPH and control groups (Table 5).

Polymorphisms of HLA-G 3'UTR in PCa progression

Haplotypic, genotypic and allelic frequencies of HLA-G 3'UTR polymorphisms into subgroups of PCa, classified according to clinicopathological status are presented in Tables S5 and S6. The association of these genetic variants with risk for progression to more aggressive or advanced stages of PCa (clinicopathological status) was evaluated by chi-square analysis or logistic regression models. No association was observed to haplotypes, genotypes and allelic variants with localized or advanced PCa (pathologic stages T1–T2 or

T3–T4, respectively). Also, considering the Gleason score of PCa patients [$\leq 6(3+3)$ and $\geq 7(3+4)$], no influence was found for less or more aggressive PCa clinicopathological status.

Discussion

HLA-G is an important molecule involved in the tumor cells escape from antitumor immune response through its immunomodulatory and tolerogenic functions. In this sense, its expression in cancer patients can be harmful (6). As the 3'UTR is a regulatory region encompassing genetic variants that influence HLA-G mRNA availability and stability as well as determine differential binding of specific microRNAs, it is very important to evaluate such variants in patients with prostate tumors (21, 25). In the Southern Brazilian population assessed in this study, strong LD between HLA-G 3'UTR polymorphic sites was observed, corroborating previous data (12, 37, 38). Seven haplotypes here identified (UTR-1 to -7) among the three studied groups (control, BPH and PCa) correspond to frequent haplotypes previously described to worldwide populations (12, 37, 40–42). The haplotypic frequencies of our control group were similar to those described for Brazilians healthy from Southeastern (SE) of Brazil (12, 37, 39, 42), and for some admixed and European populations (40). Further, the allelic and genotypic frequencies of the HLA-G 3'UTR polymorphic sites (14 bp Ins/Del, +3003 T/C, +3010C/G, +3027A/C, +3035C/T, +3142G/C, +3187A/G and +3196C/G) of the current control group were similar to those reported for a Brazilian healthy population (39, 43, 44).

Among the seven haplotypes identified in this study, UTR-4 was the only associated as a susceptibility factor to PCa, presenting a 2.35-fold risk to disease development (95% CI 1.39–3.96, $P_{\text{adjusted}} = 0.003$). The same association was observed in PCa vs BPH comparison (OR 1.82, 95% CI 1.15–2.86, $P_{\text{adjusted}} = 0.030$). The UTR-4 frequency increased from the control (8.9%), to BPH (10.9%), until PCa (18.5%),

Table 4 Odds ratio analysis for PCa and BPH development according to genotypes of polymorphisms of HLA-G gene 3'UTR^a

Genotypes	PCa					BPH					PCa					BPH				
	%	Control %	OR	95% CI	P ^b	P ^c	%	Control %	OR	95% CI	P ^b	P ^c	%	Control %	OR	95% CI	P ^b			
14 bp Ins/Del																				
InsIns	10.1	20.1	1.00				13.2	20.1	1.00				10.1	13.2	1.00					
InsDel	44.4	45.0	2.05	1.00–4.20	0.050	—	52.6	45.0	1.96	0.95–4.01	0.068	—	44.4	52.6	1.04	0.50–2.12	0.924			
DelDel	45.5	34.9	2.55	1.23–5.30	0.012	0.096	34.2	34.9	1.60	0.76–3.39	0.219	—	45.5	34.2	1.58	0.76–3.30	0.220			
+3003 T/C																				
TT	67.4	83.7	1.00				78.9	83.7	1.00				67.4	78.9	1.00					
CT	28.3	14.7	4.44	1.33–4.50	0.004	0.032	20.4	14.7	1.55	0.81–2.97	0.185	—	28.3	20.4	1.58	0.94–2.65	0.085			
CC	4.3	1.6	3.29	0.65–16.8	0.152	—	0.7	1.6	0.46	0.40–5.31	0.536	—	4.3	0.7	7.06	0.87–57.4	0.068			
+3010C/G																				
CC	20.9	35.2	1.00				27.8	35.2	1.00				20.9	27.8	1.00					
CG	51.9	47.7	1.73	0.99–3.05	0.056	—	53.0	47.7	1.53	0.86–2.72	0.144	—	51.9	53.0	1.11	0.65–1.92	0.699			
GG	27.3	17.2	2.36	1.18–4.70	0.015	0.120	19.2	17.2	1.44	0.70–3.00	0.325	—	27.3	19.2	1.62	0.85–3.11	0.144			
+3027A/C																				
CC	91.5	90.7	1.00				92.8	90.7	1.00				91.5	92.8	1.00					
AC	8.0	9.3	1.00	0.43–2.29	0.992	—	7.2	9.3	0.91	0.38–2.19	0.832	—	8.0	7.2	1.08	0.48–2.44	0.850			
AA	0.5	0.0	—	—	—	—	0.0	0.0	—	—	—	—	0.5	0.0	—	—	—			
+3035C/T																				
TT	1.1	0.8	1.00				0.7	0.8	1.00				1.1	0.7	1.00					
CT	16.0	23.2	1.00	0.08–11.8	0.999	—	21.7	23.2	1.99	0.12–33.8	0.634	—	16.0	21.7	0.50	0.43–5.80	0.578			
CC	82.9	76.0	1.39	0.12–15.7	0.790	—	77.6	76.0	1.90	0.12–31.2	0.652	—	82.9	77.6	0.73	0.07–8.12	0.795			
+3142G/C																				
GG	21.4	34.9	1.00				27.6	34.9	1.00				21.4	27.6	1.00					
CG	51.3	48.1	1.62	0.93–2.84	0.089	—	53.3	48.1	1.51	0.85–2.67	0.156	—	51.3	53.3	1.06	0.62–1.82	0.839			
CC	27.3	17.1	2.28	1.15–4.54	0.018	0.144	19.1	17.1	1.44	0.69–2.98	0.331	—	27.3	19.1	1.58	0.83–3.02	0.167			
+3187A/G																				
GG	7.0	7.8	1.00				9.9	7.8	1.00				7.0	9.9	1.00					
AG	41.7	38.0	1.53	0.60–3.91	0.373	—	41.4	38.0	1.12	0.45–2.82	0.810	—	41.7	41.4	1.37	0.60–3.14	0.458			
AA	51.3	54.3	1.28	0.51–3.20	0.599	—	48.7	54.3	0.81	0.33–2.00	0.645	—	51.3	48.7	1.59	0.70–3.61	0.268			
+3196C/G																				
GG	4.8	12.4	1.00				5.9	12.4	1.00				4.8	5.9	1.00					
CG	36.9	35.7	3.04	1.17–7.92	0.023	0.184	44.1	35.7	3.52	1.28–9.64	0.015	0.120	36.9	44.1	0.86	0.30–2.46	0.783			
CC	58.3	51.9	3.21	1.27–8.11	0.014	0.112	50.0	51.9	2.72	1.01–7.31	0.047	0.376	58.3	50.0	1.18	0.42–3.31	0.757			

BPH, benign prostatic hyperplasia; PCa, prostate cancer; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

^aSample size is $N_{\text{control}} = 129$, $N_{\text{BPH}} = 152$, $N_{\text{PCa}} = 186$ individuals. The analysis of +3027AA was not possible due to the low frequencies of this genotype.

^bP-values obtained by multinomial logistic regression between PCa or BPH vs control (reference category), and binary logistic regression between PCa vs BPH (reference category); age-adjusted; without Bonferroni correction.

^cP-values adjusted by Bonferroni correction (P_{adjusted}). All reported P-values in b and c are statistically significant when 0.05 or less.

with UTR-4 being more than twice more frequent in PCa individuals than in controls. High HLA-G expression was already observed in situations of cancer development and progression [reviewed by (6)]. The influence of the UTR-4 haplotype on HLA-G expression is controversial, because this haplotype was associated to intermediary production of soluble HLA-G (sHLA-G) in healthy Brazilian and French populations (39), while in a Malian population this association was not observed (45).

In order to investigate if a given polymorphic variant could explain the haplotypic association results, the independent effect of each SNP was assessed. Among all the evaluated SNPs, the +3003CT genotype was identified as a risk factor to PCa when compared with the control group, indicating a 4.44-fold risk to PCa development (95% CI 1.33–4.50, $P_{\text{adjusted}} = 0.032$). It is important to remember that UTR-4 is

the only haplotype bearing the +3003C allele. Moreover, a higher frequency of the +3003CC genotype was observed in PCa individuals (4.3%) when compared with controls (1.6%), although this difference did not reach statistical significance. Strengthening the importance of our results, the +3003C allele was a risk factor to PCa. A higher frequency of the +3003C allele was observed in PCa patients (18.4%) than in controls (8.9%), conferring a 2.33-fold risk to develop PCa (95% CI 1.38–3.92, $P_{\text{adjusted}} = 0.016$). So, these data corroborate our haplotypic findings redundantly, because the UTR-4 frequency seems a reflection of the +3003C frequency. The +3003 variable site lies at a segment that may be target by several microRNAs with potential to regulate HLA-G expression and, thus, it might strongly influence the strength of the binding depending on the allele at the +3003 position (21, 25). It is possible that the presence of the +3003C allele and other polymorphic

Table 5 Odds ratio analysis for PCa and BPH development according with alleles of polymorphisms of HLA-G gene 3'UTR^a

Alleles	PCa						BPH						PCa						BPH					
	%	Control %	OR	95% CI	<i>P</i> ^b	<i>P</i> ^c	%	Control %	OR	95% CI	<i>P</i> ^b	%	%	OR	95% CI	<i>P</i> ^b	<i>P</i> ^c							
14 bp Ins/Del																								
Ins	32.4	42.6	1.00				39.5	42.6	1.00			32.4	39.5	1.00										
Del	67.6	57.4	1.52	1.08–2.15	0.017	0.136	60.5	57.4	1.16	0.81–1.65	0.425	67.6	60.5	1.32	0.95–1.82	0.094	—							
+3003 T/C																								
T	81.6	91.1	1.00				89.1	91.1	1.00			81.6	89.1	1.00										
C	18.4	8.9	2.33	1.38–3.92	0.002	0.016	10.9	8.9	1.29	0.73–2.30	0.384	18.4	10.9	1.80	1.15–2.83	0.011	0.088							
+3010C/G																								
C	46.8	59.0	1.00				54.3	59.0	1.00			46.8	54.3	1.00										
G	53.2	41.0	1.54	1.10–2.16	0.012	0.096	45.7	41.0	1.23	0.86–1.74	0.258	53.2	45.7	1.25	0.92–1.71	0.156	—							
+3027A/C																								
C	95.5	95.3	1.00				96.4	95.3	1.00			95.5	96.4	1.00										
A	4.5	4.7	1.10	0.50–2.42	0.819	—	3.6	4.7	0.89	0.38–2.11	0.792	4.5	3.6	1.22	0.56–2.64	0.622	—							
+3035C/T																								
T	9.1	12.4	1.00				11.5	12.4	1.00			9.1	11.5	1.00										
C	90.9	87.6	1.33	0.78–2.27	0.296	—	88.5	87.6	1.01	0.59–1.72	0.974	90.9	88.5	1.32	0.80–2.18	0.282	—							
+3142G/C																								
G	47.1	58.9	1.00				54.3	58.9	1.00			47.1	54.3	1.00										
C	52.9	41.1	1.51	1.08–2.12	0.016	0.128	45.7	41.1	1.22	0.86–1.73	0.267	52.9	45.7	1.24	0.91–1.69	0.180	—							
+3187A/G																								
A	72.2	73.3	1.00				69.4	73.3	1.00			72.2	69.4	1.00										
G	27.8	26.7	1.01	0.70–1.47	0.950	—	30.6	26.7	1.23	0.83–1.80	0.301	27.8	30.6	0.83	0.59–1.16	0.264	—							
+3196C/G																								
G	23.3	30.2	1.00				28.0	30.2	1.00			23.3	28.0	1.00										
C	76.7	69.8	1.44	0.99–2.10	0.059	—	72.0	69.8	1.18	0.80–1.74	0.402	76.7	72.0	1.22	0.85–1.74	0.275	—							

BPH, benign prostatic hyperplasia; CI, confidence interval; OR, odds ratio; PCa, prostate cancer.

^aSample size is $N_{\text{control}} = 129$, $N_{\text{BPH}} = 152$, $N_{\text{PCa}} = 186$ individuals.

^b*P*-values obtained by multinomial logistic regression between PCa or BPH vs control (reference category), and binary logistic regression between PCa vs BPH (reference category); age-adjusted; without Bonferroni correction.

^c*P*-values adjusted by Bonferroni correction (P_{adjusted}). All reported *P*-values in b and c are statistically significant when 0.05 or less.

sites in LD with it decreases the HLA-G mRNA affinity or specificity to a group of microRNAs, such as miR-148a-3p, miR-148b-3p, miR-4462, miR-4492, miR-193a-5p, miR-559 and miR-6515-5p (25), increasing the HLA-G mRNA availability and its expression. Higher HLA-G expression would prone the patients to a less effective tumor immunosurveillance. Nevertheless, HLA-G and microRNA expression profiles in PCa patients need to be investigated, as well as the functional role of +3003 genetic variant in HLA-G expression. In addition, the +3003C SNP is in LD with HLA-G promoter and coding SNPs. For example, the +3003C allele is in LD with the allele -725G at the HLA-G promoter segment and the allele +99A at the HLA-G first intron (40). The allele -725G was previously associated with miscarriage and high HLA-G expression after interferon treatment (46). The influence of the +99A allele remains unknown. Taking all this data into account, the +3003 variant could be suggested as a tag SNP for PCa risk.

As previously stated, our results considering frequencies of the evaluated SNPs were quite similar to those obtained for other Brazilian healthy populations [from SE and Northeastern (NE) Brazil] (43, 44). The only exception, when comparing these two SE and NE population, was for the +3003 locus. The SE population presented almost twice the frequency of the

+3003C allele compared with the NE population (13.27% vs 6.69%), the same being true to the +3003CT genotypic frequency (26.53% vs 13.39%, $P = 0.020$) (43, 44). It is important to point out that these studies evaluated healthy individuals from both sex and no +3003CC individuals were observed. Interestingly, the estimates for PCa in Brazil by the National Institute for Cancer José Alencar Gomes da Silva (INCA) show that the PCa incidence in SE population is relatively higher than in NE, with 85 and 58 cases to 100 thousand men, respectively (47). Moreover, considering that the +3003C frequency reflects the UTR-4 frequency worldwide, we can expand our view beyond Brazil. So, in a previous study, it was observed a higher UTR-4 frequency among certain populations from Europe and Africa when compared with Asia (where this haplotype is relatively rare) (40). The PCa incidence once more coincides with the UTR-4 frequency: higher in Europe and Southern Africa in comparison with Asia (1). Thus, altogether, these data point out to the importance of more studies targeting the +3003 locus in PCa. It is necessary to investigate distinct human populations to elucidate if the associations observed in the present work are restricted to our studied group or can be observed in individuals from different ethnic/geographic origins.

The potential levels of HLA-G expression can be inferred from the haplotypes. Martelli-Palomino *et al.* (39) reported UTR-1 (the only haplotype with Del_C_G) as a higher expression haplotype; UTR-3, -4 and -6 with intermediate levels of expression, and UTR-5 and -7 (Ins_G_A) with lower sHLA-G expression. Controversially, UTR-2 (Ins_G_A) was associated with low and intermediated sHLA-G levels in different studies (39, 45). Considering haplotypes classified as low HLA-G expressers ('Ins_G_A', because of the simultaneous presence of the 14 bp Ins, +3142G and +3187A alleles) or intermediated/high HLA-G expressers ('non-Ins_G_A', all other possible configurations) it was possible to determine the 'non-Ins_G_A' haplotype as conferring risk to PCa (OR 1.56, 95% CI 1.10–2.20, $P_{\text{adjusted}} = 0.036$). An association of haplotypes potentially related to higher HLA-G expression and PCa makes sense in a context where tumor cells will be more able to escape immunosurveillance and antitumor immune response.

Benign tumors exhibit several characteristics of cancer, but like the majority of them, BPH do not progress to malignancy. It is quite important to identify the differences among cancer and benign tumors (48). Overall, in this study, no statistically significant differences were observed when comparing BPH with the other two studied groups, excepted for the UTR-4 haplotype, identified as a risk factor to PCa in comparison with BPH. Instead of normal health individuals, BPH samples are commonly used as controls in PCa studies. Nevertheless, comparisons between BPH and PCa should be taken carefully because this approach can mask interesting results.

In conclusion, frequencies of eight different 3'UTR polymorphisms of the HLA-G gene were analyzed in PCa and BPH. The UTR-4 haplotype, the +3003CT genotype and the +3003C allele were identified as risk factors for PCa, as well as the 'non-Ins_G_A' haplotype. Altogether, our data suggest an important influence of HLA-G in PCa susceptibility, encouraging more genetic and functional studies. Identification of genetic factors relevant to PCa can clarify some molecular mechanisms in cancer development and may be useful as new biomarkers and diagnosis tools as well as more effective therapeutic strategies in the future.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (no. 306349/2011-6 and 141916/2012-5, 135450/2009-8 and 473115/2011-5); Fundo do Incentivo à Pesquisa e Eventos/Hospital de Clínicas de Porto Alegre FIPE/HCPA (no. 14-0462); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul FAPERGS (no. 10/1516-6 and 12/2151-2). The authors thank all studied participants and all urologists that collaborate to this study and provided clinical data, especially Brasil Silva Neto and Milton Berger. The authors gratefully acknowledge Sidia M. Callegari-Jacques and Vania N. Hirakata

for their useful review of statistical analysis, and to Tiago D. Veit for the suggestions that enriched this article.

Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. CancerBase No. 11 [Internet]. International Agency for Research on Cancer; Lyon, France, 2013. Available at: <http://globocan.iarc.fr> (accessed on 01 February 2016).
2. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003; **361**: 859–64.
3. Miller AM, Pisa P. Tumor escape mechanisms in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2007; **56**: 81–7.
4. Rajarubendra N, Lawrentschuk N, Bolton DM, Klotz L, Davis ID. Prostate cancer immunology – an update for Urologists. *BJU Int* 2011; **107**: 1046–51.
5. Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I *et al.* HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 4510–5.
6. Amiot L, Ferrone S, Grosse-Wilde H, Seliger B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci* 2011; **68**: 417–31.
7. Carosella ED, Moreau P, LeMaout J, Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 2008; **29**: 125–32.
8. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci* 2011; **68**: 369–95.
9. Slovin S. Chemotherapy and immunotherapy combination in advanced prostate cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2012; **10**: 90–100.
10. Langat DK, Platt JS, Tawfik O, Fazleabas AT, Hunt JS. Differential expression of human leukocyte antigen-G (HLA-G) messenger RNAs and proteins in normal human prostate and prostatic adenocarcinoma. *J Reprod Immunol* 2006; **71**: 75–86.
11. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Roux DT, Moreau P, LeMaout J. HLA-G: an immune checkpoint molecule. *Adv Immunol* 2015; **127**: 33–144.
12. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NHS *et al.* The genetic structure of 3' untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immunol* 2010; **11**: 134–41.
13. Castelli EC, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Moreau P, Donadi EA. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. *J Immunol Res* 2014; **2014**: 734068.
14. Harrison GA, Humphrey KE, Jakobsen IB, Cooper DW. 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 2200.
15. Rebmann V, van der Ven K, Passler M, Pfeiffer K, Krebs D, Grosse-Wilde H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 2001; **57**: 15–21.

16. Hviid TVF, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 2003; **55**: 63–79.
17. Hviid TVF, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, Baricordi OR. HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 2004; **56**: 135–41.
18. Hviid TVF, Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum Immunol* 2006; **67**: 53–62.
19. Rizzo R, Bortolotti D, Ben Fredj N et al. Role of HLA-G 14 bp deletion/insertion and +3142C>G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum Immunol* 2012; **73**: 1140–6.
20. Tan Z, Randall G, Fan J et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 829–34.
21. Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A et al. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol* 2009; **70**: 1020–5.
22. Veit TD, Chies JAB. Tolerance versus immune response – MicroRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol* 2009; **20**: 229–31.
23. Nicodemus-Johnson J, Laxman B, Stern RK et al. Maternal asthma and microRNA regulation of soluble HLA-G in the airway. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**: 1496–503.
24. Yie SM, Li LH, Xiao R, Librach CL. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2008; **14**: 649–53.
25. Porto IOP, Mendes-Junior CT, Felício LP et al. MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: a new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. *Mol Immunol* 2015; **65**: 230–41.
26. Osorio RG. *O sistema classificatório de "cor ou raça" do IBGE. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2003, 50.*
27. Zambra FMB, Biolchi V, Brum IS, Chies JAB. CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Hum Immunol* 2013; **74**: 1003–8.
28. Graebin P, Veit TD, Alho CS, Dias FS, Chies JAB. Polymorphic variants in exon 8 at the 3' UTR of the HLA-G gene are associated with septic shock in critically ill patients. *Crit Care* 2012; **16**: R211.
29. Cordero EAA, Veit TD, da Silva MAL, Jacques SMC, Silla LMDR, Chies JAB. HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens* 2009; **74**: 308–13.
30. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005; **1**: 47–50.
31. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; **48**: 361–72.
32. Long JC, Williams RC, Urbanek M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 1995; **56**: 799–810.
33. Long JC. Multiple Locus Haplotype Analysis, version 3.0. Software and documentation distributed by the author. Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, 1999.
34. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 978–89.
35. Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003; **73**: 1162–9.
36. Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 2004; **1**: 6.
37. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Roger M, Moreau P, Donadi EA. A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol* 2011; **28**: 3069–86.
38. Lucena-Silva N, Teixeira MA, Ramos Ade L et al. The +3187A/G HLA-G polymorphic site is associated with polar forms and reactive reaction in leprosy. *Mol Genet Genomic Med* 2013; **1**: 123–30.
39. Martelli-Palomino G, Pancotto JA, Muniz YC et al. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential HLA-G soluble levels in the Brazilian and French population. *PLoS One* 2013; **8**: e71742.
40. Castelli EC, Ramalho J, Porto IOP et al. Insights into HLA-G genetics provided by worldwide haplotype diversity. *Front Immunol* 2014; **5**: 476.
41. Sabbagh A, Luisi P, Castelli EC et al. Worldwide genetic variation at the 3' untranslated region of the HLA-G gene: balancing selection influencing genetic diversity. *Genes Immun* 2014; **15**: 95–106.
42. Santos KE, Lima THA, Felício LP et al. Insights on the HLA-G evolutionary history provided by a nearby Alu insertion. *Mol Biol Evol* 2013; **30**: 2423–34.
43. Lucena-Silva N, Monteiro AR, de Albuquerque RS et al. Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene in individuals from two different geographical regions of Brazil. *Tissue Antigens* 2012; **79**: 272–8.
44. Lucena-Silva N, Barbosa de Souza VS, Gomes RG et al. HLA-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in 2 Brazilian populations. *J Rheumatol* 2013; **40**: 1104–13.
45. Carlini F, Traore K, Cherouat N et al. HLA-G UTR haplotype conservation in the Malian population: association with soluble HLA-G. *PLoS One* 2013; **8**: e82517.
46. Ober C, Billstrand C, Kuldaneck S, Tan Z. The miscarriage-associated HLA-G-725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. *Hum Reprod* 2006; **21**: 1743–8.
47. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimate/2014 – Cancer incidence in Brazil. Rio de Janeiro, INCA 2014: 124.
48. Marino-Enriquez A, Fletcher CDM. Shouldn't we care about the biology of benign tumours? *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 701–2.

Supporting Information

The following supporting information is available for this article:

Table S1. Allelic and genotypic distribution of HLA-G 3' untranslated region polymorphisms among cases and control groups.

Table S2. Linkage disequilibrium patterns for the pairs of polymorphic sites evaluated at the HLA-G 3' untranslated region in control group.

Table S3. Linkage disequilibrium patterns for the pairs of polymorphic sites evaluated at the HLA-G 3' untranslated region in BPH group.

Table S4. Linkage disequilibrium patterns for pairs of polymorphic sites evaluated at the HLA-G 3' untranslated region in prostate cancer group.

Table S5. Distribution of the HLA-G 3' untranslated region alleles and genotypes among Gleason score and tumor stage groups of prostate cancer.

Table S6. Distribution of the HLA-G 3' untranslated region haplotypes among Gleason score and tumor stage groups of prostate cancer.

Capítulo III

High HLA-G protein expression levels are a common feature in prostate cancer but not in benign prostatic hyperplasia

(Manuscrito em preparação)

High HLA-G protein expression levels are a common feature in prostate cancer but not in benign prostatic hyperplasia

Francis Maria Bão Zambra, MSc¹, Francine Hehn de Oliveira², Vanderlei Biolchi, PhD³, Ilma Simoni Brum, PhD⁴, José Artur Bogo Chies, PhD¹

¹Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Experimental Research Center, Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário Univates, Lajeado, RS, Brazil.

⁴Department of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence: PhD. José Artur Bogo Chies

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone: +55-51-3308-6740 / Fax: +55-51-3308-7311

e-mail: jabchies@terra.com.br

Short Title: HLA-G in prostate cancer and benign hyperplasia

Acknowledgments

Grant sponsors: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq; Fundo do Incentivo à Pesquisa e Eventos/Hospital de Clínicas de Porto Alegre FIPE/HCPA; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul FAPERGS. Grant numbers: CNPq 306349/2011-6, 141916/2012-5, 135450/2009-8 and 473115/2011-5; FIPE/HCPA 14-0462; FAPERGS 10/1516-6 and 12/2151-2.

ABSTRACT

BACKGROUND. Human leukocyte antigen G (HLA-G) is an immunoregulatory molecule that can promote immunological tolerance. Its expression is frequently observed in cancer tissues and it is recognized as an immune escape mechanism that can favour tumor development. In prostate cancer (PCa), the role of HLA-G has not yet been well defined, although there is evidence of a significant influence of *HLA-G* 3'UTR polymorphisms in PCa susceptibility. In the present study we investigated the HLA-G protein expression in tissue samples from Brazilian predominantly Euro-descendant patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia (BPH).

METHODS. A total of 53 tumor (33 PCa and 20 BPH) and areas evaluated as normal prostate tissues provenient from the same patients were evaluated. HLA-G protein expression was assessed by immunohistochemical staining, using the 4H84 monoclonal antibody. A semiquantitative system was used to determine the level of expression (absence or presence and low or high). The relationship between HLA-G expression and tissues groups or clinicopathological parameters was assessed by the Generalized Estimating Equation (GEE) models and Chi-square tests, as the case.

RESULTS. The cancerous, hyperplastic and normal prostate tissues presented distinct HLA-G expression levels ($P = 0.002$). All PCa tissues expressed HLA-G, and the great majority (30 out of 33) in high levels. In general, HLA-G was not expressed in BPH tissues (12 out of 20) and in normal prostate tissues (50 out of 53). When present in BPH, HLA-G was expressed in low level (8 out of 20).

No association was found between HLA-G expression and stage of PCa progression (Gleason score) or patients age.

CONCLUSIONS. This is the first study to extensively evaluate HLA-G expression in prostate cancer and the results point to a considerable role of HLA-G expression in PCa development. Thus, as a possible escape mechanism of prostate tumor cells from antitumor immunity, HLA-G represents a potential therapy target in PCa.

Key words: immunological escape, HLA-G expression, immunohistochemistry, prostate, tumor, 4H84

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the most common noncutaneous malignancy in men and the fourth most common cancer worldwide [1]. PCa is a multifocal and heterogeneous cancer, and it is possible to observe benign, premalignant, and malignant conditions in the same prostate [2]. PCa incidence is influenced by multiple genetic and demographic factors, such as genetic susceptibility, family history, ethnic origin, and age [3]. Another common, although nonmalignant condition that affects aged men is benign prostatic hyperplasia (BPH) [2]. In this disorder, the prostate undergoes abnormal enlargement due to a hyperproliferative process, although BPH is not considered a pre-prostate cancer state [4].

Several immunological factors are important to the maintenance of an equilibrium that will ultimately leads to tumor prevention [5]. The human leukocyte antigen G (HLA-G), for instance, is a nonclassical class Ib immunomodulatory molecule, involved in several aspects of immunological tolerance. Nevertheless, this same molecule can favour tumor development [6]. HLA-G is expressed both as membrane bound (HLA-G1 to -G4) and as soluble isoforms (-G5 to -G7), produced by alternative splicing of the primary *HLA-G* transcript [7]. These proteins can exert immunosuppressive functions through binding to inhibitory receptors on immune cells, including T and B lymphocytes, Natural Killer, dendritic cells or monocytes, blocking the activity of these effectors cells, as well as inducing the generation of regulatory cells [8]. Under healthy conditions, the HLA-G molecule is expressed only in a few adult organs and in the materno-foetal interface. On the other hand, tissues may be induced to express HLA-G in various pathologies, including cancers, multiple sclerosis,

inflammatory diseases and viral infections [9]. HLA-G is aberrantly expressed in several types of cancers, in distinct levels, according to the affected tissues. Such expression has been recognized as an escape mechanism, allowing tumour cells to bypass immunosurveillance and antitumor immune responses [10].

Several studies of HLA-G expression in solid tumors, in tissues and in biological fluids, such as plasma, have shown that HLA-G is a potential tool for diagnosis, for distinction between benign and malignant tumors, and prediction of clinical outcomes or prognosis [6,10-12]. In the context of PCa, BPH and other prostate conditions, little is known about HLA-G [13-15]. In a previous study, expression of *HLA-G* mRNA and protein was investigated in PCa, BPH and normal prostate tissues. *HLA-G1*, *-G2*, *-G5* and *-G6* mRNA expression was detected in prostate tissues, and amongst the respective proteins investigated, HLA-G1 and -G2/-G6 were not detected, but HLA-G5 was expressed in prostate tissues and in secretions at glandular lumen [13]. In another work, assessing BPH tissues, a weak expression of HLA-G5/-G6 was observed [14]. Finally, evidence of a significant influence of *HLA-G* 3'UTR polymorphisms in PCa susceptibility was found in an association study [16]. Thus, these studies indicate a possible role of HLA-G in tumoral prostate conditions.

The aim of the present study is to characterize HLA-G expression in prostate tissues from PCa and BPH patients, comparing cancerous, hyperplastic and non-tumor tissues. If HLA-G expression is employed by prostate tumor cells as an escape mechanism from antitumor immunity, it will be possible to suggest HLA-G as a potential therapy target in PCa.

MATERIALS AND METHODS

Patients and tissues samples

A total of 53 tumor and normal prostate tissues provenient from the same patients were evaluated. The samples were obtained from patients submitted to surgery for prostate cancer (radical prostatectomy or prostatovesiculectomy) or benign prostatic hyperplasia (transurethral resection or open prostatectomy) in the Urology Service at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), in South Brazil, between 2012 and 2015. Inclusion criteria for the sample were previously described by Zambra et al. [17]. Information such as total serum prostate-specific antigen (PSA) level, Gleason score, tumor stage, age, and ethnic origin at diagnosis were recorded. Ethnicity information was evaluated by self-assessment of skin color (as White, Brown, Black and other) when data was collected, according to the classification system of the national agency for geography and statistics, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE [18]. Firstly, haematoxylin/eosin (H/E) stained slides of the prostate tissues were retrieved from the Pathology Service archives (HCPA) and representative tumor areas (with cancer or hyperplasia), as well as non-tumor (control) areas were selected by an experienced pathologist. Then, formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) prostate tissues with selected areas of PCa (n = 33), BPH (n = 20) and the respective non-tumor area (n = 53) were provided by the same archives. The study was approved by the local Ethics Committee (#1404-62) and informed consent was obtained from all subjects.

Immunohistochemistry (IHC)

FFPE prostate tissues were cut into 4 μm sections, placed on organosilane-pretreated slides, de-paraffinized and antigen retrieval was performed in a water bath at 95°C for 1 h with citrate buffer (pH 6.0). Endogenous peroxidases were blocked with 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min. The slides were incubated in a humidified chamber at 4°C overnight with the HLA-G specific monoclonal antibody, 4H84 (BD Biosciences Pharmingen), at 1:400 dilution. The 4H84 mAb reacts with the denatured HLA-G heavy chain (amino acids 61 to 83 of HLA-G of human origin), recognizing all HLA-G isoforms with high specificity. After incubation, goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005, Santa Cruz,) detection system was added and the reaction visualization was obtained with Liquid Dab (Dako, K3468), according to the manufacturer's protocol. Hematoxylin was used as the nuclear counterstain and the slides were dehydrated with absolute alcohol, cleared in xylene and mounted. Negative control of HLA-G staining was obtained omitting the primary antibody. Cytotrophoblast from first-trimester human placenta tissue was used as positive control of HLA-G staining. The brownish-color was considered to be a positive expression of HLA-G in cells.

Evaluation of IHC Staining

A semiquantitative system was used to assess the HLA-G protein expression level. Immunohistochemical staining was classified according to the intensity and percentage of positively stained cells. The staining intensity was scored from 0 to 3 to reflect negative (0), weak (1), moderate (2), or strong (3) expression. The percentage of positively stained tumor cells was scored from 0

to 2 to reflect negative ($\leq 5\%$, 0), focal (5–50%, 1) or diffuse ($\geq 50\%$, 2) expression in the prostate tissues. For statistical analysis, the samples were categorized into two categories of expression based on the sum of the scores, as absent expression (total score = 0) or present (2–5); and also as low expression (2–3) or high (4–5). One field, chosen in the area previously defined through the analysis of the H/E stained slides, and magnified at 400x, was screened as a representative tissue area on each histological section.

Statistical analysis

The analysis of differences between means in the continuous variables was performed by T test. The median differences of serum PSA and prostate volume values were verified by the Wilcoxon-Mann-Whitney *U* non-parametric test. Differences among frequencies for categorical variables were calculated by chi-square test. As aforementioned, to analyze the HLA-G expression levels, we considered absence *versus* (*vs.*) presence of expression; and low *vs.* high expression in prostate tissues. The HLA-G expression difference between tissues groups (PCa, BPH and non-tumor) was assessed by the Generalized Estimating Equation (GEE) models followed by Bonferroni post hoc test. Comparisons of low and high HLA-G levels between the prostate tissues were not included in statistics due the small number of cases. The PCa individuals were classified into two subgroups based in Gleason score, $\leq 6(3+3)$ and $\geq 7(3+4)$, as representative of less and more aggressive disease, respectively. Fisher's exact test was performed to verify a possible association of HLA-G expression in PCa progression (through the Gleason score subgroups). A *P*-value < 0.05 (two-tailed) was considered statistically significant. Statistical

analyses were performed using the software SPSS version 20.0 for windows (SPSS, Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Sample

In this study, tissues with PCa (n = 33) and BPH (n = 20) and the respective normal prostate tissues (n = 53) from the same patients were evaluated. The characteristics of the studied population are presented in Table I. Ethnicity information was evaluated by self-assessment of skin color. A similar ethnic distribution was observed between the studied groups ($P = 0.390$), which were composed by participants predominantly Euro-descendants (84.8% PCa and 95.0% BPH). The average age and the median of serum PSA levels did not differ between the groups. There was no significant difference in the prostate volume median between PCa (38.60 cm³) and BPH groups (46.80 cm³, $P = 0.097$). Among the PCa patients, the biopsy Gleason score was $\leq 6(3+3)$ in 11 (33.3%) individuals, and $\geq 7(3+4)$ in 22 (66.7%) individuals. About tumor stage, 6 (18.2%) PCa patients had organ-confined disease (T1 or T2) at the time of surgery, while 1 (3.0%) man had extraprostatic tumor (T3 or T4). No information was available on tumor stage for 26 (78.8%) patients, so this clinicopathological characteristic was not included in analysis of PCa progression.

Distinct patterns of HLA-G expression in prostate tissues

In immunohistochemical staining, the HLA-G expression was visualized as a brown stain in prostate tissues (Fig. 1). The HLA-G protein was observed

in the cytoplasm of glandular epithelia in all tissues that presented some level of expression. Moreover, the immunoreactivity was located in the apical region of these specific cells, near to the cell nucleus (Fig. 1, arrow). Neither the cell membrane nor the fibromuscular stroma was stained.

The HLA-G expression in prostate according to the level of intensity and percentage of cells stained is presented in Table II. All 33 tissues with prostate cancer presented HLA-G. The expression was intense in 16 of them and moderate in 15. A weak staining was observed in 2 PCa tissues. The HLA-G expression was majoritarily diffuse, being observed in 32 out of 33 tissues. A focal expression was detected in only one case (see Table II). In a previous association study from our research group regarding *HLA-G* 3'UTR polymorphisms in PCa, it was provided evidence of a significant influence of the UTR-4 haplotype and +3003C (rs1707) genetic variant in PCa susceptibility [16]. The UTR-4 is the only haplotype bearing the +3003C allele, so one reflects the presence of the other. It was suggested that the +3003C allele could be related to high HLA-G expression, that would favour the PCa development [16]. Thus, in the present analysis of HLA-G protein expression, we specifically included a sample of one PCa patient genotyped as +3003CC homozygous to be investigated as a possible control of high HLA-G expression [16]. For this +3003CC PCa patient, the HLA-G expression was intense and diffuse in PCa tissue, and absent in the respective normal prostate tissue.

Absence of HLA-G expression was predominant in tissues with benign prostatic hyperplasia (12 out of 20). HLA-G was expressed in 8 BPH tissues, with weak intensity. Among them, the expression was focal in 7 specimens, and diffuse in only one (Table II). Finally, it was observed that 50 out of 53 normal

non-tumor prostate tissues did not present HLA-G. The protein was detected only in 3 specimens.

Considering the scores of intensity and percentage of cells stained (Table II), we compared the three groups of prostate tissues by the absence (total score = 0) or presence of expression (2 to 5), as well as having low (2 to 3) or high HLA-G expression (4 to 5) - Table III. The cancerous, hyperplastic and normal prostate tissues were statistically different regarding absence or presence of HLA-G, with this protein present in 33 out of 33, 8 out of 20 and 3 out of 53, respectively ($P = 0002$). A high HLA-G expression was observed in 30 out of 33 PCa, 0 out of 20 BPH, and 1 out of 53 normal prostate tissues. In addition, comparing parameters of HLA-G expression with patients age no significant correlation was detected (both $P > 0.05$) – Table III.

Based on the previous knowledge that HLA-G is expressed in extravillous trophoblastic cells [19-21], we used first-trimester human placenta tissue as a positive control of immunostaining in the IHC experiments. As expected, the HLA-G was highly expressed in the positive control (Fig. 1).

No influence of HLA-G expression in prostate cancer progression

The prostate cancer progression was evaluated by division of PCa patients into subgroups of Gleason score, $\leq 6(3+3)$ and $\geq 7(3+4)$. Both Gleason score subgroups had all PCa tissues with HLA-G expression, being not different among them regarding presence or absence of HLA-G ($P > 0.05$). Low or high HLA-G expression levels were also not associated with a less or more aggressive PCa ($P > 0.05$) – Table III.

DISCUSSION

The evasion of immune destruction was included recently, in 2011, as one of the hallmarks of cancer, and is one of the characteristics recognized in the prostate cancer case [22,23]. HLA-G is an immunomodulatory molecule with immunosuppressive functions and its expression by tumor cells configures an escape mechanism from immunosurveillance [9]. In the present study, we evaluated the expression of HLA-G protein in cancerous/hyperplastic and matched healthy prostate tissues from Brazilian men, predominantly Euro-descendants, with prostate cancer (n = 33) and benign prostatic hyperplasia (n = 20).

The protein expression was assessed by immunohistochemical staining, using a mAb that recognizes all HLA-G isoforms (4H84). In general, when present in prostate tissues (PCa, BPH and normal), the HLA-G was expressed only in the cytoplasm of the glandular epithelium. This very specific expression pattern (Fig. 1) was similar to those observed in prostate tissues in another study [13].

All prostate cancer tissues expressed HLA-G, 30 out of 33 in high levels. In another study, Langat et al. [13] investigated *HLA-G* mRNA and protein expression in PCa, BPH and normal prostate tissues. Using a PCR semi-quantitative analysis, they verified the presence of *HLA-G1*, *-G2*, *-G5* and *-G6* mRNA in all prostate tissues. After, using a set of antibodies particularly to assess HLA-G1, *-G2/-G6* or *-G5* protein expression, only HLA-G5 protein was detected in prostate tissues. In PCa, the HLA-G5 soluble isoform was mainly expressed in prostatic secretions at glandular lumen of tissues and it was almost absent in glandular epithelia [13]. It is important to highlight that the

study above cited was conducted in a relatively small sample set (each group, PCa, BPH or control being composed by a maximum of five samples). Considering several studies, it is possible to observe a variation in frequency of HLA-G expression among distinct cancers and even among studies assessing the same cancer [8]. The methodology is a possible explanation for variations [8,24].

The HLA-G expression profile can be influenced by polymorphisms present in the 3'UTR of the *HLA-G* gene, a regulatory region, through post-transcriptional control mechanisms [25,26]. One PCa patient here evaluated, but previously genotyped in a work from our research group as homozygous +3003CC (rs1707) [16], presented high HLA-G expression in PCa tissue, while in respective normal prostate tissue no expression was detected. In the mentioned previous study, the +3003C allele was associated as a risk factor to PCa. It was hypothesized that the +3003C allele could be associated with high HLA-G expression level, that would favour the PCa cancer development [16]. Thus, this result motivates the study of the influence of the +3003 genetic variant in HLA-G protein expression.

The majority of the samples concerning benign hyperplasia were devoided of HLA-G expression (12/20). Amongst the BPH tissues that expressed HLA-G (8/20), the expression was low (weak and primarily focal). Our study corroborates data from another two works [13,14], although in one of them, intense HLA-G5 expression was observed in some BPH samples [13]. In the study from Larsen et al. [14], seven BPH tissues were analyzed by immunohistochemistry using four mAb (two of them able to recognize all HLA-G isoforms, and two others that recognize both HLA-G5 and -G6 isoforms). It was

reported that only a rather weak expression was observed using a mAb for HLA-G5/-G6, while no HLA-G expression was detected using the three other mAbs [14]. Even using distinct antibodies in the three studies about BPH, the results were consistent in indicate absence or low expression of HLA-G in BPH tissues.

Here, the majority of normal non-tumor prostate tissues did not express HLA-G (50 out of 53). A previous work of Langat et al. [13] show the absence of HLA-G1, -G2 and G6 expression in normal prostate tissues, although also indicated a strong HLA-G5 expression [13]. It is important to point out that this work was performed with only five specimens and that HLA-G5 is a soluble form. HLA-G expression is often observed in cancer tissues, but rarely in the healthy surrounding tissues [6]. It is important to remember that a common finding in benign, hyperplastic and malignant prostate is a histological signature of chronic inflammation [27-29]. Prostate inflammation can be a consequence of urinary reflux, bacterial infections, hormonal and dietary factors, as well as specific immune responses [29], and an inflammatory microenvironment can induce HLA-G expression. The IL-10 cytokine, for example, represents an inflammatory stimulus capable to induce and upregulate HLA-G expression [10,30-32]. Thus, the distinct findings described at the literature, concerning HLA-G expression in normal prostate could be a consequence of the sample characteristics in each study.

The PCa, BPH and normal tissues were different regarding HLA-G expression, that occurred in 33/33, 8/20 and 3/53 tissues, respectively ($P = 0.002$). While all PCa tissues expressed HLA-G (in high levels in 30/33 of them), the majority of non-tumor (50/53) and BPH (12/20) tissues did not

express. High HLA-G expression was already observed in other situations of cancer development and progression and such expression would prone the patients to a less effective tumor immunosurveillance [9]. A possible strategie for development of more effective cancer therapies is the manipulation of the tumor microenvironment, blocking the immunosuppressive pathways or enhancing the antitumor activity [5]. Our study evaluated a significant number of prostate samples, but further molecular and functional studies with samples from distinct populations are necessary in order to investigate the potential use of this molecule in diagnostic and new therapeutic approaches for prostate cancer and benign hyperplasia.

CONCLUSIONS

Our data suggest that PCa, BPH and normal prostate tissues are different regarding HLA-G expression. Our study reveals high HLA-G expression in prostate cancer, providing evidence that PCa cells may avoid antitumor immunity by expressing HLA-G. In general, the normal and benign hyperplasia prostate tissues do not express HLA-G, but BPH also can present low expression level of this molecule.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all studied participants and urologists that collaborate to this study and provided clinical data, especially Brasil Silva Neto and Milton Berger. We gratefully acknowledge to Luciano S. P. Guimarães (Biostatistics Unit from GPPG/HCPA) for his collaboration in statistical analysis, as well as to

Flávia Giusti and Emily Pilar (Experimental Pathology laboratory from CPE/HCPA) for their technical assistance.

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on March 2016.
2. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 2010;24(18):1967-2000.
3. Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Berndt SI, Conti DV, Schumacher F, Han Y et al. A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat Genet* 2014;46(10):1103-1109.
4. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta* 2016;pii:S0167-4889(16)30041-6.
5. Chew V, Toh HC, Abastado JP. Immune microenvironment in tumor progression: characteristics and challenges for therapy. *J Oncol* 2012;2012:608406.
6. Rouas-Freiss N, Moreau P, LeMaoult J, Carosella ED. The dual role of HLA-G in cancer. *J Immunol Res* 2014;2014:359748.
7. Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: From maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol* 2003;81:199-252.

8. Curigliano G, Criscitiello C, Gelao L, Goldhirsch A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clin Cancer Res* 2013;19(20):5564-5571.
9. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Roux DT, Moreau P, LeMaout J. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol* 2015;127:33-144.
10. Amiot L, Ferrone S, Grosse-Wilde H, Seliger B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci* 2011;68(3):417–431.
11. Yie SM, Yang H, Ye SR, Li K, Dong DD, Lin XM. Expression of human leucocyte antigen G (HLA-G) is associated with prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007;58(2):267-274.
12. Carosella ED, Ploussard G, LeMaout J, Desgrandchamps F. A Systematic Review of Immunotherapy in Urologic Cancer: Evolving Roles for Targeting of CTLA-4, PD-1/PD-L1, and HLA-G. *Eur Urol* 2015;68(2):267-279.
13. Langat DK, Platt JS, Tawfi O, Fazleabas AT, Hunt JS. Differential expression of human leukocyte antigen-G (HLA-G) messenger RNAs and proteins in normal human prostate and prostatic adenocarcinoma. *J Reprod Immunol* 2006;71: 75–86.
14. Larsen MH, Bzorek M, Pass MB, Larsen LG, Nielsen MW, Svendsen SG, Lindhard A, Hviid TV. Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 2011;17(12):727-738.
15. Hviid TV. Human Leukocyte Antigen-G Within the Male Reproductive System: Implications for Reproduction. *Adv Exp Med Biol* 2015;868:171-190.

16. Zambra FM, Biolchi V, de Cerqueira CC, Brum IS, Castelli EC, Chies JA. Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia - the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk. *HLA* 2016;87(2):79-88.
17. Zambra FM, Biolchi V, Brum IS, Chies JA. CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Hum Immunol* 2013;74(8):1003-1008.
18. Osorio RG. O sistema classificatório de “cor ou raça” do IBGE. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2003, 50.
19. Le Bouteiller P, Solier C, Pröll J, Aguerre-Girr M, Fournel S, Lenfant F. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update* 1999;5(3):223-233.
20. Morales PJ, Pace JL, Platt JS, Phillips TA, Morgan K, Fazleabas AT, Hunt JS. Placental cell expression of HLA-G2 isoforms is limited to the invasive trophoblast phenotype. *J Immunol* 2003;171(11):6215-6224.
21. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J* 2005;19:681–693.
22. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–674.
23. Klotz L, Emberton M. Management of low risk prostate cancer-active surveillance and focal therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11(6):324-334.

24. Singer G, Rebmann V, Chen YC, Liu HT, Ali SZ, Reinsberg J, McMaster MT, Pfeiffer K, Chan DW, Wardelmann E, Grosse-Wilde H, Cheng CC, Kurman RJ, Shih leM. HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res* 2003;9(12):4460-4464.
25. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, de Albuquerque RS, Muniz YC, Simões RT, Carosella ED, Moreau P, Donadi EA. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun* 2010;11(2):134-141.
26. Castelli EC, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Moreau P, Donadi EA. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. *J Immunol Res* 2014;2014:734068.
27. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):256-269.
28. Alcaraz A, Hammerer P, Tubaro A, Schröder FH, Castro R. Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur Urol* 2009;55(4):864-873.
29. De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, Sciarra A, Tubaro A. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol* 2011;60(1):106-117.

30. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 1999;11(5):803-811.
31. Urosevic M, Dummer R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message. *Semin Cancer Biol* 2003;13(5):337-342.
32. Ongaro A, Stignani M, Pellati A, Melchiorri L, Massari L, Caruso G, Baricordi OR, Rizzo R. Human leukocyte antigen-G molecules are constitutively expressed by synovial fibroblasts and upmodulated in osteoarthritis. *Hum Immunol* 2010;71(4):342-350.

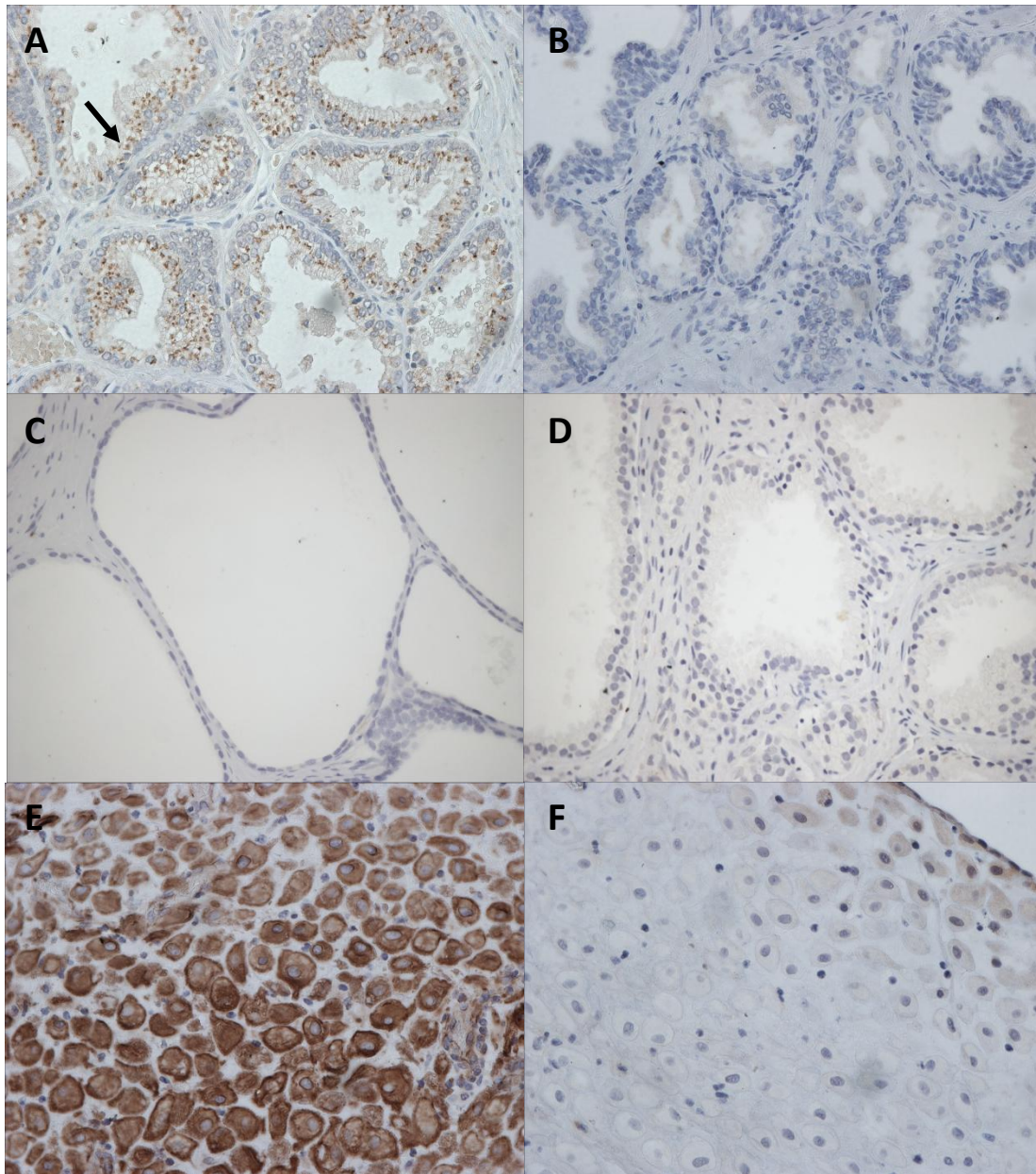


Figure 1. Immunohistochemical staining for HLA-G in prostate tissues with cancer and benign hyperplasia, and in normal prostate tissues. **A:** Intense and diffuse HLA-G staining in PCa tissue – sample from PCa patient +3003CC homozygous (rs1707). **B:** PCa tissue stained without the primary antibody – negative control. **C:** HLA-G staining negative in BPH tissue. **D:** HLA-G staining negative in normal prostate tissues. **E:** Intense and diffuse HLA-G staining in human placenta tissue from first pregnancy trimester – positive control of HLA-G staining. **F:** Human placenta tissue from 1st pregnancy trimester stained without primary antibody – negative control. HLA-G mAb 4H84 (1:400) is the primary antibody used to detect the HLA-G expression. 400x magnification for all sections.

Table I. Characteristics of the sample assessed in the study of HLA-G expression profile in patients with prostate cancer and benign hyperplasia.

	PCa (n = 33)	BPH (n = 20)	P-value^d
Ethnicity (euro-descendant)^a	28 (84.8%)	19 (95.0%)	0.390
Age (years)			
Mean ± SD	64.94 ± 5.97	66.75 ± 7.45	0.335
Range	54 - 74	53 - 80	
PSA (ng/mL)^b	6.61 (5.70 – 10.25)	5.05 (4.09 – 12.30)	0.330
Prostate volume (cm³)^b	38.60 (29.00 – 43.50)	46.80 (35.00 – 56.00)	0.097
Tumor stage^{a,c}			
(T1+T2)	6 (18.2%)		
(T3+T4)	1 (3.0%)		
Gleason score^a			
6 (3+3)	11 (33.3%)		
7 (3+4)	9 (27.3%)		
7 (4+3)	7 (21.2%)		
8 (4+4)	3 (9.1%)		
9 (4+5)	1 (3.0%)		
9 (5+4)	2 (6.1%)		

BPH, benign prostatic hyperplasia; n, number of cases, PCa, prostate cancer; PSA, Prostate-Specific Antigen; SD, standard deviation.

^a Number of cases and percentages.

^b Medians and 25/75 percentiles.

^c There was no information available on pathologic tumor stage for 26 (78.8%) patients.

^d P-values are statistically significant when 0.05 or less.

Table II. HLA-G expression in prostate tissues from PCa and BPH patients.

Scores for HLA-G expression	Prostate tissues		
	PCa (n = 33)	BPH (n = 20)	Normal non-tumor (n = 53)
Staining intensity			
0 = Negative	0	12	50
1 = Weak	2	8	2
2 = Moderate	15	0	1
3 = Intense	16	0	0
Percentage of cells stained			
0 = Negative ($\leq 5\%$)	0	12	50
1 = Focal (5 – 50%)	1	7	2
2 = Diffuse ($\geq 50\%$)	32	1	1

BPH, benign prostatic hyperplasia; n, number of cases, PCa, prostate cancer.

Table III. Patterns of HLA-G expression in prostate tissues and according to clinical parameters from PCa and BPH patients.

	HLA-G expression ^a			<i>P</i> -value ^d	HLA-G presence ^a	
	Absence	Presence	95% CI		Low	High
Tissues [n]^b						
PCa [33]	0	33 ^A	1.00 – 1.00	0.002	3	30
BPH [20]	12	8 ^B	0.19 – 0.61		8	0
Normal non-tumor [53]	50	3 ^C	0.00 – 0.12		2	1
PCa Gleason score [n]^c						
≤ 6 (3+3) [11]	0	11	-	-	1	10 ^A
≥ 7 (3+4) [22]	0	22			2	20 ^A
Age [n]^c						
≤ 65 years (mean age) [22]	5	17 ^A	0.27 – 3.72	1.000	3	14 ^A
> 65 [31]	7	24 ^A			8	16 ^A

BPH, benign prostatic hyperplasia; n, number of cases, CI, confidence interval; PCa, prostate cancer.

The different capital letters following the number of cases represent statistically significant difference ($P < 0.05$) between the proportions.

^a Categories based on the sum of scores of HLA-G intensity and percentage of stained cells, as absent expression (total score = 0) or present (2–5); and also as low expression (2–3) or high (4–5).

^b Generalized estimating equation test followed by Bonferroni post hoc test.

^c Chi-square test.

^d *P*-values are statistically significant when 0.05 or less.

Capítulo IV

***Cytokine profile in prostate cancer and benign
hyperplasia***

(Manuscrito em preparação)

Cytokine profile in prostate cancer and benign hyperplasia

Francis Maria Bão Zambra¹, Priscila Vianna¹, Vanderlei Biolchi², Ilma Simoni Brum³, José Artur Bogo Chies¹

¹Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário Univates, Lajeado, RS, Brazil.

³Department of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence: PhD. José Artur Bogo Chies

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone: +55-51-3308-6740 / Fax: +55-51-3308-7311

e-mail: jabchies@terra.com.br

Short Title: Cytokines in prostate cancer and benign hyperplasia

Acknowledgments

Grant sponsors: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq; Fundo do Incentivo à Pesquisa e Eventos/Hospital de Clínicas de Porto Alegre FIPE/HCPA; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul FAPERGS. Grant numbers: CNPq 306349/2011-6, 141916/2012-5, 135450/2009-8 and 473115/2011-5; FIPE/HCPA 14-0462; FAPERGS 10/1516-6 and 12/2151-2.

ABSTRACT

BACKGROUND. Prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are highly prevalent conditions affecting aged men. Cytokines are molecules that play a determinant role in immune responses. In cancer, cytokines can inhibit or promote antitumor immunity, with beneficial or detrimental effects. Recently, the influence of the human leukocyte antigen G (HLA-G) in PCa and BPH development was evaluated through the analyses of genetic polymorphisms. It is known that HLA-G promotes a T helper (Th) 2 cytokine profile polarization and that tumor cells can escape immunosurveillance and antitumor response through HLA-G expression. The aim of the present study was to characterize the Th1/Th2/Th17 cytokine profile in prostate cancer and benign hyperplasia in Brazilian men predominantly Euro-descendant.

METHODS. The serum concentrations of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ), and IL-17A cytokines were measured in 23 PCa and 44 BPH patients, and in 22 healthy men (controls) by cytometric bead array (CBA). Differences of cytokine levels (in pg/mL) between PCa, BPH, and control groups were verified by the Kruskal-Wallis test, following by Dunn's test when necessary. To verify such differences between stages of PCa progression (based on Gleason score), the Wilcoxon-Mann-Whitney *U* test was performed.

RESULTS. PCa patients presented serum levels of IL-10 and TNF- α significantly higher than controls ($P = 0.008$ and 0.041 , respectively). No differences were detected in the cytokine levels in patients classified according

to stages of PCa progression. BPH patients presented higher serum levels of IFN- γ and of IL-17A than PCa patients ($P = 0.023$ and 0.011 , respectively) and higher IL-17A serum levels as compared to controls ($P = 0.004$).

CONCLUSIONS. Our data revealed the occurrence of distinct cytokine profiles in PCa, BPH and healthy individuals and suggest an influence of cytokine profile in prostate cancer and benign hyperplasia development.

Key words: cancer, cytokine, IFN- γ , IL-10, IL-17, TNF- α , prostate.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are highly prevalent conditions affecting men. Both are hormone-dependent (androgen) diseases, their incidence increases with age, and are considered unrelated prostate conditions. Despite intense research on PCa and BPH, their etiologies are not yet well understood [1]. It is well recognized that the immunological competence of a given individual is determinant in tumor development and progression [2]. The complex interactions among molecules and the different cell populations in the organism, including tumor cells, T lymphocytes, endothelial and dendritic cells (DC) [3-6], can determine whether a pro- or an antitumoral immune response will predominate [2,7,8], leading to survival and progression or to the clearance of tumor cells [3,6,9]. In PCa, the induction of immunosuppressive cytokines with a shift towards a T-helper 2 (Th2) type response inside prostate tumors have been suggested as an important tumor escape strategie that impare the ability of the immune system to recognize and eliminate tumor cells [10].

Cytokines are signaling proteins produced by immune and non-immune cells. These molecules play key roles in the innate and adaptive immune responses, and affect also antitumoral responses [11-13]. Most cytokines act locally, but a systemic profile can be evaluated in the peripheral blood [14]. It is known that cytokines can alter the prostatic microenvironment in both PCa and BPH [15]. The set of cytokines produced by tumor cells can impair the responses of immune effector cells, inhibit host immunity, and consequently contribute to tumor development [16]. The inhibition of effector cells can configure an escape mechanism associated to a preponderant Th2 immune

response pattern. Th2 cytokines, such as IL-4, IL-6, and IL-10 were already associated to suppression of anticancer immunity, favoring tumor growth [14,16-18]. In contrast, Th1 cytokines, including IL-2 and IFN- γ , can potentiate antitumor immune responses and were associated with good prognosis in several types of cancers, such as PCa, melanoma, breast, ovarian, colorectal cancer [19-22]. In such a complex cytokine network, pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , may interact with both Th1 and Th2 cytokines [23]. Moreover, a crucial role of Th17 cytokines, such as IL-17A, was suggested in cancer initiation, growth, and metastasis [24,25].

It has been reported that cytokines can be modulated by the human leukocyte antigen G (HLA-G) molecule. HLA-G is often abnormally expressed in cancer conditions, and among other immunosuppressive mechanisms, can promote a Th2 cytokine environment [26-28]. Recently, our research group observed an elevated HLA-G protein expression in prostate tissues with PCa, and a nearly absence or low HLA-G expression in BPH tissues. Simultaneously, HLA-G expression was absent in non-tumoral prostate tissues [29]. Of note, cytokines such as IL-10 and IFN- γ , secreted in tumor microenvironment, can modulate HLA-G protein expression [30,31]. The comprehension of cytokine profile in PCa and BPH can be useful to the development of more effective immunotherapies.

Based on this scenario and in order to characterize the systemic immune response in prostate tumor conditions, we investigated serum cytokine levels in PCa and BPH patients, and in healthy controls from South Brazil. Data will also be presented considering the cytokine profile in the context of PCa progression.

MATERIALS AND METHODS

Sample and study population

In this study, serum samples were obtained from 89 individuals, including 23 PCa and 44 BPH patients, and 22 healthy control subjects, diagnosed at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), in South Brazil, between 2004 and 2009. Serum was obtained from peripheral blood collected from participants by venipuncture into an anticoagulant-free tube, and stored at -80°C. All patients included in this study underwent by surgery due PCa or BPH and the blood was collected before the surgery (not hemodiluted). Inclusion criteria were previously described by Zambra et al. [32]. For the PCa group, inclusion criteria were age between 45 and 80 years, no current hormone-ablative therapy and no other concomitant neoplasia. For BPH, age between 40 and 80 years, prostate volume larger than 30 cm³ (evaluated by abdominal ultrasound), no past or current hormone-ablation therapy or 5 α -reductase inhibitor therapy, and absence of any neoplasia. The diagnosis of BPH was confirmed by pathological examination after patient surgery. Inclusion criteria for controls were age between 40 and 80 years, prostate volume smaller than 30 cm³, prostate-specific antigen (PSA) value less than 2.0 ng/mL, digital rectal examination with normal result and absence of any neoplasia. Information about ethnic origin, age, Gleason score, tumor stage and total serum PSA level at diagnosis was recorded. Ethnicity information was evaluated by self-assessment of skin color (as White, Brown, Black and other) when data was collected, according to the classification system of the national agency for geography and statistics, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE

[33]. The study was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from all subjects.

Th1/Th2/Th17 cytokine profile

To investigate the cytokine profile, we measured the serum concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-17A cytokines by flow cytometry. These cytokines were simultaneously detected using the Human Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array (CBA) kit (BD Biosciences, California; Catalog No.560484). Serum aliquots were diluted with assay diluent (1:2 v/v) and CBA analyses were performed according to manufacturer's instructions. Two hundred microliters of each sample were plated on PRO-BIND™ assay plates and analyzed on a FACSAria™ III flow cytometer using FCAP FCS Filter and FCAP Array Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Through these software packages, debris were filtered from the data and the bead populations, as well as their mean fluorescence intensities (MFIs), were assessed. Each cytokine bead was measured 200 times before the MFI was averaged. The same procedure was followed to obtain a standard curve. The concentration in pg/ml of each cytokine was calculated to all samples by log-transformation of MFI values.

Statistical analysis

The analysis of differences between means in the continuous variables was performed by ANOVA one-way test. The median differences of prostate volume, serum PSA and cytokines values (adjusted for log-transformation)

between PCa, BPH, and control groups were verified by the Kruskal–Wallis non-parametric test, following by Dunn’s test when necessary. For analysis, the PCa individuals were classified into two subgroups based on biopsy Gleason score, $\leq 6(3+3)$ and $\geq 7(3+4)$, as representative of less and more aggressive disease, respectively. The Wilcoxon-Mann-Whitney U non-parametric test was performed to verify differences of serum cytokine levels between Gleason score subgroups. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 20.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL). The graphics were generated through the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, California - USA).

RESULTS

Clinical and pathologic characteristics

The assessed sample groups were characterized in Table I. The ethnic distribution was similar between PCa, BPH, and control groups ($P_{\text{global}} = 0.425$), with individuals predominantly Euro-descendant (82.6%, 93.2%, and 90.9%, respectively). The average age did not differ between PCa and BPH groups, but was lower in the control group than the other groups (both $P < 0.05$), reflecting the high incidence of BPH according to aging. The median of serum PSA levels was significantly different between PCa and control or BPH groups (both $P < 0.001$), but did not differ between BPH and controls. The prostate volume median was higher in PCa (31.8 cm³) and BPH groups (30.0 cm³) in comparison with the control group (20.0 cm³), both $P < 0.001$, although similar

comparing PCa and BPH groups. Among the PCa patients, the biopsy Gleason score was $\leq 6(3+3)$ in 11 (47.8%) individuals, and $\geq 7(3+4)$ in 6 (26.2%) individuals. Considering the tumor stage, 7 (30.4%) PCa patients had organ-confined disease (T1 or T2) at the time of surgery, while 1 (4.4%) had extraprostatic tumor (T3 or T4) - Table I.

Cytokine profile in PCa and BPH

The circulating IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-17A levels were evaluated in PCa, BPH and healthy control individuals. The median differences of serum cytokines values between the studied groups were assessed by the Kruskal Wallis test, following by Dunn's test when necessary. The median serum levels of the different cytokines are presented in the Fig. 1, while statistical data are presented in the Table II. No statistically significant difference was observed for IL-2, IL-4 and IL-6 levels between groups. IL-10 and TNF- α levels were higher in PCa as compared to controls ($P = 0.008$ and 0.041 , respectively), but did not differ between BPH and PCa patients. The IFN- γ level was significantly higher in BPH individuals in comparison with PCa ($P = 0.023$). In addition, the IL-17A level was higher in BPH as compared to PCa and control individuals ($P = 0.011$ and 0.004 , respectively), while no statistically significant difference was detected between PCa and control individuals.

Cytokines in PCa progression

Serum cytokine levels were evaluated in prostate cancer individuals classified according to the clinicopathological status and are presented in the

Table III. The Wilcoxon-Mann-Whitney *U* test was performed to assess potential differences of cytokine levels and association to progression to a more aggressive stage of PCa. For all cytokines evaluated, no statistically significant association was detected with the clinicopathological PCa status [considering the Gleason score subgroups $\leq 6(3+3)$ and $\geq 7(3+4)$, respectively].

DISCUSSION

The host response to cancer is the resulting of a complex interaction among tumor and immune cells, and it is dependent of both the tumor microenvironment and genetic factors [34]. Systemic cytokines can exert important effects in such context, including induction/inhibition of immune responses, cell differentiation, proliferation, and/or cancer development. The analyses of cytokine levels and the identification of specific cytokine profiles are crucial to better understand the susceptibility, the development and the clinical course of prostate cancer and benign hyperplasia diseases [35,36]. Here, we characterized the Th1/Th2/Th17 profile of serum cytokines in PCa and BPH patients as well as in healthy Brazilian men (controled for both diseases).

In the present study, prostate cancer patients presented serum levels of IL-10 significantly higher than those observed in control individuals. IL-10 is a key anti-inflammatory cytokine, with a dual role in cancer development. Among its effects, IL-10 may suppress Th1 immune responses and protect the tumor cells from lysis mediated by cytotoxic T lymphocytes [7], favouring tumor development and metastasis [8,36-38]. In contrast, high levels of IL-10 have been associated with reduced angiogenesis, through reduction of vascular

epithelial growth factor expression. In this context, tumor progression may be affected by a limitation on blood supply [38,39]. Not different from other cancers, in PCa the role of IL-10 is still controversial [10,13,14,40-45]. In line with our findings, IL-10 overexpression was reported on different tumors, and was associated with cancer development, including in PCa [7,8,10,36,37,46,47]. High IL-10 serum levels were already observed in PCa individuals attained by cachexia, as compared to healthy controls, and a contribution of IL-10 to PCa development was suggested [36]. A fact that deserves attention is that IL-10 expression in tumoral conditions has been associated with increased HLA-G protein expression in humans [8]. This is even more remarkable when taking together with our previous study where we reported a high HLA-G protein expression in PCa tissues contrasting to a virtual absence of HLA-G expression on non-tumoral prostate tissues [29]. IL-10 is often expressed by tumors and tumor-infiltrating cells [48] and is frequently observed near HLA-G expressing cells [8]. IL-10 is a major factor in the up-regulation of HLA-G expression in human cancer cells, potentially providing to such cells a mechanism of immune escape [8,28]. In the same direction, and potencializing its effect, HLA-G can increase IL-10 secretion [31,49]. Particularly, soluble HLA-G may increase IL-10 production even in the absence of HLA-G expressing cells [50]. So, it is possible that high levels of soluble HLA-G molecules, as well as of IL-10, present in the peripheral blood of cancer patients, would reflect a systemic state of immunological tolerance in the organism [50]. So far, there are no studies in PCa and BPH, or other proliferative prostatic condition, approaching a correlation between IL-10 and HLA-G expression. Altogether, our data highlight

the importance of more studies in this area and suggest a possible influence of IL-10 in PCa cancer development.

The PCa individuals here studied also presented higher serum levels of TNF- α as compared to healthy men. TNF- α expression has been reported in several human tumors, including PCa [35,36,51]. This pro-inflammatory cytokine may contribute to effective antitumor immune responses through essential inflammatory reactions or, in another hand, may favour cancer development and progression due to its role as a critical mediator of chronic inflammation associated to cancer [52,53]. In previous studies, higher TNF- α serum levels were observed in patients with advanced PCa in comparison with healthy men, and those levels were associated with PCa progression [35,36,54]. In addition, increased levels of TNF- α and IL-6 were associated with advanced disease and cachexia in patients with PCa [12,35,54]. However, this is not a general finding since Bhavsar et al. reported low TNF- α plasma levels in PCa patients as compared to controls and, in this same work, an increase of TNF- α levels correlated with decreased PCa risk [14]. Since the role of TNF- α is complex and still controversial in prostate cancer, more studies are necessary to clarify this question. Together, the data of TNF- α and IL-10 in PCa creates a scenario with a cytokine profile favouring PCa development.

In the present study, BPH patients presented higher serum levels of IFN- γ than PCa individuals. This pro-inflammatory cytokine is commonly reported as an antitumoral molecule [36]. These results make sense in this hyperproliferative prostate condition, since it is known that IFN- γ can stimulate proliferation of BPH stromal cell (but not of the normal prostate stromal cell) [55], and proliferation of BPH epithelial cells *in vitro* [56]. Such proliferative

process could occur *in vivo*. Importantly, it was already reported that human BPH-derived cells *in vitro* can induce secretion of IFN- γ and IL-17 through activation of alloreactive CD4⁺ T cells. IFN- γ and IL-17 can up-regulate IL-8 production by BPH cells. This IL-8 can act as a growth factor for BPH cells and could lead to prostatic cell growth in BPH [57,58]. In addition, we also observed higher serum levels of IL-17A in BPH patients in comparison with PCa and control individuals. It was reported that IL-17 can be expressed by BPH epithelial cells, and it is abundantly expressed by activated T cells from BPH prostate [59]. Steiner et al. [59] suggested that beyond of a local influence in prostate, a systemic influence of IL-17 in prostatic diseases would be possible. As mentioned, in a previous work HLA-G expression was absent or very low in BPH although quite high among PCa patients (Zambra et al, personal communication). Also, increased levels of IFN- γ correlated with decreased levels of soluble HLA-G in serum from patients with allergic rhinitis after a treatment with a sublingual immunotherapy that induces a shift toward Th1 responses [60]. The IFN- γ and IL-17A serum levels observed among BPH patients suggest that this disease differ from PCa by a pro-inflammatory cytokine profile that seems to favour the benign hyperproliferative process that occurs in BPH. Our data stimulate new studies to investigate the possible relation among IFN- γ and HLA-G in prostate cancer and benign hyperplasia.

CONCLUSIONS

In the present work, it was possible to determine that the cytokine profile of prostate cancer patients differs from healthy individuals by higher IL-10 and TNF- α serum levels, as well as from individuals with benign prostatic

hyperplasia by lower IFN- γ e IL-17A levels. Moreover, BPH differs from healthy individuals by higher IL-17A serum levels. Altogether, our data suggest that a specific cytokine profile may favour prostate cancer and benign hyperplasia development, and can be useful for the development of more effective therapeutic strategies in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all studied participants and urologists that collaborate to this study and provided clinical data, especially Brasil Silva Neto and Milton Berger. We gratefully acknowledge to Luciano S. P. Guimarães (Biostatistics Unit from GPPG/HCPA) for his collaboration in statistical analysis.

REFERENCES

1. Novara G. Editorial comment on: Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur Urol* 2009;55:873-874.
2. Chew V, Toh HC, Abastado JP. Immune microenvironment in tumor progression: characteristics and challenges for therapy. *J Oncol* 2012;2012:608406.
3. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 2010;22:231–237.
4. Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2012;72:3125–30.
5. Whiteside TL, Regulatory T. cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunol Immunother* 2014;63:67–72.
6. Poggi A, Musso A, Dapino I, Zocchi MR. Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells. *Immunol Lett* 2014;159:55-72.
7. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 2002;3:999–1005.
8. Urosevic M, Dummer R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message. *Semin Cancer Biol* 2003;13:337-342.

9. Conti J, Thomas G. The role of tumour stroma in colorectal cancer invasion and metastasis. *Cancers (Basel)* 2011;3:2160–2168.
10. Miller AM, Pisa P. Tumor escape mechanisms in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:81–87.
11. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:11–22.
12. Perambakam SM, Srivastava R, Peace DJ. Distinct cytokine patterns exist in peripheral blood mononuclear cell cultures of patients with prostate cancer. *Clin Immunol* 2005;117:94-99.
13. Wang MH, Helzlsouer KJ, Smith MW, Hoffman-Bolton JA, Clipp SL, Grinberg V, De Marzo AM, Isaacs WB, Drake CG, Shugart YY, Platz EA. Association of IL10 and other immune response - and obesity - related genes with prostate cancer in CLUE II. *Prostate* 2009;69:874-885.
14. Bhavsar NA, Bream JH, Meeker AK, Drake CG, Peskoe SB, Dabito D, De Marzo AM, Isaacs WB, Platz EA. A peripheral circulating TH1 cytokine profile is inversely associated with prostate cancer risk in CLUE II. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:2561-2567.
15. Kramer G, Mitteregger D, Marberger M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? *Eur Urol* 2007;51:1202-1216.
16. Kiyomi A, Makita M, Ozeki T, Li N, Satomura A, Tanaka S, Onda K, Sugiyama K, Iwase T, Hirano T. Characterization and Clinical Implication of Th1/Th2/Th17 Cytokines Produced from Three-Dimensionally Cultured Tumor Tissues Resected from Breast Cancer Patients. *Transl Oncol* 2015;8:318-326.

17. Benoy I, Salgado R, Colpaert C, Weytjens R, Vermeulen PB, and Dirix LY. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* 2002;2:311–315.
18. Kozłowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P, Wojtukiewicz MZ. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Białymst* 2003;48:82–84.
19. Dunn GP, Ikeda H, Bruce AT, Koebel C, Uppaluri R, Bui J, Chan R, Diamond M, White JM, Sheehan KC, Schreiber RD. Interferon-gamma and cancer immunoediting. *Immunol Res* 2005;32:231–245.
20. Haabeth OA, Lorvik KB, Hammarström C, Donaldson IM, Haraldsen G, Bogen B, Corthay A. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature Commun* 2011;2:240.
21. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 2013;39:11–26.
22. Smyth MJ, Ngiow SF, Ribas A, Teng MW. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13:143-158.
23. Hernandez-Pando R, Rook GA. The role of TNF-alpha in T-cell mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 1994;82:591–595.
24. Martin-Orozco N, Dong C. The IL-17/IL-23 axis of inflammation in cancer: friend or foe? *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10:543–549.

25. Sakurai T, Yoshiga D, Ariyoshi W, Okinaga T, Kiyomiya H, Furuta J, Yoshioka I, Tominaga K, Nishihara T. Essential role of mitogen-activated protein kinases in IL-17A-induced MMP-3 expression in human synovial sarcoma cells. *BMC Res Notes* 2016;9:68.
26. Kapasi K, Albert SE, Yie S, Zavazava N, Librach CL. HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology* 2000;101:191–200.
27. Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A, Taketani Y. Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol Hum Reprod* 2001;7:195–200.
28. Fainardi E, Castellazzi M, Stignani M, Morandi F, Sana G, Gonzalez R, Pistoia V, Baricordi OR, Sokal E, Peña J. Emerging topics and new perspectives on HLA-G. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:433-451.
29. Zambra FMB, Oliveira FH, Biolchi V, Brum IS, Chies JAB. High HLA-G protein expression level is a common feature in prostate cancer but not in benign prostatic hyperplasia. [Personal communication].
30. Moreau P, Flajollet S, Carosella ED. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med* 2009;13:2973-2989.
31. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Roux DT, Moreau P, LeMaoult J. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol* 2015;127:33-144.
32. Zambra FM, Biolchi V, Brum IS, Chies JA. CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Hum Immunol* 2013;74:1003-1008.

33. Osorio RG. O sistema classificatório de “cor ou raça” do IBGE. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2003, 50.
34. Roth MD, Harui A. Human tumor infiltrating lymphocytes cooperatively regulate prostate tumor growth in a humanized mouse model. *J Immunother Cancer* 2015;3:12.
35. Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 2004;90:2312-2316.
36. Tazaki E, Shimizu N, Tanaka R, Yoshizumi M, Kamma H, Imoto S, Goya T, Kozawa K, Nishina A, Kimura H. Serum cytokine profiles in patients with prostate carcinoma. *Exp Ther Med* 2011;2:887-891.
37. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol* 2005;78:1043-1051.
38. Zabaleta J, Lin HY, Sierra RA, Hall MC, Clark PE, Sartor OA, Hu JJ, Ochoa AC. Interactions of cytokine gene polymorphisms in prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2008;29:573-578.
39. Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. *J. Interferon Cytokine Res* 1999;19:697–703.
40. Stearns ME, Rhim J, Wang M. Interleukin 10 (IL-10) inhibition of primary human prostate cell-induced angiogenesis: IL-10 stimulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 secretion. *Clin Cancer Res* 1999; 5:189-196.

41. Filella X, Alcover J, Zarco MA, Beardo P, Molina R, Ballesta AM. Analysis of type T1 and T2 cytokines in patients with prostate cancer. *Prostate* 2000;44:271–274.
42. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, Southgate C, Easton DF, Eeles RA, Howell WM. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:3369–3372.
43. Michaud DS, Daugherty SE, Berndt SI, Platz EA, Yeager M, Crawford ED, Hsing A, Huang WY, Hayes RB. Genetic polymorphisms of interleukin-1B (IL-1B), IL-6, IL-8, and IL-10 and risk of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:4525–4530.
44. Faupel-Badger JM, Kidd LC, Albanes D, Virtamo J, Woodson K, Tangrea JA. Association of IL-10 polymorphisms with prostate cancer risk and grade of disease. *Cancer Causes Control* 2008;19:119–124.
45. Salman H, Ori Y, Bergman M, Djaldetti M, Bessler H. Human prostate cancer cells induce inflammatory cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells. *Biomed Pharmacother* 2012;66:330-333.
46. Wise GJ, Marella VK, Talluri G, Shirazian D. Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer. *J Urol* 2000;164:722–725.
47. Elsasser-Beile U, Gierschner D, Jantscheff P, Schultze-Seemann W, Katzenwadel A, Wetterauer U. Different basal expression of type T1 and T2 cytokines in peripheral lymphocytes of patients with adenocarcinomas and benign hyperplasia of the prostate. *Anticancer Res* 2003;23:4027–4031.

48. Ellyard JI, Simson L, Parish CR. Th2-mediated antitumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* 2007;70:1–11.
49. Huang YH, Zozulya AL, Weidenfeller C, Schwab N, Wiendl H. T cell suppression by naturally occurring HLA-G-expressing regulatory CD4+ T cells is IL-10-dependent and reversible. *Journal of Leukocyte Biology* 2009;86:273–281.
50. Urosevic M, Dummer R. Human Leukocyte Antigen–G and Cancer Immunoediting. *Cancer Res* 2008;68:627-630.
51. de Miguel MP, Royuela M, Bethencourt FR, Santamaría L, Fraile B, Paniagua R. Immunoexpression of tumour necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2 correlates with proliferation/apoptosis equilibrium in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *Cytokine* 2000;12:535-538.
52. Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett* 2013;328:222-5.
53. Stark T, Livas L, Kyprianou N. Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. *Transl Androl Urol* 2015;4:455-463.
54. Pfitzenmaier J, Vessella R, Higano CS, Noteboom JL, Wallace D Jr, Corey E. Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma. *Cancer* 2003;97:1211-1216.
55. Kramer G, Steiner GE, Handisurya A, Stix U, Haitel A, Knerer B, Gessl A, Lee C, Marberger M. Increased expression of lymphocyte-derived cytokines in benign hyperplastic prostate tissue, identification of the producing cell types, and effect of differentially expressed cytokines on stromal cell proliferation. *Prostate* 2002;52(1):43-58.

56. Deshpande N, Hallowes RC, Cox S, Mitchell I, Hayward S, Towler JM. Divergent effects of interferons on the growth of human benign prostatic hyperplasia cells in primary culture. *J Urol* 1989;141:157–160.
57. Penna G, Fibbi B, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Laverny G, Gacci M, Crescioli C, Maggi M, Adorini L. Human benign prostatic hyperplasia stromal cells as inducers and targets of chronic immuno-mediated inflammation. *J Immunol* 2009;182(7):4056-4064.
58. Bardan R, Dumache R, Dema A, Cumpănas A, Bucuras V. The role of prostatic inflammation biomarkers in the diagnosis of prostate diseases. *Clin Biochem* 2014;47:909-915.
59. Steiner GE, Newman ME, Paikl D, Stix U, Memaran-Dagda N, Lee C, Marberger MJ. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate* 2003;56:171-182.
60. Ciprandi G, Continia P, Fenoglio D, Sormani MP, Negrini S, Puppo F, Indiveri F. Relationship between soluble HLA-G and HLA-A,-B,-C serum levels, and interferon-gamma production after sublingual immunotherapy in patients with allergic rhinitis. *Hum Immunol* 2008;69:409-413.

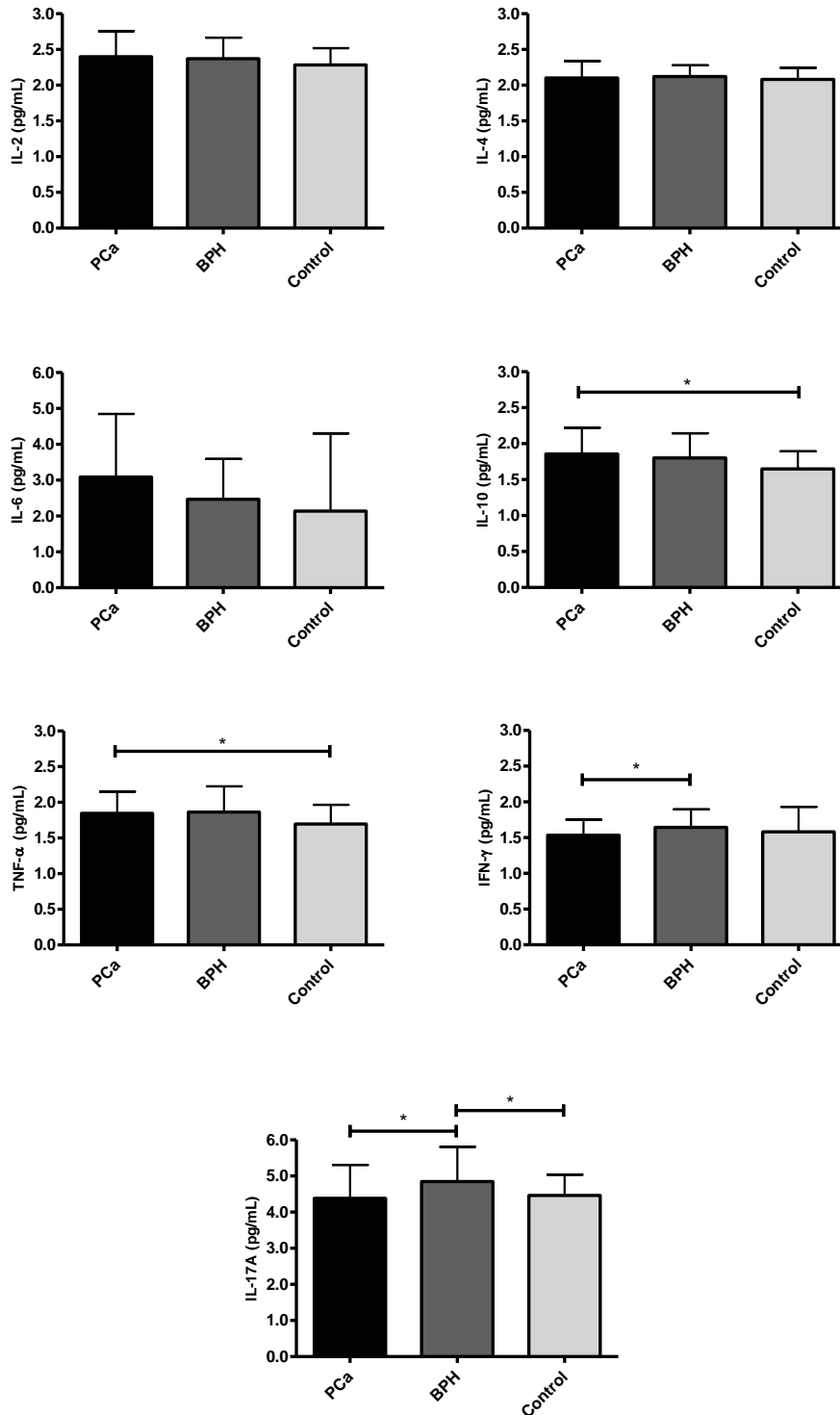


Figure 1. Analysis of the serum cytokine levels IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-17A between PCa, BPH and control individuals. Vertical columns represent median concentration of cytokines (in pg/mL) in each group and error bars represent interquartile range for all graphics. Comparisons between groups were performed by the Kruskal–Wallis test, following by Dunn’s test when necessary. * $P < 0.05$. BPH, benign prostatic hyperplasia; PCa, prostate cancer.

Table I. Characteristics of the sample assessed in the study of cytokine profile.

	PCa (n = 23)	BPH (n = 44)	Control (n = 22)
Ethnicity (euro-descendant) ^{a,d}	19 (82.6%)	41 (93.2%)	20 (90.9%)
Age (years) ^d			
Mean ± SD	62.55 ± 8.55	58.76 ± 9.38	53.23 ± 7.62
Range	47 - 73	42 - 77	41 - 65
PSA (ng/mL) ^{b,d}	5.88 (4.40 – 10.23)	1.18 (0.64 – 2.77)	0.89 (0.62 – 1.39)
Prostate volume (cm ³) ^{b,d}	31.80 (28.90 – 50.05)	30.00 (30.00 – 40.00)	20.00 (20.00 – 25.00)
Tumor stage ^{a,c}			
(T1+T2)	7 (30.4%)		
(T3+T4)	1 (4.4%)		
Gleason score ^a			
6 (3+3)	11 (47.8%)		
7 (3+4)	4 (17.4%)		
7 (4+3)	1 (4.4%)		
8 (4+4)	1 (4.4%)		

BPH, benign prostatic hyperplasia; n, number of cases; PCa, prostate cancer; PSA, Prostate-Specific Antigen; SD, standard deviation.

^a Number of cases and percentages.

^b Medians and 25/75 percentiles.

^c There was no information available on pathologic tumor stage for 15 (65.2%) patients and on grade stage for 6 (26.0%) patients. One (4.3%) patient was submitted to radiotherapy.

^d *P*-value - Ethnicity - PCa vs. BPH vs. control: *P*_{global}=0.425. Age - PCa vs. BPH: *P*=0.234; PCa vs. control: *P*=0.002; BPH vs. control: *P*=0.048. PSA - PCa vs. BPH or control: *P*<0.001 and BPH vs. control: *P*>0.05. Prostate volume - PCa or BPH vs. control: *P*<0.001; PCa vs. BPH: *P*>0.05.

Table II. Median concentration (pg/mL) of serum cytokines in PCa, BPH and control group.

Cytokine	PCa^a (n = 23)	BPH^a (n = 44)	Control^a (n = 22)	P-value^{b,c}
IL-2	2.40 (2.17 - 2.53)	2.37 (2.22 - 2.51)	2.28 (2.16 - 2.40)	0.122
IL-4	2.10 (2.00 - 2.24)	2.12 (2.04 - 2.20)	2.08 (1.98 - 2.15)	0.155
IL-6	3.09 (2.56 - 4.32)	2.47 (2.17 - 3.29)	2.14 (2.02 - 4.19)	0.058
IL-10	1.86 (1.77 - 2.14)	1.80 (1.59 - 1.93)	1.65 (1.54 - 1.79)	0.011
TNF- α	1.85 (1.71 - 2.02)	1.86 (1.65 - 2.01)	1.70 (1.54 - 1.81)	0.025
IFN- γ	1.53 (1.41 - 1.63)	1.64 (1.53 - 1.79)	1.58 (1.37 - 1.72)	0.013
IL-17A	4.38 (4.00 - 4.93)	4.85 (4.40 - 5.36)	4.46 (4.13 - 4.71)	0.001

BPH, benign prostatic hyperplasia; n, number of cases; PCa, prostate cancer.

^a Medians and 25/75 percentiles of cytokine levels (in pg/mL).

^b Kruskal-Wallis test, following by Dunn's test as the case (IL-10: $P_{PCa \times BPH} = 0.331$, $P_{PCa \times Control} = 0.008$, $P_{BPH \times Control} = 0.190$. TNF- α : $P_{PCa \times BPH} = 1.000$, $P_{PCa \times Control} = 0.041$, $P_{BPH \times Control} = 0.053$. IFN- γ : $P_{PCa \times BPH} = 0.023$, $P_{PCa \times Control} = 1.000$, $P_{BPH \times Control} = 0.111$. IL-17A: $P_{PCa \times BPH} = 0.011$, $P_{PCa \times Control} = 1.000$, $P_{BPH \times Control} = 0.004$).

^c P-values are statistically significant when 0.05 or less.

Table III. Median concentration (pg/mL) of serum cytokines in Gleason score prostate cancer subgroups.

Cytokines	Gleason score of PCa ^a		P-value ^{b,c}
	≤6(3+3)	≥7(3+4)	
IL-2	2.27 (2.18 - 2.36)	2.42 (2.09 - 2.55)	0.391
IL-4	2.12 (2.03 - 2.24)	2.03 (1.97- 2.10)	0.365
IL-6	3.09 (2.60 - 4.51)	3.32 (2.08 - 4.29)	0.688
IL-10	2.00 (1.81 - 2.33)	1.77 (1.50 - 1.91)	0.175
TNF-α	1.81 (1.71 - 1.95)	1.76 (1.58 - 1.85)	0.479
IFN-γ	1.53 (1.46 - 1.66)	1.61 (1.41 - 1.72)	0.578
IL-17A	4.38 (4.04 - 4.89)	4.08 (3.85 - 4.31)	0.208

PCa, prostate cancer.

^a Sample size is $N_{\leq 6(3+3)} = 11$, $N_{\geq 7(3+4)} = 6$ individuals. Values are the medians and 25/75 percentiles of cytokine levels (in pg/mL).

^b Mann-Whitney *U* test.

^c *P*-values are statistically significant when 0.05 or less.

Capítulo V

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

O papel do *HLA-G* em condições patológicas e fisiológicas da próstata é pouquíssimo estudado e, conseqüentemente, pouco compreendido (Langat *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2011; Hviid, 2015). O câncer de próstata e a hiperplasia prostática benigna apresentam grande impacto socioeconômico no mundo e ainda há a necessidade de métodos diagnósticos mais eficientes, bem como abordagens terapêuticas mais eficazes. Frente à inegável importância da molécula HLA-G no câncer como uma estratégia de escape da resposta imune antitumoral e ao potencial do HLA-G para uso clínico, é de grande relevância o presente estudo. Aqui, avaliamos a influência do *HLA-G* em pacientes com câncer de próstata, hiperplasia prostática benigna e em homens saudáveis (controlados para CaP e HPB). Para tanto, realizamos uma análise de polimorfismos da região 3' não traduzida (UTR) do gene *HLA-G* no DNA dos indivíduos estudados, bem como avaliamos a expressão proteica de HLA-G em tecidos de próstata humana (com CaP ou HPB). Por fim, investigamos o perfil imunológico sistêmico apresentado em cada condição, através da caracterização dos indivíduos quanto ao perfil de citocinas séricas Th1/Th2/Th17.

A maioria dos estudos sobre HLA-G no câncer envolve a análise de expressão proteica, do HLA-G de membrana ou solúvel, em células tumorais ou fluidos biológicos, e poucos estudos genéticos foram realizados. A 3'UTR do gene *HLA-G* apresenta sítios polimórficos que podem influenciar a estabilidade, disponibilidade, mobilidade e padrão de processamento do mRNA, e conseqüentemente o padrão de expressão proteica (Donadi *et al.*, 2011). Assim, iniciamos o presente trabalho investigando o impacto de haplótipos e variantes genéticas da 3'UTR do gene *HLA-G* no desenvolvimento de CaP e HPB. Um total de 468 homens brasileiros (com CaP, HPB e controles saudáveis) foi avaliado quanto a oito variantes genéticas frequentes na população brasileira (Castelli *et al.*, 2010). As variantes estudadas foram o polimorfismo de inserção/deleção de um fragmento de 14 pb (rs371194629), e os SNPs na posição +3003T/C (rs1707), +3010C/G (rs1710), +3027A/C (rs17179101), +3035C/T (rs17179108), +3142G/C (rs1063320), +3187A/G (rs9380142) e +3196C/G

(rs1610696) do gene *HLA-G*. As posições dos sítios polimórficos são determinadas considerando como nucleotídeo +1 a adenina do primeiro códon ATG traduzido e a presença do fragmento de 14 pares de base na região 3' não traduzida do gene (Donadi *et al.*, 2011, Castelli *et al.*, 2014). Na população estudada, identificamos sete haplótipos (UTR-1 a -7) que se encontram entre os mais frequentes em diversas populações do mundo (Castelli *et al.*, 2010, 2011, 2014b, Sabbagh *et al.*, 2014, Santos *et al.*, 2013). Destacamos neste estudo caso-controle a associação do haplótipo UTR-4 (Del_+3003C_+3010G_+3027C_+3035C_+3142C_+3187A_+3196C) como um fator de suscetibilidade ao câncer de próstata, tanto na comparação do grupo CaP com o grupo controle, quanto com o grupo HPB. O haplótipo UTR-4 apresentou frequências que aumentavam dos controles (8,9%), para HPB (10,9%), até CaP (18,5%). Cabe salientar que uma alta expressão da proteína HLA-G é característica frequentemente observada em situações de desenvolvimento e progressão do câncer (Amiot *et al.*, 2011). No entanto, a influência do haplótipo UTR-4 sobre a expressão dessa proteína ainda é controversa, pois o UTR-4 já foi associado a um nível intermediário de expressão de HLA-G solúvel em populações brasileiras e francesas saudáveis (Martelli-Palomino *et al.*, 2013), enquanto em uma população de Mali não foi observada qualquer associação (Carlini *et al.*, 2013). Encontramos ainda o genótipo +3003CT e o alelo +3003C como fatores de risco para câncer de próstata. É importante perceber que o UTR-4 é o único haplótipo de alta frequência que contém o alelo +3003C. Assim, a frequência deste alelo acaba refletindo a frequência do haplótipo UTR-4 *per se*, permitindo-nos reconhecer a variante +3003 como um possível tag SNP para o risco de CaP. Certamente, este representa o maior achado desse estudo caso-controle. O sítio +3003 localiza-se em um segmento que pode ser alvo de vários microRNAs que potencialmente podem regular a expressão do *HLA-G*. A presença de determinado alelo nesta posição poderia exercer grande influência sobre a ligação de miRNAs (Castelli *et al.*, 2009, Porto *et al.*, 2015). Os miRNAs, ao ligarem-se aos mRNAs alvo, podem induzir a degradação destes mRNAs ou reprimir sua tradução (Bartel, 2009). É possível que a presença do alelo +3003C, e de outros polimorfismos em desequilíbrio de ligação com ele, diminua a afinidade ou a especificidade do mRNA do *HLA-G* a certos miRNAs, como o miR-148a-3p, -148b-3p, -4462, -4492, -193a-5p, -559 and -6515-5p (Porto *et al.*, 2015), aumentando a disponibilidade de mRNA e sua expressão

em proteína. Uma elevada expressão de HLA-G poderia determinar uma imunovigilância menos efetiva em pacientes com CaP, favorecendo o desenvolvimento da doença. Porém, os perfis de expressão do HLA-G e de miRNAs em pacientes com CaP precisam ser investigados, bem como o impacto funcional da variante genética +3003 na expressão da proteína HLA-G.

Estudos de diferentes grupos apontam para a associação de haplótipos “não Ins_G_A” (incluindo UTR-1, -3, -4 e -6, sendo que “Ins” refere-se ao alelo de inserção de 14 pb, “G” ao alelo +3142G, e “A” ao +3187A) com nível intermediário/alto de expressão proteica de HLA-G (Martelli-Palomino *et al.*, 2013, Carlini *et al.*, 2013), o que permite inferir o nível de expressão dessa proteína. Em nosso estudo, encontramos o grupo de haplótipos “não Ins_G_A” conferindo risco para CaP. Mais uma vez, a associação de haplótipos potencialmente relacionados a um nível elevado de HLA-G faz sentido, pois permitiria o escape tumoral do sistema imune, contribuindo para o desenvolvimento do CaP. Avaliando os polimorfismos quanto à progressão do CaP, não observamos influência dos mesmos no desenvolvimento de um CaP localizado ou avançado, nem menos ou mais agressivo. Em relação à HPB, além da associação já mencionada do haplótipo UTR-4 como fator de risco para CaP, não foi detectada outra associação significativa. Em conjunto, os dados desse trabalho apontam para a importância de mais estudos sobre o loco +3003 no câncer de próstata. Também é necessário avaliar distintas populações humanas para esclarecer se as associações observadas no presente estudo aplicam-se a populações de diferentes origens étnicas ou geográficas.

Uma vez que nosso estudo de polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* forneceu indícios da influência do HLA-G na suscetibilidade ao câncer de próstata, partimos para uma abordagem funcional. Caracterizamos o padrão de expressão da proteína HLA-G em tecidos de próstata de homens brasileiros com câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. Foram avaliadas áreas de tecido com CaP, com HPB e áreas não tumorais das próstatas dos pacientes. Os tecidos não tumorais (saudáveis/normais) foram considerados como controle nas análises. Para cada indivíduo estudado, uma área de tecido canceroso/hiperplásico (com CaP ou HPB) e uma de tecido saudável foram avaliadas. Devido a limitações de disponibilidade amostral, os pacientes

investigados quanto à expressão proteica de HLA-G não correspondem aos da análise de polimorfismos do gene *HLA-G*, com exceção de 1 indivíduo com CaP.

Através da técnica de imunohistoquímica e do uso de um anticorpo monoclonal (4H84) capaz de reconhecer todas as isoformas de HLA-G em humanos, caracterizamos de modo semi-quantitativo o perfil de expressão da proteína HLA-G nas amostras avaliadas. Nos tecidos prostáticos, vimos que as moléculas HLA-G localizam-se no citoplasma das células do epitélio glandular de maneira bem específica, na região apical da célula, próxima ao núcleo. Estes resultados corroboram dados prévios de Langat e colaboradores (2006), onde tecidos com CaP (n = 5), HPB (n = 5) e tecidos normais da próstata (n = 5) foram avaliados quanto à expressão de quatro isoformas de HLA-G (Langat *et al.*, 2006). Utilizando um conjunto de três anticorpos, eles avaliaram isoladamente a expressão das isoformas HLA-G1, HLA-G2/-G6 e HLA-G5. Dentre estas, apenas a expressão de HLA-G5 foi detectada nos tecidos de próstata. Até o momento, esse é o único estudo publicado em que a proteína HLA-G é avaliada em tecido de próstata com câncer e normal. Quanto à expressão da molécula HLA-G em HPB, além do trabalho recém mencionado, há o estudo de Larsen e colaboradores (2011) em que foram avaliados sete tecidos com HPB, dentre diferentes tecidos do sistema reprodutivo masculino e de amostras de líquido seminal. Estes são os únicos dados disponíveis na literatura científica sobre expressão proteica de HLA-G no contexto das condições prostáticas.

Em nosso trabalho, destacamos a observação de um perfil distinto de expressão de HLA-G entre as áreas teciduais da próstata com CaP, HPB e não tumorais. Nas áreas teciduais com câncer de próstata, a proteína HLA-G não só mostrou-se presente em todos os casos, como foi altamente expressa na maioria deles (em 30 de 33). Encontramos indícios de que as células cancerosas da próstata podem apresentar um mecanismo de escape da vigilância imunológica e da resposta imune antitumoral pela expressão de HLA-G. Dentre as isoformas separadamente avaliadas por Langat e colaboradores (2006) em tecidos da próstata (HLA-G1, -G2/-G6 e -G5), a única proteína detectada foi HLA-G5, embora o mRNA de todas elas estivesse presente nos tecidos. Eles reportam que em tecidos com CaP, a isoforma solúvel HLA-G5 é expressa principalmente nas secreções prostáticas contidas no lúmen glandular e sua expressão

é quase ausente no epitélio glandular (Langat *et al.*, 2006). Levando em conta diversos tipos de cânceres, é comum haver variações na frequência de expressão do HLA-G, e mesmo quando um determinado tipo de câncer é avaliado em diferentes trabalhos (Curigliano *et al.*, 2013). Questões metodológicas poderiam explicar tais variações (Curigliano *et al.*, 2013, Singer *et al.*, 2013, Miranda *et al.*, 2015). No presente trabalho, também observamos alta expressão de HLA-G (intensa e difusa) no tecido com CaP de um paciente com genótipo +3003CC (rs1707). Este resultado é interessante, visto que em um trabalho anterior de nosso grupo houve associação da variante genética +3003 do *HLA-G* e suscetibilidade ao CaP (Zambra *et al.*, 2016). Conforme já discutido, a possível relação do alelo +3003C com alto nível de expressão do HLA-G poderia favorecer o desenvolvimento do câncer. Até o momento, temos apenas uma observação nesse sentido, de forma que esta questão precisa ser investigada.

Quanto à próstata com hiperplasia benigna, vimos que o HLA-G não foi expresso na maioria dos casos (em 12 de 20) ou apresentou baixo nível de expressão (nos 8 casos restantes). Estes resultados corroboram dados dos únicos dois estudos que avaliam HLA-G em HPB (Langat *et al.*, 2006, Larsen *et al.*, 2011). Já nas áreas teciduais não tumorais da próstata, verificamos majoritária ausência de expressão proteica de HLA-G (em 50 de 53 casos). No estudo previamente mencionado de Langat e colaboradores (2006), a expressão das isoformas HLA-G1 e -G2/-G6 foi ausente em todos os tipos teciduais da próstata avaliados. Contudo, foi reportada forte expressão de HLA-G5 no epitélio glandular dos tecidos normais da próstata e em algumas secreções prostáticas destes mesmos tecidos (Langat *et al.*, 2006). É importante ressaltar que o tamanho amostral avaliado por estes pesquisadores foi bastante reduzido, apenas 5 amostras de cada tipo tecidual, enquanto no presente trabalho foram avaliadas áreas de tecidos não tumorais da próstata de 53 indivíduos. A expressão proteica de HLA-G já foi avaliada em inúmeros tipos de lesões malignas e detectada na maioria dos tecidos com câncer, mas raramente nos tecidos saudáveis adjacentes ao tumor (Moreau *et al.*, 2009, Rouas-Freiss *et al.*, 2014). Na próstata, um achado muito comum em tecido benigno, hiperplásico e maligno é o indício histológico de inflamação crônica (De Marzo *et al.*, 2007, Alcaraz *et al.*, 2009, De Nunzio *et al.*, 2011, Zambra *et al.*, 2013). Inflamação na próstata pode ocorrer, por exemplo, em

função de refluxo urinário, infecções bacterianas ou fúngicas, fatores hormonais e dieta (De Nunzio *et al.*, 2011). Esta questão torna-se relevante visto que um ambiente inflamatório pode levar à expressão de HLA-G. A interleucina (IL)-10, por exemplo, é uma citocina que representa um estímulo anti-inflamatório capaz de induzir e aumentar a expressão de HLA-G (Moreau *et al.*, 1999, Ongaro *et al.*, 2010, Fainardi *et al.*, 2011, Amiot *et al.*, 2011, Rouas-Freiss *et al.*, 2014). Assim, dados controversos quanto à expressão de HLA-G na próstata podem ser uma consequência de características intrínsecas da amostra avaliada em cada estudo ou mesmo da metodologia empregada, como a utilização de anticorpos distintos.

Conforme discutido, a expressão de HLA-G é conhecida por gerar um estado de tolerância imunológica. Uma das consequências de tal expressão é a mudança no balanço das citocinas, com polarização para um perfil Th2 (Kapasi *et al.*, 2000, Kanai *et al.*, 2001, Fainardi *et al.*, 2011). Citocinas são proteínas solúveis produzidas por diversos tipos de células, do sistema imune ou não, capazes de mediar interações entre os diversos tipos celulares no organismo (Dranoff, 2004, Perambakam *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2009, Abbas *et al.*, 2011). Citocinas são importantes reguladoras e mediadoras do sistema imunológico. A síntese de determinada citocina ocorre a partir da ativação celular, que então leva à transcrição gênica (Abbas *et al.*, 2011). Por contribuírem para a determinação da resposta imune através de seus efeitos, a modulação do perfil de citocinas representa um impacto considerável sobre condições fisiológicas e patológicas (Fainardi *et al.*, 2011). Muitos estudos vêm demonstrando que um perfil de citocinas Th2, marcado pela presença de citocinas imunossupressoras, como a IL-4, IL-6 e IL-10, pode favorecer o desenvolvimento do câncer (Kidd, 2003, Miller & Pisa, 2007). Já um perfil de citocinas Th1, incluindo IL-2 e IFN- γ , pode potencializar a resposta imune antitumoral, e este tem sido associado com bom prognóstico para vários tipos de cânceres, como o de próstata, mama, ovário e melanoma (Dunn *et al.*, 2006, Haabeth *et al.*, 2011, Galon *et al.*, 2013, Smyth *et al.*, 2016). Além disso, citocinas Th17, como a IL-17A, parecem ser relevantes para o desenvolvimento inicial do câncer, crescimento e metástase (Martin-Orozco & Dong, 2009, Sakurai *et al.*, 2016). Já foi observado em várias linhagens celulares e em células sanguíneas mononucleares que fatores secretados no microambiente tumoral podem

modular a transcrição e a expressão proteica de HLA-G. Tais fatores incluem citocinas, anti- e pró-inflamatórias, como IL-10, interferon (IFN)- α , - β , - γ e IL-1 β (Moreau *et al.*, 2009, Carosella *et al.*, 2015).

Nesse contexto, caracterizamos o perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 no soro de pacientes com câncer de próstata, hiperplasia prostática benigna e em indivíduos controle (saudáveis). A concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A foi dosada para cada indivíduo. Pacientes com câncer de próstata diferenciaram-se dos homens saudáveis por apresentarem distinto perfil de citocinas. Os níveis de IL-10 e TNF- α foram significativamente maiores nesses pacientes. Com relação à IL-10, nossos resultados corroboram dados de inúmeros estudos que mostram níveis elevados desta citocina em diferentes tipos de cânceres, incluindo o de próstata. Tal expressão frequentemente está associada com o desenvolvimento e progressão do câncer (Miller & Pisa, 2007, Tazaki *et al.*, 2011, Sato *et al.*, 2011). Porém, sabe-se que esta citocina anti-inflamatória pode apresentar um papel duplo no desenvolvimento tumoral. A expressão elevada de IL-10 pode, dentre outros efeitos, levar à supressão da resposta imune Th1, promover o escape das células tumorais da vigilância imunológica e assim favorecer o desenvolvimento do câncer (Khong & Restifo, 2002, Mocellin *et al.*, 2005, Zabaleta *et al.*, 2008, Tazaki *et al.*, 2011). Por outro lado, a expressão desta mesma interleucina também pode estar associada com melhor prognóstico dos pacientes e com uma redução da angiogênese, podendo limitar o desenvolvimento e a progressão do câncer (Huang *et al.*, 1999, Zabaleta *et al.*, 2008). No câncer de próstata, o papel da IL-10 ainda é controverso (Stearns *et al.*, 1999, Filella *et al.*, 2000, McCarron *et al.*, 2002, Michaud *et al.*, 2006, Miller & Pisa, 2007, Faupel-Badger *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2009, Salman *et al.*, 2012, Bhavsar *et al.*, 2014). Níveis elevados de IL-10 já foram observados no soro de pacientes com CaP avançado (com caquexia) em comparação com indivíduos saudáveis, sendo sugerida uma possível contribuição da IL-10 para o desenvolvimento do CaP (Tazaki *et al.*, 2011). Vale destacar que a IL-10 é um dos principais fatores capazes de induzir e elevar a expressão proteica de HLA-G nas células cancerosas humanas (Urosevic & Dummer, 2003, Fainardi *et al.*, 2011). Ao mesmo tempo, a expressão de HLA-G também pode levar ao aumento da secreção de IL-10 (Carosella *et al.*, 2015, Huang *et al.*, 2009).

Conforme previamente descrito, numa população distinta da avaliada para citocinas, detectamos elevada expressão de HLA-G na maioria dos tecidos com CaP. Já na maioria das áreas não tumorais de tecidos de próstata, a expressão de HLA-G foi ausente. Até o momento, não há estudos sobre CaP e HPB em que seja investigada a possível correlação entre IL-10 ou outras citocinas e HLA-G. Contudo, nosso conjunto de dados fornece indícios da influência da IL-10 no desenvolvimento do câncer de próstata, com possível efeito na tolerância imunológica. Quanto ao TNF- α , os indivíduos com CaP também apresentaram maiores níveis séricos que os homens saudáveis. A expressão elevada desta citocina pró-inflamatória tem sido reportada em vários cânceres humanos, incluindo o de próstata (de Miguel *et al.*, 2000, Michalaki *et al.*, 2004, Tazaki *et al.*, 2011). Assim como a IL-10, o TNF- α também pode apresentar um duplo papel no desenvolvimento do câncer (Chu, 2013, Stark *et al.*, 2015). Em vários estudos tem sido observado elevado nível sérico de TNF- α em pacientes com CaP avançado em comparação com controles, sendo este associado com a progressão da doença (Pfitzenmaier *et al.*, 2003, Perambakam *et al.*, 2005, Michalaki *et al.*, 2004, Tazaki *et al.*, 2011). Porém, em um estudo foi observado menor nível de TNF- α no plasma de pacientes com CaP em comparação com controles, com o aumento de TNF- α sendo correlacionado com menor risco de CaP (Bhavsar *et al.*, 2014). Como o papel do TNF- α é complexo e ainda controverso no CaP, mais estudos são necessários para esclarecer este cenário. Nossos dados sobre TNF- α e IL-10 indicam que tal perfil de citocinas possivelmente favorece o desenvolvimento do CaP, podendo ser útil na diferenciação entre estes pacientes e indivíduos saudáveis.

Os pacientes com HPB aqui estudados apresentaram maiores níveis séricos de IFN- γ que indivíduos com CaP. Esta é uma citocina pró-inflamatória reconhecida por ter efeito antitumoral (Tazaki *et al.*, 2011). Este resultado faz sentido nessa condição prostática hiperproliferativa, pois sabe-se que o IFN- γ pode estimular a proliferação de células estromais (Kramer *et al.*, 2002) e epiteliais de HPB *in vitro* (Deshpande *et al.*, 1989). A proliferação de células da próstata hiperplásica *in vitro* também pode ocorrer sob a influência das citocinas IFN- γ e IL-17 secretadas por células T (Penna *et al.*, 2009; Bardan *et al.*, 2015). Assim, é possível que estas duas citocinas influenciem na proliferação celular que ocorre na HPB *in vivo*. Em nosso estudo, também observamos

maiores níveis séricos de IL-17A em pacientes com HPB em comparação com indivíduos com CaP e com homens saudáveis. Foi reportado que IL-17 pode ser expressa por células epiteliais de HPB e abundantemente expressa por células T ativadas de próstata hiperplásica *in vitro*. Além da influência local da IL-17 na HPB, também é sugerida uma influência sistêmica (Steiner *et al.*, 2003), o que é sustentado por nossos resultados. Como anteriormente mencionado, avaliando indivíduos distintos, encontramos em tecidos de HPB a ausência ou baixa expressão da proteína HLA-G, enquanto na maioria dos tecidos com CaP foi observada alta expressão de HLA-G. O aumento do nível de IFN- γ já foi correlacionado com a diminuição do nível de HLA-G solúvel em pacientes com rinite alérgica após tratamento com uma imunoterapia que induz a polarização para uma resposta imune Th1 (Ciprandi *et al.*, 2008). O perfil de citocinas marcado por IFN- γ e IL-17A indica que pacientes com HPB diferem dos pacientes com CaP por apresentarem um perfil pró-inflamatório que parece estar relacionado ao processo hiperproliferativo benigno que ocorre na próstata hiperplásica. É interessante que novos estudos sejam realizados para revelar a potencial relação entre IFN- γ e HLA-G no CaP e HPB.

O entendimento atual sobre a carcinogênese é em grande parte baseado no estudo de tumores malignos, enquanto os tumores benignos recebem pouca atenção. Os tumores benignos possuem várias características em comum com o câncer, mas a maioria deles não progride para a malignidade, como é o caso da HPB. Assim, torna-se relevante identificar diferenças entre câncer e tumores benignos (Marino-Enriquez & Fletcher, 2014). No presente trabalho, merece destaque a avaliação de três condições prostáticas distintas: câncer, hiperplasia benigna e próstata saudável. Nossa principal limitação foi o uso de diferentes grupos amostrais entre as abordagens realizadas, o que impediu o estabelecimento de uma correlação direta entre dados genéticos e de expressão. No entanto, é válido ressaltar que os grupos amostrais (nas 3 abordagens) passaram pelo mesmo critério de seleção e que todos os homens saudáveis (controles) eram controlados especificamente para CaP e HPB através de avaliação clínica. Os resultados obtidos até o momento são relevantes e nos motivam a dar continuidade ao estudo. Como próximos passos, pretendemos investigar a possível relação do SNP +3003 com níveis diferenciais de expressão proteica de HLA-G. Dentre os indivíduos estudados

quanto ao perfil de citocinas, a maioria deles (17 CaP, 39 HPB e todos os 22 controles), tiveram seu DNA genotipado no estudo de polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G*. Com isso, pretendemos avaliar no soro destes indivíduos o nível da proteína HLA-G solúvel e correlacionar estes dados com a informação genética disponível. Além disso, também poderíamos correlacionar o perfil de expressão de HLA-G solúvel com o perfil de citocinas já avaliado, verificando uma possível influência sistêmica do *HLA-G* no perfil imunológico dos pacientes. A diferença quanto ao perfil de HLA-G solúvel entre CaP, HPB e condição saudável teria uma potencial aplicação como método diagnóstico. Outra perspectiva é, a partir das amostras de tecido de próstata já avaliadas quanto à expressão proteica de HLA-G, avaliar a expressão gênica do *HLA-G* (pela análise do RNA mensageiro), bem como a expressão de microRNAs que potencialmente possam regular a expressão deste gene. A correlação entre estes dados (expressão proteica e de mRNA de HLA-G e miRNAs) pode revelar mecanismos de regulação da expressão gênica do *HLA-G* nas condições prostáticas.

De modo geral, os dados sobre polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* e sobre a expressão proteica do HLA-G em tecidos da próstata são concordantes e fornecem indícios da influência do HLA-G no desenvolvimento do câncer de próstata. Aliando o conhecimento sobre o perfil de expressão proteica do HLA-G ao de citocinas em pacientes com CaP, temos indícios de um perfil local e sistêmico potencialmente relacionado à tolerância imunológica, capaz de favorecer o desenvolvimento deste tipo de câncer. Já em HPB, ambos os perfis parecem apontar para maior responsividade do sistema imune nessa condição que, apesar de tumoral, é benigna. O melhor entendimento dos fatores que moldam a resposta imune para um perfil pró ou antitumoral é crítico para o melhor gerenciamento da doença e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

- Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS (2011) *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 592p.
- Agarwal N, Padmanabh S and Vogelzang NJ (2012) Development of Novel Immune Interventions for Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer*, 10(2):84-92.
- Alcaraz A, Hammerer P, Tubaro A, Schröder FH and Castro R (2009) Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur Urol*, 55(4):864-73.
- Algarra I, Cabrera T and Garrido F (2000) The HLA crossroad in tumour immunology. *Human Immunol*, 61(1):65-73.
- Amiot L, Ferrone S, Grosse-Wilde H and Seliger B (2011) Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci*, 68:417–431.
- Bardan R, Dumache R, Dema A, Cumpas A and Bucuras V. The role of prostatic inflammation biomarkers in the diagnosis of prostate diseases. *Clin Biochem* 2014;47:909-915.
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2): 215–233.
- Bhavsar NA, Bream JH, Meeker AK, Drake CG, Peskoe SB, Dabitaio D, De Marzo AM, Isaacs WB and Platz EA (2014) A peripheral circulating TH1 cytokine profile is inversely associated with prostate cancer risk in CLUE II. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23:2561-2567.
- Buonaguro L, Petrizzo A, Tornesello ML and Buonaguro FM (2011) Translating tumor antigens into cancer vaccines. *Clin Vaccine Immunol*, 18(1):23-34.
- Cannistraci A, Di Pace AL, De Maria R and Bonci D (2014) MicroRNA as new tools for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention: results from clinical data set and patients' samples. *Biomed Res Int*, 2014:146170.

- Carlini F, Traore K, Cherouat N, Roubertoux P, Buhler S, Cortey M, Simon S, Doumbo O, Chiaroni J, Picard C and Di Cristofaro J (2013) HLA-G UTR haplotype conservation in the Malian population: association with soluble HLA-G. *PLoS One*, 8:e82517.
- Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J and Rouas-Freiss N (2003) HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol*, 81:199-252
- Carosella ED, HoWangYin KY, Favier B and LeMaoult J (2008a) HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance. *Hum Immunol*, 69(11):700-7.
- Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P and Lemaoult J (2008b) Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 2008, 111(10):4862-70.
- Carosella ED, Rouas-Freiss N, Roux DT, Moreau P and LeMaoult J (2015) HLA-G: an immune checkpoint molecule. *Adv Immunol*, 127: 33–144.
- Carter HB and Partin AW (2002) Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Walsh: *Campbell's Urology*, 8th edition: WB Saunders p. 3055-3064.
- Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Giuliani S, Carosella ED and Donadi EA (2009) In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol*, 70(12):1020-5.
- Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NHS, de Albuquerque RS, Muniz YCN, Simões RT, Carosella ED, Moreau P and Donadi EA (2010) The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun*, 11:134-141.
- Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Roger M, Moreau P and Donadi EA (2011) A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol*, 28:3069–86.

- Castelli EC, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Moreau P and Donadi EA (2014a) Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. *J Immunol Res*, 2014: 734068.
- Castelli EC, Ramalho J, Porto IO, Lima TH, Felício LP, Sabbagh A, Donadi EA and Mendes-Junior CT (2014b) Insights into HLA-G genetics provided by worldwide haplotype diversity. *Front Immunol*, 5:476.
- Chu WM (2013) Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*, 328:222-5.
- Ciprandi G, Continia P, Fenoglio D, Sormani MP, Negrini S, Puppo F and Indiveri F (2008) Relationship between soluble HLA-G and HLA-A,-B,-C serum levels, and interferon-gamma production after sublingual immunotherapy in patients with allergic rhinitis. *Hum Immunol*;69:409-413.
- Curigliano G, Criscitiello C, Gelao L and Goldhirsch A (2013) Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clin Cancer Res*, 19(20):5564-71.
- Deshpande N, Hallows RC, Cox S, Mitchell I, Hayward S and Towler JM (1989) Divergent effects of interferons on the growth of human benign prostatic hyperplasia cells in primary culture. *J Urol*, 141:157–160.
- DATASUS. Sistema de Informações Sobre Mortalidade. Departamento de Informática do SUS, <http://datasus.saude.gov.br/> (Agosto 25, 2014).
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB and Nelson WG (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 7(4):256-69.
- de Miguel MP, Royuela M, Bethencourt FR, Santamaría L, Fraile B and Paniagua R (2000) Immunoexpression of tumour necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2 correlates with proliferation/apoptosis equilibrium in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *Cytokine*, 12:535-538.
- De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, Sciarra A and Tubaro A (2011) The controversial relationship between benign prostatic

hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol*, 60(1):106-17.

Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D and Moreau P (2011) Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci*, 68(3):369-95.

Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4:11–22.

Dunn GP, Ikeda H, Bruce AT, Koebel C, Uppaluri R, Bui J, Chan R, Diamond M, White JM, Sheehan KC and Schreiber RD (2005) Interferon-gamma and cancer immunoediting. *Immunol Res*, 32:231–245.

Ekman P (2000) The prostate as an endocrine organ: Androgens and estrogens. *Prostate Suppl*, 10:14-18.

Ellis SA, Sargent IL, Redman CW and McMichael AJ (1986) Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology*, 59:595-601.

Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL and Committee IG (2005) The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 29(9):1228–1242.

Epstein JI (2010) An update of the Gleason grading system. *J Urol*, 183(2):433-40.

Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR and Humphrey PA; Grading Committee (2016) The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*, 40(2):244-252.

Fainardi E, Castellazzi M, Stignani M, Morandi F, Sana G, Gonzalez R, Pistoia V, Baricordi OR, Sokal E and Peña J (2011) Emerging topics and new perspectives on HLA-G. *Cell Mol Life Sci*, 68:433-451.

- Faupel-Badger JM, Kidd LC, Albanes D, Virtamo J, Woodson K and Tangrea JA (2008) Association of IL-10 polymorphisms with prostate cancer risk and grade of disease. *Cancer Causes Control*, 19:119–124.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D and Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5):E359-86.
- Filella X, Alcover J, Zarco MA, Beardo P, Molina R and Ballesta AM (2000) Analysis of type T1 and T2 cytokines in patients with prostate cancer. *Prostate*, 44:271–274.
- Foster CS (2000) Pathology of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl*, 9:4-14.
- Frydenberg M, Lawrentschuk N. Benign Prostate Disorders. [Updated 2012 Mar 1]. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279008/>
- Galon J, Angell HK, Bedognetti D and Marincola FM (2013) The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity*, 39:11–26.
- Gan LH, Huang LF, Zhang X, Lin A, Xu DP, Wang Q, Wang TJ and Yan WH (2010) Tumor-specific upregulation of human leukocyte antigen-G expression in bladder transitional cell carcinoma. *Hum Immunol*, 71(9):899-904.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M and Stern PL (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*, 18(2): 89-95.
- Geraghty DE, Koller BH and Orr HT (1987) A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(24):9145-9.
- Gleason DF and Mellinger GT (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*, 111:58–64.

- Goldstraw MA, Fitzpatrick JM and Kirby RS (2007) What is the role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer? *BJU Int*, 99(5):966-8.
- Gordetsky J and Epstein J (2016) Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications. *Diagn Pathol*, 11(1):25.
- Gronberg H (2003) Prostate cancer epidemiology. *Lancet*, 361(9360):859–64.
- Haabeth OA, Lorvik KB, Hammarström C, Donaldson IM, Haraldsen G, Bogen B and Corthay A (2011) Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature Commun*, 2:240.
- Hassan O, Ahmad A, Sethi S and Sarkar FH (2012) Recent updates on the role of microRNAs in prostate cancer. *J Hematol Oncol*, 5:9.
- He X, Dong DD, Yie SM, Yang H, Cao M, Ye SR, Li K, Liu J and Chen J (2010) HLA-G expression in human breast cancer, implications for diagnosis and prognosis; and effect on alloctotoxic lymphocyte response after hormone treatment in vitro. *Ann Surg Oncol*, 17(5):1459-69.
- Higano CS, Small EJ, Schellhammer P, Yasothan U, Gubernick S, Kirkpatrick P and Kantoff PW (2010) Sipuleucel-T. *Nat Rev Drug Discov*, 9(7):513-4.
- Huang S, Ullrich SE and Bar-Eli M (1999) Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. *J. Interferon Cytokine Res*, 19:697–703.
- Huang YH, Zozulya AL, Weidenfeller C, Schwab N and Wiendl H (2009) T cell suppression by naturally occurring HLA-G-expressing regulatory CD4+ T cells is IL-10-dependent and reversible. *Journal of Leukocyte Biology*, 86:273–281.
- Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH and Ober C (2005) HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J*, 19(7):681-93.
- Hviid TV (2015) Human Leukocyte Antigen-G Within the Male Reproductive System: Implications for Reproduction. *Adv Exp Med Biol*, 868:171-90.
- Instituto Nacional de Câncer (INCA), (Março 21, 2016).

- Instituto Nacional de Câncer (INCA), <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016> (Março 21, 2016).
- International Agency for Research on Câncer (IARC), http://www-dep.iarc.fr/CIN_resources (Setembro 15, 2010).
- Jacobs B and Ullrich E (2012) The Interaction of NK Cells and Dendritic Cells in the Tumor Environment: How to Enforce NK Cell & DC Action Under Immunosuppressive Conditions? *Curr Med Chem*, 19(12):1771-9.
- Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A and Taketani Y (2001) Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol Hum Reprod*, 7:195–200.
- Kapasi K, Albert SE, Yie S, Zavazava N and Librach CL (2000) HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology*, 101:191–200.
- Kesarwani P and Mittal RD (2010) Association of Pro/Anti-inflammatory Cytokine Gene Polymorphisms with Benign Prostate Hyperplasia Risk. *Ind J Clin Biochem*, 25(4):342–348.
- Khong HT and Restifo NP (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol*, 3:999–1005.
- Kidd P (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Ver*, 8:223–246
- Kirby RS (2000) The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? *Urology*, 56(5 Suppl 1):3-6.
- Klotz L and Emberton M (2014) Management of low risk prostate cancer: active surveillance and focal therapy. *Curr Opin Urol*, 24(3):270-9.
- Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ and DeMars R (1990) A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*, 248(4952):220-3.

- Kramer G, Steiner GE, Handisurya A, Stix U, Haitel A, Knerer B, Gessl A, Lee C, Marberger M (2002) Increased expression of lymphocyte-derived cytokines in benign hyperplastic prostate tissue, identification of the producing cell types, and effect of differentially expressed cytokines on stromal cell proliferation. *Prostate*, 52(1):43-58.
- Kryvenko ON and Epstein JI (2016) Prostate Cancer Grading: A Decade After the 2005 Modified Gleason Grading System. *Arch Pathol Lab Med*. [Epub ahead of print]
- Kunz GM Jr and Epstein JI (2003) Should each core with prostate cancer be assigned a separate gleason score? *Hum Pathol*, 34(9):911–914.
- Lampen MH and van Hall T (2011) Strategies to counteract MHC-I defects in tumors. *Curr Opin Immunol*, 23(2):293-8.
- Langat DK, Sue Platt J, Tawfik O, Fazleabas AT and Hunt JS (2006) Differential expression of human leukocyte antigen-G (HLA-G) messenger RNAs and proteins in normal human prostate and prostatic adenocarcinoma. *J Reprod Immunol*, 71(1):75-86.
- Larsen MH, Bzorek M, Pass MB, Larsen LG, Nielsen MW, Svendsen SG, Lindhard A and Hviid TV (2011) Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. *Mol Hum Reprod*, 17(12):727-38.
- Lefort A e Almeida JC (2004) Câncer de próstata: a importância das campanhas de prevenção. Monografia de especialização, Belo Horizonte, MG.
- Li BL, Lin A, Zhang XJ, Zhang X, Zhang JG, Wang Q, Zhou WJ, Chen HX, Wang TJ and Yan WH (2009) Characterization of HLA-G expression in renal cell carcinoma. *Tissue Antigens*, 74(3):213-21.
- Lin A, Chen HX, Zhu CC, Zhang X, Xu HH, Zhang JG, Wang Q, Zhou WJ and Yan WH (2010a) Aberrant human leucocyte antigen-G expression and its clinical relevance in hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med*, 14(8):2162-71.
- Lin A, Zhu CC, Chen HX, Chen BF, Zhang X, Zhang JG, Wang Q, Zhou WJ, Hu W, Yang HH, Xu HH and Yan WH (2010b) Clinical relevance and functional implications for

human leukocyte antigen-G expression in non-small-cell lung cancer. *J Cell Mol Med*, 14(9):2318-29.

Omlin A and de Bono JS (2012) Therapeutic Options for Advanced Prostate Cancer: 2011 Update. *Curr Urol Rep*, 13(2):170-8.

Ongaro A, Stignani M, Pellati A, Melchiorri L, Massari L, Caruso G, Baricordi OR and Rizzo R (2010) Human leukocyte antigen-G molecules are constitutively expressed by synovial fibroblasts and upmodulated in osteoarthritis. *Hum Immunol*, 71(4):342-50.

Manaster I, Goldman-Wohl D, Greenfield C, Nachmani D, Tsukerman P, Hamani Y, Yagel S and Mandelboim O (2012) MiRNA-Mediated Control of HLA-G Expression and Function. *PLoS One*, 7(3):e33395.

Marino-Enriquez A and Fletcher CDM (2014) Shouldn't we care about the biology of benign tumours? *Nat Rev Cancer*, 14:701–2.

Martelli-Palomino G, Pancotto JA, Muniz YC, Mendes-Junior CT, Castelli EC, Massaro JD, Krawice-Radanne I, Poras I, Rebmann V, Carosella ED, Rouas-Freiss N, Moreau P and Donadi EA (2013) Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential HLA-G soluble levels in the Brazilian and French population. *PLoS One*, 8:e71742.

Martin-Orozco N and Dong C (2009) The IL-17/IL-23 axis of inflammation in cancer: friend or foe? *Curr Opin Investig Drugs*, 10:543–549.

McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, Southgate C, Easton DF, Eeles RA and Howell WM (2002) Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res*, 62:3369–3372.

McNeal J (1990) Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol Clin North Am*, 17:477.

McVary KT, Roehrborn CG, Avins AL, Barry MJ, Bruskewitz RC, Donnell RF, Foster HE Jr, Gonzalez CM, Kaplan SA, Penson DF, Ulchaker JC and Wei JT (2011) Update on

AUA guideline on the management of benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 185(5):1793-803.

Michalaki V, Syrigos K, Charles P and Waxman J (2004) Serum levels of IL-6 and TNF- α correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer*, 90:2312-2316.

Michaud DS, Daugherty SE, Berndt SI, Platz EA, Yeager M, Crawford ED, Hsing A, Huang WY and Hayes RB (2006) Genetic polymorphisms of interleukin-1B (IL-1B), IL-6, IL-8, and IL-10 and risk of prostate cancer. *Cancer Res*, 66:4525–4530.

Miller AM and Pisa P (2007) Tumor escape mechanisms in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 56: 81–7.

Miranda LN, Reginaldo FP, Souza DM, Soares CP, Silva TG, Rocha KB, Jatobá CA, Donadi EA, Andrade JM, Gonçalves AK and Crispim JC (2015) Greater expression of the human leukocyte antigen-G (HLA-G) and interleukin-17 (IL-17) in cervical intraepithelial neoplasia: analytical cross-sectional study. *Sao Paulo Med J*, 133(4):336-42.

Mocellin S, Marincola FM and Young HÁ (2005) Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol*, 78:1043-1051.

Morandi F, Levreri I, Bocca P, Galleni B, Raffaghello L, Ferrone S, Prigione I and Pistoia V (2007) Human neuroblastoma cells trigger an immunosuppressive program in monocytes by stimulating soluble HLA-G release. *Cancer Res*, 67(13):6433-6441.

Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED and Paul P (1999) IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol*, 11(5):803-11.

Moreau P, Dausset J, Carosella ED and Rouas-Freiss N (2002) Viewpoint on the functionality of the human leukocyte antigen-G null allele at the fetal-maternal interface. *Biol Reprod*, 67(5):1375-8.

Moreau P, Flajollet S and Carosella ED (2009) Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med*, 13(9B):2973-89.

- Packer JR and Maitland NJ (2016) The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta*, pii:S0167-4889(16)30041-6. [Epub ahead of print]
- Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, Avril MF, Dausset J, Guillet JG and Carosella ED (1998) HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:4510-4515.
- Paul P, Cabestré FA, Le Gal FA, Khalil-Daher I, Le Danff C, Schmid M, Mercier S, Avril MF, Dausset J, Guillet JG and Carosella ED (1999) Heterogeneity of HLA-G gene transcription and protein expression in malignant melanoma biopsies. *Cancer Res*, 59(8):1954-1960.
- Penna G, Fibbi B, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Laverny G, Gacci M, Crescioli C, Maggi M, Adorini L (2009) Human benign prostatic hyperplasia stromal cells as inducers and targets of chronic immuno-mediated inflammation. *J Immunol*, 182(7):4056-4064.
- Perambakam SM, Srivastava R and Peace DJ. Distinct cytokine patterns exist in peripheral blood mononuclear cell cultures of patients with prostate cancer (2005) *Clin Immunol*, 117:94-99.
- Pfitzenmaier J, Vessella R, Higano CS, Noteboom JL, Wallace D Jr and Corey E (2003) Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma. *Cancer*, 97:1211-1216.
- Porto IOP, Mendes-Junior CT, Felicio LP, Georg RC, Moreau P, Donadi EA, Chies JA and Castelli EC (2015) MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: a new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. *Mol Immunol*, 65: 230–41.
- Rajarubendra N, Lawrentschuk N, Bolton DM, Klotz L and Davis ID (2011) Prostate cancer immunology – na update for Urologists. *BJU Int*, 107: 1046–51.
- Rebmann V, Wagner S and Grosse-Wilde H (2007) HLA-G expression in malignant melanoma. *Semin Cancer Biol*, 17(6):422-9.

- Reiter RE and Kernion JB (2002) Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In: Walsh: Campbell's Urology, 8th edition: WB Saunders p. 3002-3003.
- Rhodes DA and Trowsdale J (1999) Genetics and molecular genetics of MHC. *Rev Immunogenet*, 1(1):21-31.
- Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P and Marsh SG (2015) The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue):D423-31.
- Roehrborn CG (2005) Benign prostatic hyperplasia: an overview. *Rev Urol*, 7 Suppl 9:S3-S14.
- Rouas-Freiss N, Moreau P, LeMaout J and Carosella ED (2014) The dual role of HLA-G in cancer. *J Immunol Res*, 2014:359748.
- Sabbagh A, Luisi P, Castelli EC, Gineau L, Courtin D, Milet J, Massaro JD, Laayouni H, Moreau P, Donadi EA and Garcia A (2014) Worldwide genetic variation at the 3' untranslated region of the HLA-G gene: balancing selection influencing genetic diversity. *Genes Immun*, 15:95–106.
- Sakurai T, Yoshiga D, Ariyoshi W, Okinaga T, Kiyomiya H, Furuta J, Yoshioka I, Tominaga K and Nishihara T (2016) Essential role of mitogen-activated protein kinases in IL-17A-induced MMP-3 expression in human synovial sarcoma cells. *BMC Res Notes*, 9:68.
- Salman H, Ori Y, Bergman M, Djaldetti M and Bessler H (2012) Human prostate cancer cells induce inflammatory cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells. *Biomed Pharmacother*, 66:330-333.
- Santos KE, Lima TH, Felício LP, Massaro JD, Palomino GM, Silva AC, Oliveira SF, Sabbagh A, Garcia A, Moreau P, Donadi EA, Mendes-Junior CT and Castelli EC (2013) Insights on the HLA-G evolutionary history provided by a nearby Alu insertion. *Mol Biol Evol*, 30(11):2423–34.

- Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ and Selvan SR (2011) Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res*, 51(2-3):170-82.
- Schütt P, Schütt B, Switala M, Bauer S, Stamatis G, Opalka B, Eberhardt W, Schuler M, Horn PA and Rebmann V (2010) Prognostic relevance of soluble human leukocyte antigen-G and total human leukocyte antigen class I molecules in lung cancer patients. *Hum Immunol*, 71(5):489-95.
- Shabbir M and Mumtaz FH (2004) Benign prostatic hyperplasia. *J R Soc Promot Health*, 124(5):222-7.
- Shen MM and Abate-Shen C (2010) Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev*, 24(18):1967-2000.
- Sheu J and Shih IeM (2010) HLA-G and immune evasion in cancer cells. *J Formos Med Assoc*, 109(4):248-57.
- Singer G, Rebmann V, Chen YC, Liu HT, Ali SZ, Reinsberg J, McMaster MT, Pfeiffer K, Chan DW, Wardelmann E, Grosse-Wilde H, Cheng CC, Kurman RJ and Shih IeM (2003) HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res*, 9(12):4460-4.
- Slovin S (2012) Chemotherapy and immunotherapy combination in advanced prostate cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*, 10(2):90-100.
- Smyth MJ, Ngiow SF, Ribas A and Teng MW (2016) Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol*, 13:143-158.
- Stark T, Livas L and Kyprianou N (2015) Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. *Transl Androl Urol*, 4:455-463.
- Stearns ME, Rhim J and Wang M (1999) Interleukin 10 (IL-10) inhibition of primary human prostate cell-induced angiogenesis: IL-10 stimulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 secretion. *Clin Cancer Res*, 5:189-196.

- Steiner GE, Newman ME, Paikl D, Stix U, Memaran-Dagda N, Lee C and Marberger MJ (2003) Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate*, 56:171-182.
- Tang J and Yang J (2009) Etiopathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Indian J Urol*, 25(3):312–317.
- Tazaki E, Shimizu N, Tanaka R, Yoshizumi M, Kamma H, Imoto S, Goya T, Kozawa K, Nishina A and Kimura H (2011) Serum cytokine profiles in patients with prostate carcinoma. *Exp Ther Med*, 2:887-891.
- Urosevic M and Dummer R (2003) HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message. *Semin Cancer Biol*, 13:337-342.
- van Rij S and Gilling P (2015) Recent advances in treatment for Benign Prostatic Hyperplasia. *F1000Res* 2015, 4(F1000 Faculty Rev):1482.
- Veit TD and Chies JA (2009) Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol*, 20(4):229-31.
- Vianna P, Dalmáz CA, Veit TD, Tedoldi C, Roisenberg I and Chies JA (2007) Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Hum Immunol*, 68(8):668-74.
- Yan WH (2011) Human leukocyte antigen-G in cancer: are they clinically relevant? *Cancer Lett*, 311(2):123-30.
- Yie SM and Hu Z (2011) Human leukocyte antigen-G (HLA-G) as a marker for diagnosis, prognosis and tumor immune escape in human malignancies. *Histol Histopathol*, 26(3):409-20.
- Zabaleta J, Lin HY, Sierra RA, Hall MC, Clark PE, Sartor OA, Hu JJ and Ochoa AC (2008) Interactions of cytokine gene polymorphisms in prostate cancer risk. *Carcinogenesis*;29:573-578.

- Zambra FM, Biolchi V, Brum IS and Chies JA (2013) CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Hum Immunol*, 74(8):1003-8.
- Zambra FM, Biolchi V, de Cerqueira CC, Brum IS, Castelli EC and Chies JA (2016) Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia - the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk. *HLA*, 87(2):79-88.
- Zhu XM, Han T, Wang XH, Li YH, Yang HG, Luo YN, Yin GW and Yao YQ (2010) Overexpression of miR-152 leads to reduced expression of human leukocyte antigen-G and increased natural killer cell mediated cytotoxicity in JEG-3 cells. *Am J Obstet Gynecol*, 202(6):592.e591–597.
- Zhu CB, Wang CX, Zhang X, Zhang J and Li W (2011) Serum sHLA-G levels, a useful indicator in distinguishing colorectal cancer from benign colorectal diseases. *Int J Cancer*, 128(3):617-22.
- Wang Y, Ye Z, Meng XQ and Zheng SS (2011) Expression of HLA-G in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 10(2):158-63.
- Wang MH, Helzlsouer KJ, Smith MW, Hoffman-Bolton JA, Clipp SL, Grinberg V, De Marzo AM, Isaacs WB, Drake CG, Shugart YY and Platz EA (2009) Association of IL10 and other immune response - and obesity - related genes with prostate cancer in CLUE II. *Prostate*, 69:874-885.
- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Bornemann A, Meyermann R, Weiss EH, Melms A and Weller M (2002) A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape, *J. Immunol*, 168(9):4772–4780.

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Controles

Análise imunogenética e de expressão do *HLA-G* em câncer de próstata

Prezado Senhor

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos e genes) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver câncer de próstata.

Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Para sabermos quais polimorfismos estão associados a esta doença, precisamos conhecer sua frequência em pessoas saudáveis para podermos comparar com os pacientes. Através das perguntas que lhe fizemos, do exame de PSA e de toque retal, consideramos que você tem baixa probabilidade de ter hiperplasia ou câncer de próstata, podendo fazer parte do estudo para a comparação. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas e uma coleta de sangue venoso - 10 mL de sangue. Este procedimento não apresenta risco conhecido para sua saúde, limitando-se apenas aos desconfortos da coleta de sangue. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 8 polimorfismos em um gene importante na regulação do sistema imunológico e resposta imune antitumoral, que podem estar associados ao desenvolvimento da hiperplasia ou do câncer de próstata e à forma como cada condição se apresenta. Também analisaremos a proteína solúvel deste gene e o perfil de citocinas no plasma. Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (neste caso, a cada nova pesquisa realizada o Sr. será contatado para que assine um novo Termo de Consentimento caso deseje participar, e estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver câncer de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o Sr.

() Aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para investigações futuras.

() Não aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para investigações futuras.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e a sua recusa não implicará em prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas e imunológicas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

A pesquisadora responsável por este projeto é a Prof^a. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (laboratório LAGOM, nº 12106, Centro de Pesquisa Experimental, HCPA, telefone 51 33597625 ou Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, UFRGS, 51 33083559). Caso o senhor tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar nos telefones indicados acima. Outras dúvidas podem também ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h no HCPA, telefone 51 33598304.

Local e data _____

Paciente ou responsável (nome legível): _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Controles (Biorrepositório)

Prezado Sr.

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver hiperplasia benigna da próstata. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Para sabermos quais polimorfismos estão associados a esta doença, precisamos conhecer sua frequência em pessoas saudáveis para podermos comparar com os pacientes. Através das perguntas que lhe fizemos, do exame de PSA e de toque retal, consideramos que você tem baixa probabilidade de ter hiperplasia ou câncer de próstata, podendo fazer parte do estudo para a comparação. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso - 10 mL de sangue. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 2 polimorfismos em genes responsáveis pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata, que podem estar associados ao desenvolvimento da hiperplasia ou do câncer e à forma como ele se apresenta. Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos também serão apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver câncer de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o Sr.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e a sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de

coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são Prof^a. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, o Dr. Brasil Silva Neto, e o Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 33168286, 99161005, 99969044, 33163671), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data _____

Paciente ou responsável (nome): _____

Assinatura: _____

ANEXO III

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Pacientes HPB/CaP

Análise imunogenética e de expressão do *HLA-G* em câncer de próstata

Prezado Senhor _____

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de tumores prostáticos. Dentre as doenças prostáticas, a hiperplasia prostática benigna (aumento da próstata) e o câncer de próstata apresentam alta incidência na população. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da próstata e levar à formação destes tumores.

Como o senhor tem o diagnóstico de _____ (hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata) e lhe foi recomendada cirurgia para a retirada da glândula, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em uma coleta de amostra de sangue e a permitir que após a retirada da peça cirúrgica três pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético (análise da expressão de genes e proteínas). O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após o término da cirurgia, e este procedimento não apresenta risco adicional conhecido para sua saúde, limitando-se aos procedimentos que já serão usados em sua cirurgia.

Quanto à coleta sanguínea, o Sr. será submetido à coleta de 10 mL de sangue venoso, hoje, após lhe explicarmos este termo de compromisso e o senhor assiná-lo ou então no dia da cirurgia, com o objetivo de realizar dosagens de fatores imunológicos. Os riscos envolvidos com essa coleta são os inerentes ao procedimento, sendo a ocorrência de pequenos hematomas (manchas roxas) a alteração mais comum.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras de sangue e de tecido para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (neste caso, a cada nova pesquisa realizada o Sr. será contatado para que assine

um novo Termo de Consentimento caso deseje participar e estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação de características genéticas específicas de pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

() Aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para investigações futuras.

() Não aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para investigações futuras.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em prejuízo a seu atendimento neste Hospital. Não haverá despesa para sua participação neste projeto. O senhor receberá uma via deste termo de consentimento, sendo que a qualquer momento o seu consentimento em participar deste estudo poderá ser retirado. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

A pesquisadora responsável por este projeto é a Prof^a. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (laboratório LAGOM, nº 12106, Centro de Pesquisa Experimental, HCPA, telefone 51 33597625 ou Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, UFRGS, 51 33083559). Caso o senhor tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar nos telefones indicados acima. Outras dúvidas podem também ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h no HCPA, telefone 51 33598304.

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas e imunológicas que serão feitas. Recebi uma via deste termo de consentimento e também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data: _____

Paciente ou responsável (nome legível): _____

Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura: _____

ANEXO IV

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – HPB

(Biorrepositório)

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) e expressão de genes que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver hiperplasia benigna da próstata. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Como o Sr. tem/teve hiperplasia prostática, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso - 10 mL de sangue - na ocasião de sua entrada no estudo. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 2 polimorfismos em um gene responsável pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata. Caso o Sr. venha a ser encaminhado a cirurgia por hiperplasia prostática, por indicação médica, independente deste trabalho, coletaremos também um fragmento do tecido prostático que será retirado para a análise de outros dois genes que podem estar associados ao desenvolvimento de hiperplasia de próstata e à forma com que ela se apresenta. Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver hiperplasia benigna de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento

de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, o Dr. Brasil Silva Neto e o Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 33168286, 99161005, 99969044, 33163671), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data _____

Paciente ou responsável (nome) _____

Assinatura _____

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – CaP
(Biorrepositório)**

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) e expressão de genes que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver câncer de próstata. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Como o Sr. tem/teve câncer de próstata, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso - 10 mL de sangue - na ocasião de sua entrada no estudo. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 2 polimorfismos em um gene responsável pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata. Caso o Sr. venha a ser encaminhado a cirurgia por câncer de próstata, por indicação médica, independente deste trabalho, coletaremos também um fragmento do tecido prostático que será retirado para a análise de outros dois genes que podem estar associados ao desenvolvimento de câncer de próstata e à forma com que ele se apresenta. Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também

apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver câncer de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, o Dr. Brasil Silva Neto e o Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 33168286, 99161005, 99969044, 33163671), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data _____

Paciente ou responsável (nome) _____

Assinatura _____

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – HPB/CaP
(Biorrepositório)**

Prezado Sr.: Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de tumores prostáticos.

Dentre as doenças prostáticas, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata apresentam alta incidência na população. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da próstata e levar a formação desses tumores. Como o Sr. tem o diagnóstico de _____ (hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata) e lhe foi recomendado cirurgia, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em uma coleta de amostra de sangue no dia da sua cirurgia e a permitir que após retirada da peça cirúrgica dois pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético. O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após o término da cirurgia.

Quanto à coleta sanguínea, o Sr. será submetido à coleta de 10 mL de sangue venoso, no dia da cirurgia, com o objetivo de realizar dosagens hormonais e a identificação de 2 polimorfismos em um gene responsável pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata, que podem estar associados ao desenvolvimento de tumores prostáticos. Os riscos envolvidos com essa coleta são mínimos, sendo a ocorrência de pequenos hematomas/equimoses a alteração mais comum.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras por até 5 anos para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (fone 99969044), o Prof. Dr. Milton Berger (21018286), o Prof. Dr. Walter José Koff e o MsC. Vanderlei Biolchi (fone: 84024050). Caso o Sr. tenha

qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar nos telefones indicados acima. Tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (fone: 21018290).

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data _____

Paciente ou responsável _____

Pesquisador _____



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 140462

Data da Versão do Projeto: 18/08/2014

Pesquisadores:


LMA SIMONE BRUM DA SILVA
FRANCIS MARIA BAO ZAMBRA
JOSÉ ARTUR SOGO CHIES
VANDERLEI BIOLCHI
BRASIL SILVA NETO
MILTON BERGER

Título: Análise Imunogenética e de Expressão do HLA-G em Câncer de Próstata

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 27 de setembro de 2014.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA