

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Efeito de diferentes concentrações de ácido fólico na proliferação de linhagens
tumoriais de próstata**

Arthur de Castro Jorge Silva

Pelotas, 2014

Arthur de Castro Jorge Silva

Efeito de diferentes concentrações de ácido fólico na proliferação de linhagens tumorais de próstata

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Isabel Oliveira de Oliveira

Coorientador: Rafael Bueno Orcy

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S586e

Silva, Arthur de Castro Jorge

Efeito de diferentes concentrações de ácido fólico na proliferação de linhagens tumorais de próstata / Arthur de Castro Jorge Silva. – 36f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientadora Isabel Oliveira de Oliveira ; coorientador Rafael Bueno Orcy.

1.Biotecnologia. 2.Câncer de próstata. 3.Folato.
4.Proliferação.I.Oliveira, Isabel Oliveira de. II.Orcy, Rafael.
III.Título.

CDD: 616.99463

Arthur de Castro Jorge Silva

Efeito de diferentes concentrações de ácido fólico na proliferação de linhagens tumorais de próstata

Trabalho de Conclusão de Curso para aprovação, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 12/12/2014

Banca examinadora:

Prof.^a. Dr.^a Isabel Oliveira de Oliveira, Universidade Federal e Pelotas (orientadora)

Prof. Dr. Rafael Bueno Orcy, Universidade Federal de Pelotas

Msc. Liziane Pereira da Silva, Universidade Federal de Pelotas

“Dedico este trabalho de conclusão de curso ao meu pai, José Antônio, por todo seu amparo, cuidado e apoio; à minha família, por todo suporte e amor incondicional; aos meus amigos por todo o incentivo; à Giana, por toda fé que sempre teve em mim; e a Deus pelo dom da vida.”

Agradecimentos

À Deus por todas as conquistas e sonhos realizados, dificuldades vencidas e metas alcançadas, e por toda trajetória que fiz, e só pude fazê-lo com Sua ajuda.

Ao meu pai, por todo esforço em me sustentar em outra cidade, por seus conselhos que sempre me ajudaram mesmo a 1600 km de distância, por toda sua esperança e fé que ajudaram a me levantar mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha família, que apesar de todos os problemas que ocorreram nesses 5 anos, foram nobres e simpáticos, que sempre me receberam de braços abertos nas poucas vezes que pude visitá-los, e por fazerem parte das melhores lembranças que tenho.

Aos meus amigos de curso: em especial ao Renan, Schuch e Mineiro, pelos melhores seminários que esse curso já viu, pelos trabalhos escritos em muitas madrugadas acompanhadas de boas risadas. Por todas as conversas e gargalhadas durante as aulas e nas diversas festas, como os tradicionais churrascos do curso.

À Giana por me mostrar o que é amor, carinho e paixão. Por demonstrar que ainda existem pessoas maravilhosas no mundo. Por me dar um sorriso nas minhas horas mais escuras, e por me apresentar a uma família maravilhosa que já faz parte de mim.

Aos meus professores, que me ensinaram a paixão pela pesquisa, pela ciência e pelo estudo bem feito, que mesmo possuindo diversas atividades e compromissos sempre puderam me ajudar com dicas e conversas motivadoras.

À CAPES, UFPel e ao governo federal por me proporcionarem um dos melhores anos da minha vida, com o programa Ciência sem Fronteiras.

Muito Obrigado!

O mundo não é um mar de rosas; é um lugar sujo, um lugar cruel, que não quer saber o quanto você é forte. Vai botar você de joelhos e vai deixar de joelhos para sempre se você permitir. Você, eu, ninguém vai bater tão forte como a vida, mas não se trata de bater forte. Se trata de quanto você aguenta apanhar e seguir em frente, o quanto você é capaz de aguentar e continuar tentando. É assim que se consegue vencer.

(Sylvester Stallone, 2006)

Resumo

SILVA, Arthur de Castro Jorge. **Efeito de diferentes concentrações de ácido fólico na proliferação de linhagens tumorais de próstata**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

O folato é um nutriente essencial para humanos. A ausência dessa vitamina na dieta pode levar ao surgimento de diversas doenças, destacando-se as malformações embrionárias. Devido à sua baixa concentração em alimentos consumidos com maior frequência, tornou-se obrigatório nos Estados Unidos o enriquecimento de grãos com ácido fólico, forma sintética e estável do folato. Por outro lado, o seu consumo tem sido relacionado ao desenvolvimento de doenças e tumores. Com base em funções fundamentais sobre as atividades celulares de biossíntese, controle de estabilidade genômica e epigenética, a presença de folato é necessária para a proliferação celular e desse modo sua participação em tumores tornou-se foco de estudo. O câncer de próstata é o segundo mais comum em homens no Brasil e no mundo, atrás apenas dos tumores de pele não melanoma, com estimativa de 1,1 milhão de casos novos no mundo em 2014, e aumento de 60% para 2015. Devido à sua importância na proliferação celular e no controle genômico das células de próstata, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido fólico na proliferação de linhagens tumorais de próstata, LNCaP e PC-3. Células tumorais numa quantidade de 10^4 cel/mL foram distribuídas em placas de 6 poços (1mL/poço) e cultivadas em meio RPMI sem ácido fólico, suplementado com 5% de soro fetal bovino (BBF), penicilina/estreptomicina e, diferentes concentrações de ácido fólico (0, 4, 20 e 100 nM), diluído em SBF. Os tratamentos foram realizados em quadruplicata. Após 96 horas em cultivo, a proliferação das células foi avaliada através de ensaio de MTT. Até o presente momento, não existem resultados disponíveis para apresentação.

Palavras-chave: câncer de próstata; folato; proliferação.

Abstract

SILVA, Arthur de Castro Jorge. **Effect of different concentrations of folic acid in the prostate tumor lines proliferation.** 2014. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Folate is an essential nutrient for humans. The lack of this vitamin in the diet can lead to the emergence of various diseases, especially embryonic malformations. Because of its low concentration in most frequently consumed foods, became mandatory in the United States the enrichment of grains with folic acid, synthetic and stable form of folate. On the other hand, its use has been linked to the development of diseases and tumors. Based on fundamental functions on cellular activities biosynthesis, genomic and epigenetic stability control, the presence of folate is required for cell proliferation and thereby its involvement in tumor became a focus of study. Prostate cancer is the second most common in men in Brazil and in the world, behind only the non-melanoma skin tumors, with an estimated 1.1 million new cases worldwide in 2014, and increase of 60% for 2015. Due its importance in cell proliferation and genomic control of prostate cells, this study aims to evaluate the effect of different folic acid concentrations in the proliferation of tumor cell lines of prostate LNCaP and PC-3. Tumor cells in a quantity of 10^4 cells / ml were distributed in 6-well plates (1 ml / well) and cultured in RPMI without folic acid, supplemented with 5% fetal bovine serum (BBF), penicillin / streptomycin, and different concentrations of folic acid (0, 4, 20 and 100 nM) diluted in PBS. Treatments were performed in quadruplicate. After 96 hours in culture, cell proliferation was assessed by MTT assay. To date, there are no results available for presentation.

Keywords: prostate cancer; folate; proliferation.

Lista de Figuras

Figura 1. Resumo do transporte de folato	5
Figura 2. Metabolismo do folato	6

Lista de Tabelas

Figura 1. Valores médios e máximos de ingestão de folato	8
--	---

Lista de Abreviaturas e Siglas

µg	Micrograma
µM	Micromolar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
mg	Miligrama
mL	Militros
nM	Nanomolar
PSA	Prostate Specific Antigen
PSMA	Prostate Membrane Specific Antigen
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SAM	S-Adenosilmetionina
SFB	Soro Fetal Bovino

Sumário

1 Introdução	1
1.1 Objetivos	2
1.2 Objetivos Específicos	2
2 Revisão da literatura	3
2.1 Folato	3
2.2 Câncer de Próstata	8
2.3 Estudos in vitro e in vivo.....	9
3. Metodologia.....	13
3.1 Cultivo celular	13
3.3 Avaliação da proliferação celular.....	14
4. Resultados e Discussão.....	15
5. Conclusão	17
6. Perpectivas Futuras	18
7 Referências	19

1 Introdução

O câncer de próstata é o mais incidente em homens em todas as regiões do país, depois dos tumores de pele não melanoma. O Sul é a região com maior incidência de todo o país, com 91,24 casos novos a cada 100 mil habitantes, contra a média nacional de 70,42. A estimativa é de 68.800 casos novos de câncer de próstata no Brasil em 2014, e 1,1 milhão no mundo todo, com a previsão de aumento de 60% de casos até 2015. Alguns estudos demonstram que a mortalidade por esse câncer apresenta um perfil ascendente, da mesma maneira que sua incidência no país (INCA, 2014). Já nos Estados Unidos foram estimados 240 mil casos novos do câncer em 2013, com 30 mil mortes. Um estudo avaliando biópsias detectou câncer de próstata latente em 11% dos homens de 20 a 30 anos e 40% ou mais em homens acima dos 50 anos. A chance de desenvolver o câncer invasivo é estimada em 1 a cada 8000 em homens com menos de 40 anos, subindo para 1 a cada 8 em homens acima dos 70 anos de idade (Rycyna et al., 2013).

Além da idade, que até o momento é o único fator estabelecido na etiologia do câncer de próstata, a alimentação é um dos fatores em estudo. O folato, conhecido como vitamina B9, possui lugar de destaque como um dos nutrientes que provavelmente influencia o desenvolvimento do câncer de próstata. A função biológica do folato pode ser conceituada de forma resumida como coenzima em reações de troca de carbono, através de grupos metil, por exemplo (Czeizel et al., 2013). A partir dessa função o folato torna-se fundamental em reações como metilação de DNA, RNA e proteínas, na produção de poliaminas, neutralização de homocisteína e síntese de nucleotídeos. Logo a presença de folato é crucial para o crescimento e proliferação celular (Stover, 2011). O folato não é sintetizado pelo organismo do homem e portanto, sua ingestão, que se dá geralmente na forma de ácido fólico, sua forma sintética e estável, é essencial para atividades básicas da célula. A baixa ingestão dessa vitamina tem sido relacionada com o surgimento de diversas doenças como leucemia linfoblástica aguda, depressão, doenças vasculares, diversos tumores em regiões como o pescoço e a cabeça, câncer de mama, câncer de colón e câncer gástrico. Em gestantes é comum o surgimento de defeitos no tubo neural, anormalidades cromossômicas e até síndrome de Down decorrentes do baixo consumo de folato (Stover, 2011). Na ausência de folato, pode ocorrer desequilíbrio genômico, levando a

alterações no perfil epigenético das células, já que a metilação de DNA se torna comprometida. O desequilíbrio genômico pode resultar também em desenvolvimento de tumores, no entanto, com menor poder de crescimento e invasividade (Bistulfi et al., 2010). Pode-se dizer que o folato possui uma atividade dupla, podendo em baixas concentrações reduzir o crescimento do câncer de próstata já estabelecido, ou desencadear outras doenças por conta da inviabilidade de rotas metabólicas que dependam dele em casos de indivíduos saudáveis. Em concentrações elevadas, o folato pode prevenir o surgimento de tumores, mantendo as atividades básicas da célula em funcionamento ou, por outro lado, aumentar a gravidade de um câncer em desenvolvimento (Kim, 2006).

1.1 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido fólico na proliferação celular de linhagens tumorais de próstata.

1.2 Objetivos Específicos

Avaliar a proliferação de células LNCaP sob tratamentos com diferentes concentrações de ácido fólico.

Avaliar a proliferação de células PC-3 sob tratamentos com diferentes concentrações de ácido fólico.

Comparar a proliferação das linhagens tumorais em resposta aos diferentes tratamentos com ácido fólico.

2 Revisão da literatura

2.1 Folato

Folato, também chamado como vitamina B9, é um composto hidrossolúvel, encontrado naturalmente na forma de poliglutamatos em alimentos naturais. O ácido fólico, no entanto, é a forma monoglutamil, oxidada e sintética do folato, que por sua maior estabilidade é usado em suplementos alimentares e na fortificação de grãos integrais e cereais (Stover e Field, 2011; Winkels et al., 2007). Apesar do termo folato ser utilizado frequentemente para representar tanto o folato de alimentos naturais como o ácido fólico industrial, foi demonstrado que tais compostos possuem diferente biodisponibilidade (Winkels et al., 2007; Tomaszewski et al., 2014). Entretanto há poucos estudos diferenciando a atividade biológica dos mesmos (Rycyna et al., 2013). O folato natural foi descoberto por Lucy Wills em 1931, e inicialmente foi chamado de vitamina 11 (Czeizel et al., 2013). Já o ácido fólico sintético, foi produzido posteriormente com intuito de reproduzir a forma natural (Hoffbrand, 2001).

O organismo do homem é incapaz de produzir folato, e as principais fontes desse nutriente são vegetais de cor verde escura, frutas cítricas, e alguns grãos e legumes (Czeizel et al., 2013). A redução na ingestão de folato em gestantes está relacionado com a má formação do tubo neural em neonatos (McPartlin et al., 1993), e níveis plasmáticos irregulares em humanos saudáveis estão relacionados com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, fissura labiopalatina, desordens psiquiátricas e neurodegenerativas (Czeizel et al., 1996; Stover e Field, 2011; Blom e Smulders, 2011). Desta maneira, a ingestão dessa vitamina torna-se necessária, e por conta disso a suplementação de alimentos industrializados com ácido fólico tornou-se lei nos EUA em 1998 (Czeizel et al., 2013; Tomaszewski et al., 2014).

No intestino delgado o folato poliglutamato de alimentos naturais é hidrolisado em monoglutamatos, pela enzima folato conjugase (gama-glutamil hidrolase), que são transportados para as células por diversos mecanismos (Chandler et al., 1986). Já o ácido fólico, por sua forma monoglutamil, pode ser absorvido diretamente pelas células. Dentro das células, os monoglutamados são convertidos a poliglutamatos novamente, transformando-se primeiramente em diidrofolato e, então, em tetraidrofolato (THF), a forma biológica ativa principal da vitamina no metabolismo, pela enzima diidrorredutase. Dessa forma, ocorre o aumento da retenção celular e afinidade da vitamina como visto na Figura 1 (Czeizel et al., 2013).

Foi estabelecido que no metabolismo de proteínas, de origem animal ou vegetal, são liberados aminoácidos, entre os quais é destacada a Metionina, que, posteriormente, é convertida em homocisteína, um metabólito tóxico. A neutralização de homocisteína pode ocorrer pela rota da transsulfuração ou através da remetilação. Em ambos os casos o THF possui papel direto ou indireto, em geral cedendo carbono nos processos enzimáticos, representado na Figura 2 (Stover e Field, 2011; Czeizel et al., 2013).

O folato é essencial para a proliferação de todos os tipos de células, principalmente pela regulação da rota metabólica de um carbono, em que age como uma coenzima. O rompimento desta rota metabólica pode promover a carcinogênese por interferir na replicação e reparo de DNA, e na regulação da expressão genética pela metilação (Bassett et al., 2012; Kim 2004). O folato ainda tem papel importante na biossíntese de purinas e pirimidinas, através do mecanismo da síntese *de novo* de construção e reparo de DNA. Em geral, o crescimento rápido e as multiplicações celulares, aspecto central do desenvolvimento fetal, requerem um suprimento adequado de folato (Krishnaswamy e Madhavan Nair, 2001). Além disso, essa vitamina é um fator chave para a metilação sítio-específica de citosina no DNA, que regula a programação epigenética de expressão gênica nas células (Nazki et al., 2014).

O folato possui um papel importante na síntese de S-adenosilmetionina (SAM), como visto na Figura 2. A SAM por sua vez, serve como um doador de grupo metil em reações de metilação de grande importância como, a metilação de DNA, de RNA e de proteínas (Kim, 2000). A metilação genética mantém a estabilidade e integridade do genoma. Alterações no padrão de metilação de DNA, em regiões que funcionam como promotores de genes supressores de tumores, ou em genes de crescimento e proliferação celular são determinantes no desenvolvimento de tumores. Por isso, alterações no equilíbrio de folato podem desencadear a ocorrência de tumores ou estimular tumores estáveis (Hubner e Houlston, 2009).

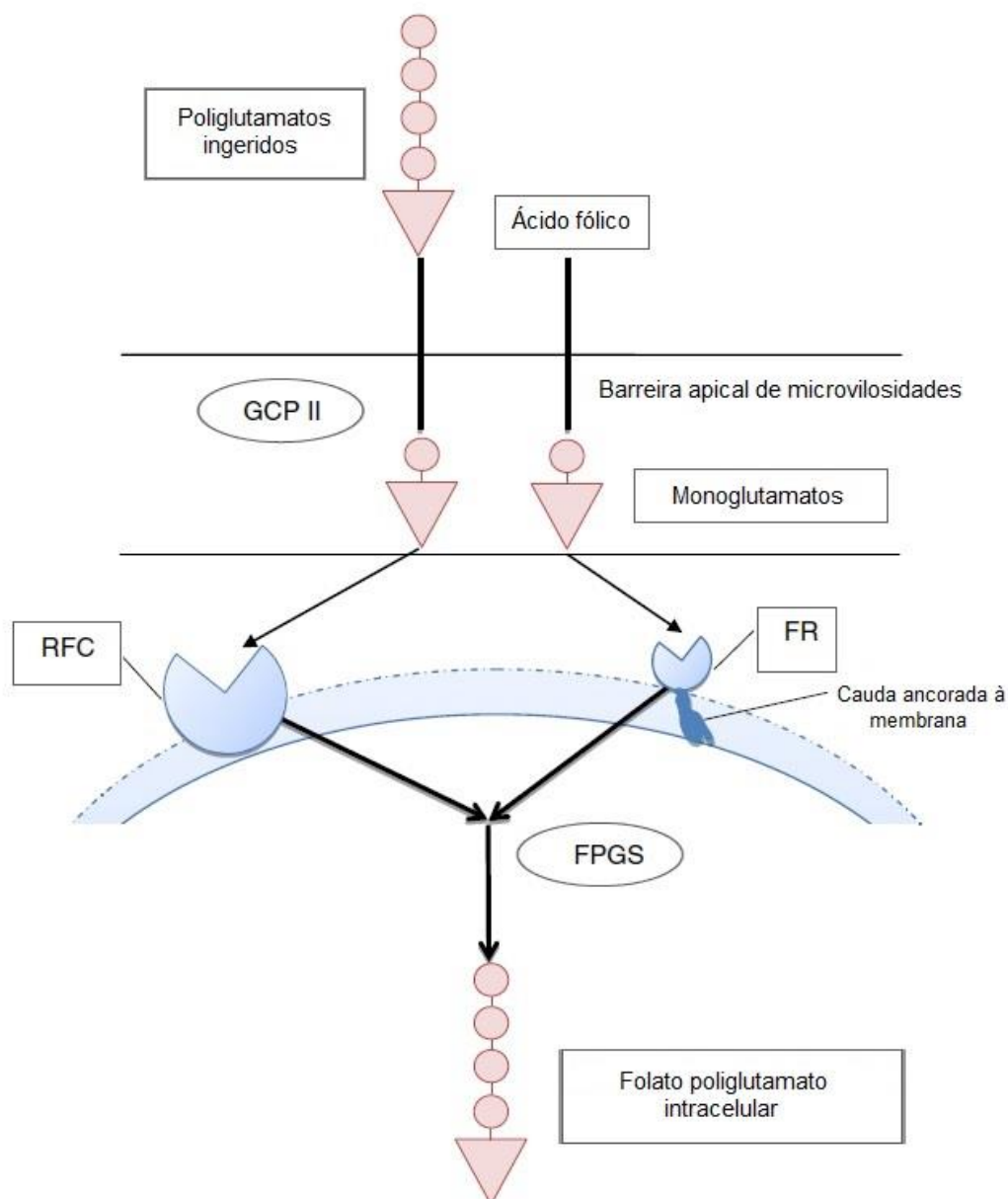


Figura 1. Resumo do transporte de folato. FR, receptor de folato; RFC, transportador de folato reduzido; FPGS, foli-poli-glutamato-sintetase; GCP II, glutamato carboxipeptidase II. Adaptado de Nazki et al., 2014.

Pelo fato de influenciar diretamente a síntese e a metilação de DNA, o folato se torna um candidato alvo nos estudos de suscetibilidade ao câncer. Análises de polimorfismos, ingestão e biodisponibilidade do folato e do ácido fólico têm recebido grande enfoque em pesquisas de câncer, bem como, o estudo dos genes de enzimas reguladoras no metabolismo do folato (Blount e Ames, 1994; Krumdiek e Howard-Peebles, 1983; Rycyna et al., 2013).

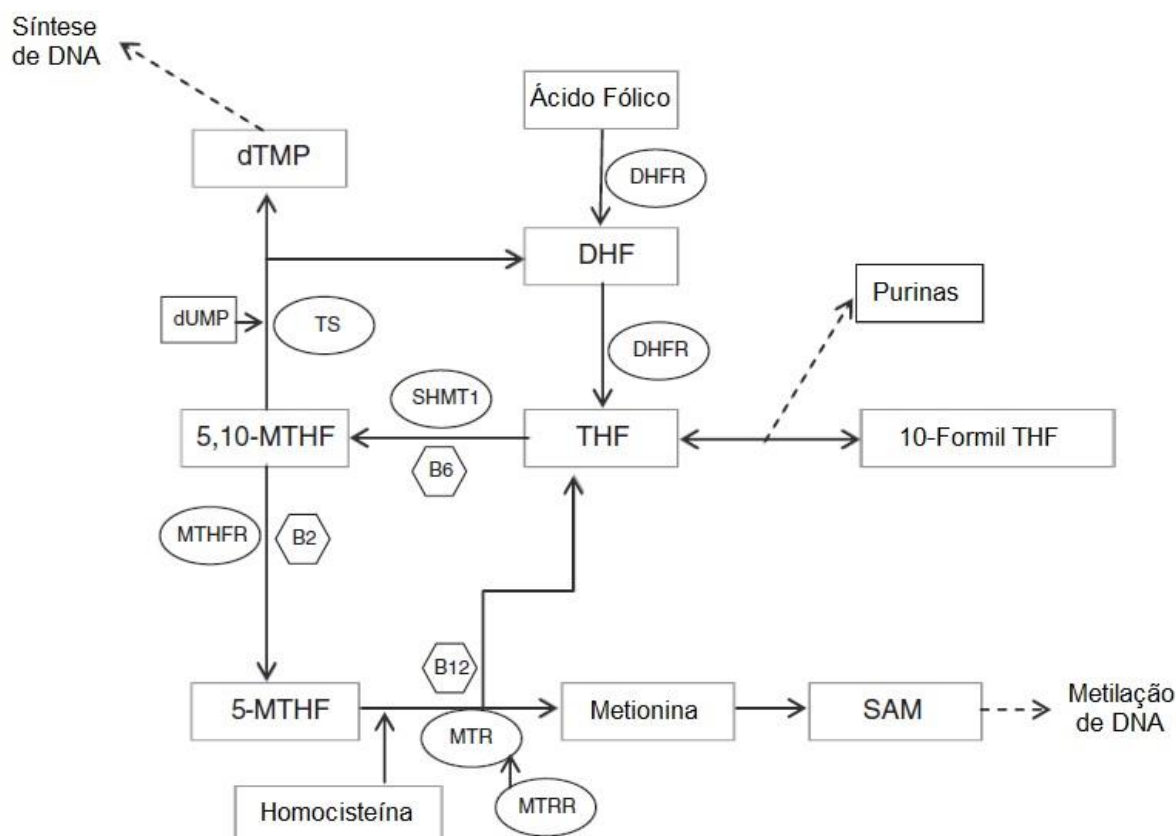


Figura 2. Metabolismo do folato: DHFR, dihidrofolato redutase; SHMT1, serina hidroximetil transferase 1; B6, vitamina B6; MTHFR, metileno tetraidrofolato redutase; B2, vitamina B2; TS, timidilato-sintase; MTR, metionina sintetase; B12, vitamina B12; MTRR, metionina sintase redutase; DHF, diidrofolato; THF, tetraidrofolato; 5,10-MTHF, 5,10-metiltetraidrofolato; 5-MTHF, 5-metiltetraidrofolato; dUMP, monofosfato deoxiuridina; dTMP, monofosfato deoxitimidilato; 10-Formil THF, 10-formil tetraidrofolato; SAM, Sadenosilmetionina. Adaptado de Nazki et al., 2014.

Pelo menos 30 enzimas estão envolvidas no metabolismo do folato que consiste, em geral, na redução de átomos de carbono em radicais como formil, metil e metileno (Lightfoot et al., 2005). Algumas das principais enzimas envolvidas são: *diidrofolato redutase* (DHFR), que catalisa a redução de ácido fólico ingerido ou de diidrofolato para THF; *C1-THF sintetase*, um complexo de três diferentes enzimas que reduzem diferentes substratos para THF ou sua forma metilada; *5,10 Metileno tetraidrofolato redutase* (5,10-MTHFR), responsável pela importante redução irreversível gerando o substrato de mesmo nome, que é a forma plasmática primária do THF; *Timidilato sintase* (TS), catalizadora da reação de metilação que converte dUMP para dTMP, um dos três precursores da timina necessária a formação do ácido nucleico; *Metionina sintetase* (MTR), a enzima que catalisa a reação de metilação de homocisteína para metionina, que é substrato para a SAM, a doadora universal do grupo metil; *Cistationina β-sintase* (CBS) e *cistationina γ-liase* (CTH), catalisadoras da degradação irreversível da homocisteína para cisteína, processo que ocorre em duas etapas, com

participação da Vitamina B6, sendo a primeira etapa a condensação de homocisteína para cistationina catalisada pela CBS, e a segunda etapa a hidrólise da cistationina para cisteína e α -cetobutirato (Nazki et al., 2014). A presença de polimorfismos nos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo do folato podem romper o equilíbrio do crescimento celular e desenvolvimento fetal, período em que as vitaminas possuem papel fundamental (Czeizel et al., 2013), e estão relacionadas com o desenvolvimento de diversas doenças e síndromes tais como: leucemia linfoblástica aguda, depressão, doenças vasculares, defeitos no tubo neural, anormalidades cromossomais, síndrome de Down além de diversos tumores em regiões como o pescoço e a cabeça, câncer de mama, câncer de colón e câncer gástrico (Nazki et al., 2014).

A deficiência de folato pode resultar em alterações no *pool* de nucleotídeos desencadeando erros na síntese de DNA, incorporação da base nitrogenada Uracila ao nucleotídeo no DNA, descondensamento de cromossomos e translocações (Blount e Ames, 1994; Krumdiek e Howard-Peebles, 1983). Devido à sua importância no metabolismo celular, controle do crescimento celular, síntese de DNA e mecanismos epigenéticos, a biodisponibilidade de folato é capaz de regular também o crescimento de tumores (Bertino et al., 1971). A regulação do crescimento tumoral pode se dar de maneira dupla, dependendo da quantidade de folato presente e se já há células neoplásicas. A presença de folato poderia inibir o surgimento de um tumor, através de sua participação na síntese e reparo de DNA. Neste sentido, a insuficiência de folato tem sido relacionada com o surgimento de diferentes cânceres como: de mama, de esôfago, gástrico, pancreático, colo retal e cervical (Choi e Mason, 2002). Por outro lado, a expansão de um tumor já desenvolvido poderia ser evitada, já que na sua ausência observa-se diminuição do potencial de proliferação celular (Rycyna et al., 2013).

As células de câncer de próstata não são capazes de proliferar com a mesma rapidez que demais tumores, mas dependem muito do folato para seu crescimento. Essa dependência se dá pelo fato das células normais e de tumor de próstata priorizarem a síntese de poliaminas para manutenção da estabilidade genômica, em lugar da metilação, processo mais comum entre as células. A rota para produção de poliaminas depende do metabolismo de um carbono do folato, que tem por intermediário o composto SAM, precursor das poliaminas (Bistulfi et al., 2010). As células da próstata possuem a maior fonte da poliamina espermina, que é encontrada

em concentrações de 50 até 350 mg/dL (Wein et al., 2012). O metabolismo das poliaminas pode estar envolvido também no processo de inflamação, processo que possui um papel essencial na iniciação e progressão de cânceres epiteliais. A inibição da síntese de poliaminas e a utilização de medicamentos antitumorais demonstrou ser um método eficiente e seguro na redução do fator de risco para o desenvolvimento de tumores (Gerner, 2011).

A dependência do folato para manutenção da estabilidade genômica torna as células normais e tumorais de próstata mais sensíveis a alterações das concentrações fisiológicas de folato. O crescimento dessas células torna-se limitado na insuficiência de folato, quadro que pode ser revertido frente à exposição a concentrações elevadas de folato, que ocorre em casos de suplementação alimentar, ou na ingestão de alimentos enriquecidos com ácido fólico. Para melhor compreender a atividade do folato no desenvolvimento celular e tumoral torna-se necessário conhecer os níveis médios de folato na população e se há alguma associação entre consumo de folato e ácido fólico com a incidência de tumores (Rycyna et al., 2013; Bistulfi et al., 2010). Os valores médios de ingestão recomendados podem ser observados na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1. Valores médios e máximos de ingestão de folato. Adaptado de “Canadian Nutrient File 2010”

Faixa etária	Valor recomendados ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	Valor máximo ($\mu\text{g}/\text{dia}$)
Acima de 19 anos	400	1000
Gestante acima de 19 anos	600	1000
Lactante acima de 19 anos	500	1000

2.2 Câncer de Próstata

No Brasil, O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima 68.800 novos casos de câncer de próstata para o ano de 2014. Estudos baseados na prevalência de câncer de próstata sugerem 70,42 casos novos para uma população de 100 mil homens. Esses valores tornam o câncer de próstata o segundo mais frequente em homens, atrás

apenas do tumor de pele não melanoma, seguindo as tendências mundiais que estimavam cerca de 1,1 milhão de casos novos para 2012. Cerca de 70% destes casos serão diagnosticados em países desenvolvidos. A presença de índices mais elevados de diagnóstico de câncer de próstata pode estar relacionada ao aumento da expectativa de vida dos homens nesses países, já que cerca de 62% dos diagnósticos ocorrem em homens acima dos 65 anos de idade. Outra explicação seria na melhor estrutura encontrada nesses países, que disponibilizariam de melhores testes diagnósticos como o rastreamento pelo teste do Antígeno Prostático Específico (PSA), sendo as mais altas taxas de incidência encontradas na Austrália, Nova Zelândia, Europa Ocidental e América do Norte (INCA, 2014). A próstata é uma glândula que secreta um fluido fino e leitoso que contem cálcio, citrato, fosfato e alguns fatores de coagulação. É responsável por aumentar o pH do sêmen, tornando os espermatozoides viáveis, sendo assim uma glândula fundamental para a fertilidade masculina (Hall e Guyton, 2011).

Sendo a idade o único fator estabelecido na etiologia para o desenvolvimento de câncer de próstata, o aumento da expectativa de vida mundial tende a agravar o número de casos novos. A estimativa é de aumento de 60% da prevalência de câncer de próstata até o final de 2015. Histórico familiar e etnia também demonstram possuir correlação com a etiologia da doença. O câncer de próstata é, aproximadamente, duas vezes mais comum em negros, apesar da diferença entre brancos e negros estar mais relacionada ao estilo de vida do que à propensão genética. Outro fator de risco para o câncer de próstata é a dieta. Algumas dietas estão associadas com o aumento no risco de desenvolvimento de câncer, como as dietas baseadas em carne vermelha, gordura animal, embutidos e cálcio (INCA, 2014).

2.3 Estudos *in vitro* e *in vivo*

As principais linhagens celulares de tumor de próstata utilizadas são a LNCaP, PC-3 e DU-145. A linhagem LNCaP originou-se de células de adenocarcinoma de próstata humana de um homem caucasiano com 50 anos em 1977. São sensíveis a andrógenos e capazes de produzir antígeno prostático específico de membrana (PSMA) (Horoszewicz et al., 1983). As células da linhagem PC-3 foram extraídas de uma metástase em osso de tumor de próstata de grau IV, em um homem de 62 anos

de idade, em 1979. Possui alto potencial metastático comparado à LNCaP e a DU-145. Não são capazes de expressar PSMA (Kaighn et al., 1979).

Até o momento uma das descobertas mais promissoras para a investigação do câncer de próstata em homens é o PSMA, com potencial terapêutico e diagnóstico em homens. O PSMA é uma glicoproteína integral de membrana do tipo II que é produzida abundantemente em tumores de próstata (Yao e Bacich, 2006), e seria um dos fatores-chaves na tumorigênese (Rycyna et al., 2013). Contudo sua atividade endógena na próstata ainda é desconhecida, mesmo sabendo que é capaz de remover glutamatos de folatos poliglutamatos e N-acetilaspártil glutamato (Israeli et al., 1993). Homens e cães são capazes de expressar naturalmente o PSMA, e são as únicas espécies com alta incidência de câncer de próstata (Yao e Bacich, 2006). A relação entre PSMA e o desenvolvimento de câncer de próstata foi demonstrada nos estudos com camundongos transgênicos que expressavam PSMA. Nestes animais foi observado o desenvolvimento de lesões características de neoplasia prostática intraepitelial, em contraste com o grupo selvagem da mesma linhagem (Haggman et al., 1997). Níveis altos de PSMA são encontrados em todos os tipos de tumor de próstata, no entanto sua concentração em tumores benignos não é tão grande quanto nos demais tumores, como nos carcinomas e nas neoplasias metastáticas (Wright et al., 1996). A expressão de PSMA tende a subir conforme a gravidade do tumor, tornando-se um marcador importante para detecção e diagnóstico da doença (Kawakami e Nakayama, 1997). A relação de PSMA com a carcinogênese deve ocorrer pela sua atividade na hidrólise de folato, dada as atividades biológicas do folato descritas anteriormente.

Em um estudo *in vitro*, Yao e Bacich (2006) demonstraram que em meio contendo níveis fisiológicos de folato e com suplementação de folato penta-glutamato, células de câncer de próstata capazes de expressar PSMA (LNCaP) demonstram vantagem na capacidade de se proliferarem sobre as células incapazes de produzir PSMA (DU-145). Essa vantagem ocorre em virtude da capacidade da enzima PSMA hidrolisar o folato do conjugado e utilizá-lo normalmente. E uma vez que a enzima PSMA é neutralizada, o potencial de proliferação é reduzido. No mesmo estudo foi demonstrado que células de próstata cultivadas em meio abundante em folato possuem proliferação celular superior às células cultivadas em meio com folato em concentração fisiológica e hipofisiológica, reafirmando a hipótese da influência positiva do folato em células tumorais. Com esses resultados, discussões envolvendo dietas sem folato têm vindo à tona (Rycyna et al., 2013). No entanto, a manipulação dietética

evitando o consumo de folato pode levar ao desenvolvimento de tumores de igual modo. Um estudo realizado demonstrou que a exposição de linhagens de câncer de próstata a níveis limitados de folato pode levar à ocorrência de instabilidade genética e epigenética, além de mudanças fenotípicas no crescimento celular, quando comparados a outra linhagem com níveis suprafisiológicos da vitamina. Para avaliar o efeito fisiológico de diferentes níveis de folato, ainda outro estudo testou dietas com diferentes níveis de folato em camundongos, com níveis normais, hipofisiológicos e suprafisiológicos. Nesse modelo foi observado que as células prostáticas de camundongos alimentados com baixas concentrações de folato apresentavam menor crescimento celular se comparado às células dos outros grupos. Além disso, os camundongos com deficiência da vitamina apresentaram significativamente menos lesões prostáticas do que os demais grupos. No grupo privado de folato foi observado também menor formação de metástases em linfonodos (Bistulfi et al., 2010 e 2011).

A relação entre a ingestão de folato e o aumento no risco de desenvolvimento de câncer de próstata, ou na progressão do câncer em pacientes com o tumor, ainda é controversa, conforme pode ser observado em três estudos de coorte de pacientes com câncer de próstata realizados nos últimos anos. Em seu estudo, Tomaszewski (2014), examinou o risco de recorrência de câncer após prostatectomia radical, radioterapia externa e braquiterapia. Esse estudo retroativo compreendeu 1.153 homens nos Estados Unidos, que haviam participado de um experimento envolvendo o consumo de ácido fólico para a quimioprevenção de adenoma colorretal. Não foi encontrada qualquer relação entre o consumo de multivitamínicos que contém folato com a recorrência de câncer após tratamento definitivo. Stevens (2006) realizou um trabalho ainda maior, com a participação de 65,836 homens, e de acordo com um questionário alimentar foi estimado o consumo de folato, e sua possível relação com o diagnóstico de câncer de próstata em 5.158 homens. Nesse estudo não foi encontrada qualquer associação entre ingestão de folato com o câncer de próstata. O único dado encontrado foi uma pequena diminuição no risco de diagnóstico de câncer de próstata em estágio avançado entre homens que consumiam mais folato. O terceiro estudo de coorte, realizado na Europa, com a participação de 6000 homens, avaliou a relação entre folato, vitamina B12 e câncer de próstata. Foi encontrada uma associação positiva entre o nível de folato e o risco de câncer de próstata, e nenhuma relação com a vitamina B12 (De Vogel et al., 2013).

3. Metodologia

As atividades desenvolvidas foram realizadas entre os períodos de Abril e Novembro de 2014. Este subprojeto faz parte do projeto “Efeito do folato na via de sinalização de Insulina e IGF-1 em linhagens celulares de câncer de próstata”, coordenado pela Prof.^a Dr.^a Isabel Oliveira de Oliveira. As linhagens celulares foram obtidas do laboratório da Prof.^a Dr.^a Ilma Simoni Brum da Silva, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Pós-Graduação Ciências Biológicas-Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, colaboradora do projeto.

3.1 Cultivo celular

Este estudo envolve a utilização das linhagens tumorais LNCaP e PC-3. A linhagem LNCaP é capaz de expressar a enzima PSMA, ao contrário da PC-3. As linhagens que capazes de produzir a enzima de maneira endógena tendem a possuir invasividade menos agressiva do que as linhagens incapazes (Ghosh et al.,2005). Na primeira etapa do estudo foi testada a linhagem LNCaP. As atividades foram realizadas no Laboratório de Cultivo Celular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Instituto de Biologia - Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão

O descongelamento das células LNCaP, criopreservada em meio contendo Dimetilsulfóxido (DMSO) foi realizada à temperatura ambiente. O conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo falcon com 10 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma–Aldrich, USA) acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA). Após centrifugação a 300g por 8 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 10 mL de DMEM+10% SBF. O procedimento foi realizado duas vezes para remoção do crioprotetor presente no meio de congelamento. Na última lavagem foram adicionados 12 mL do meio de cultura para ressuspender o *pellet*, que foi transferido para uma garrafa de cultura de 75cm² (TPP – Techno Plastic Products AG, Suíça).

As garrafas de cultivo celular contendo a linhagem LNCaP foram armazenadas em estufa (NuAire Inc., Minesota, USA) a 37°C com 5,5% de CO₂. Após 24 horas, foram adicionados mais 12 mL de meio. Após 48 horas do início do cultivo, foi realizada a troca de meio através da sucção com bomba à vácuo e adição de 25 mL de meio de cultura novo. O crescimento celular e a adesão das células em monocamada foram

acompanhados por meio de observação no microscópio (Axyover 25, Carl Zeis, Germany). Após 96 horas de cultivo, as células foram tripsinizadas e realizada a contagem com o corante azul de Tripán em hemocitômetro. As células foram divididas conforme a concentração de ácido fólico, nos seguintes grupos: controle (0 nM/L), F4 (4nM/L), F20 (20 nM/L) e F100 (100 nM/L) e plaqueadas em densidade de 10^4 células por poço em placas de 6 poços.

3.3 Avaliação da proliferação celular

Para análise da proliferação celular, a linhagem será avaliada através de ensaio de MTT, realizado segundo protocolo padrão. A solução de estoque de MTT (5 mg/mL) é adicionada a cada cultura a ser testada, na concentração igual a 10% do volume da cultura original e incubadas entre 3 à 4 horas. No final do período de incubação, o corante será solubilizado com isopropanol ácido (0,04-0,1 N de HCl em isopropanol absoluto). A absorbância do corante convertido é medida a um comprimento de onda de 570 nm com subtração de fundo em 630-690 nm.

4. Resultados e Discussão

Até o presente momento não foi possível obter resultados em decorrência de problemas na execução do experimento, os quais inviabilizaram o cronograma de trabalho, impossibilitando a realização do mesmo dentro do período proposto no delineamento experimental. Por conta disso neste capítulo serão abordados estudos publicados com metodologia semelhante à proposta no projeto.

Em um experimento usando a linhagem de células LNCaP, Yao e Bacich (2006) testaram a vantagem conferida pela expressão da enzima PSMA na proliferação dessas células, frente a diferentes concentrações de ácido fólico no meio. Duas linhagens, LNCaP e DU-145, a primeira capaz de expressar e a segunda incapaz de expressar a enzima PSMA, foram tratadas em três concentrações diferentes de ácido fólico. As células foram inicialmente cultivadas em meio contendo alta concentração de ácido fólico (2.3 μM) por uma semana e, após isso, transferidas para placas de 96 poços, semeadas com aproximadamente 3000 células/poço, e então divididas em três grupos: concentração alta de ácido fólico (HF, com 2.3 μM); concentração fisiológica (PF, 25 nM); e concentração baixa (LF, 1 nM). As células foram então cultivadas em estufa a 37° com 5% de CO₂ em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina, além da adição de antibióticos (penicilina/estreptomicina), pelo período de 1, 2, 3, 4 e 5 semanas. A proliferação celular foi avaliada através da técnica de MTT (Chemicon, Temecula, CA), realizada pela adição de 10 μL de solução de MTT em cada poço, e incubação por 4 horas à 37°. A reação foi interrompida adicionando 100 μL de HCL/iso-propanol com absorbância medida por ELISA. Cada grupo foi avaliado por semana, utilizando o grupo de alta concentração como referencial. Nas células LNCaP, os resultados obtidos demonstraram que na primeira semana os grupos PF cresceram 11,5% menos, reduzindo para 53,8%, 61.4%, e 83.8% nas outras semanas, respectivamente. Enquanto a DU-145 apresentou redução de 6.8%, 63.9%, 63.1%, e 59.4%. Os grupos LF reduziram de forma mais significativa, com 25,8%, 64%, 70.8%, 73.5%, e 75.1% para LNCaP e 25.2%, 73.2%, 79.5%, 82.4% e 88,7% para a linhagem DU-145. A disparidade na redução da proliferação dos grupos PF e LF em relação ao HF entre a primeira e a segunda semana é maior do que entre as outras semanas. Foi proposto que este padrão de redução deve ocorrer pelas reservas de folato existentes nas células, que devem durar em torno de uma semana, até que as células dependam apenas do ácido fólico presente no meio de cultivo. Além do padrão

de proliferação das células em relação ao ácido fólico contido no meio, o autor também identificou que a linhagem LNCaP possui vantagem em sua proliferação celular sobre a linhagem DU-145 em virtude da expressão de PSMA.

Petersen e colaboradores (2012) conduziram um experimento testando a relação do ácido fólico com o crescimento e invasividade celular. Neste estudo Petersen avaliou linhagens, entre elas a LNCaP. O meio usado foi RPMI livre de ácido fólico e suplementado com 10% de SBF. As células foram divididas em 3 grupos, de acordo com as concentrações de ácido fólico a ser suplementado no meio. As concentrações foram 4, 20 e 100 nM de ácido fólico. O cultivo foi realizado em placas de 6 poços, semeados em densidade de 10^4 células por poço. Após 3, 6 e 9 dias as células foram tripsinizadas, lavadas, coradas com trypan blue e contadas em hemocítmetro para avaliar crescimento e viabilidade celular. Para avaliar a invasividade das linhagens, as células foram cultivadas nas mesmas condições anteriormente descritas por 72 horas, e então, cultivadas no mesmo meio e mesma concentração de ácido fólico, porém sem a suplementação de SBF por 24 horas, simulando um estado de “jejum”. Após isso as células foram transferidas para câmaras porosas revestidas com matriz de gel, diluídas a $1,5 \times 10^6$ células/ml e incubadas por 24 horas. A região inferior à matriz continha meio suplementado com SBF como quimioatraente. As células capazes de atravessar a matriz foram fixadas e coradas para contagem. A invasividade das células, dada em porcentagem das que foram capazes de atravessar a matriz, aumentou conforme a concentração de ácido fólico, sendo 5,4%, 9,9% e 24,6% para as concentrações de 4, 20 e 100 nM, respectivamente. Sem demonstrar valores totais, o autor sugere que há diferença estatística entre os grupos na relação da suplementação com ácido fólico. Os valores médios aproximados do de proliferação celular foram de 80, 100 e 130 (10^4) células no fim de 9 dias.

Com base nesses dois resultados podemos estimar que a proliferação celular da linhagem LNCaP deve progredir em relação direta e positiva com as concentrações de ácido fólico suplementado ao meio. No entanto um estudo com número maior de concentrações testadas seria útil para elaboração de futuros testes, resultando em maior precisão no delineamento da quantia necessária de ácido fólico a ser suplementado. O impacto da privação de ácido fólico após cultivo em meio com níveis fisiológicos da vitamina é um ponto que também pode ser melhor esclarecido.

5. Conclusão

Ainda há poucos estudos testando especificamente o impacto da suplementação com ácido fólico em linhagens tumorais de próstata, mas os resultados sugerem um aumento da proliferação celular em resposta ao aumento da concentração de ácido fólico no meio.

6. Perspectivas Futuras

Como perspectivas futuras têm-se que a análise do padrão de metilação global de acordo com diferentes concentrações da vitamina será importante para a compreensão da interação gene-ambiente (dieta). A aplicação clínica de moduladores epigenéticos da dieta, pode aumentar a eficácia de terapias anticâncer estabelecidas. Além disso, ao se considerar que o ácido fólico possui grande potencial para atuar na entrega de fármacos (*drug-delivery*), a fusão de compostos antitumorais ao ácido fólico potencializaria e daria maior precisão aos medicamentos de combate ao câncer de próstata ou, àqueles de combate a outros tumores com sensibilidade ao ácido fólico. Cabe salientar ainda, a aplicação em estratégias de prevenção de câncer, assim como, diminuição de efeitos colaterais indesejados. Dessa forma, são necessários maior número de estudos para melhor elucidar pontos-chaves tais como, mecanismo de ação, dose, metabolismo, tempo de tratamento, regulação epigenética do ácido fólico no desenvolvimento de câncer de próstata.

7 Referências

- BASSETT, J. K. et al. Dietary intake of B vitamins and methionine and prostate cancer incidence and mortality. *Cancer causes & control : CCC*, v. 23, p. 855–63, 2012.
- BERTINO, J. R.; O'BRIEN, P.; MCCULLOUGH, J. L. Inhibition of growth of leukemia cells by enzymic folate depletion. *Science (New York, N.Y.)*, v. 172, p. 161–162, 1971.
- BISTULFI, G. et al. Dietary folate deficiency blocks prostate cancer progression in the TRAMP model. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, v. 4, n. 11, p. 1825–34, nov. 2011.
- BISTULFI, G. et al. Mild folate deficiency induces genetic and epigenetic instability and phenotype changes in prostate cancer cells. *BMC biology*, v. 8, p. 6, jan. 2010.
- BLOM, H. J.; SMULDERS, Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *Journal of inherited metabolic disease*, v. 34, n. 1, p. 75–81, fev. 2011.
- CHANDLER, C. J.; WANG, T. T. Y.; HALSTEDS, C. H. Pteroylpolyglutamate Hydrolase from Human Jejunal Brush Borders. v. 261, n. 2, p. 928–933, 1986.
- CHOI, S.-W.; MASON, J. B. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *The Journal of nutrition*, v. 132, p. 2413S–2418S, 2002.
- CZEIZEL, A. E. et al. Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. *Nutrients*, v. 5, n. 11, p. 4760–75, nov. 2013.
- CZEIZEL, A. E. Reduction of urinary tract and cardiovascular defects by periconceptional multivitamin supplementation. *American Journal of Medical Genetics*, v. 62, p. 179–183, 1996.

DE VOGEL, S. et al. Serum folate and vitamin B12 concentrations in relation to prostate cancer risk-a norwegian population-based nested case-control study of 3000 cases and 3000 controls within the JANUS cohort. *International Journal of Epidemiology*, v. 42, n. 1, p. 201–210, fev. 2013.

GERNER, E. W. *Clinical Cancer Prevention. Recent Results in Cancer Research*. v. 188, p. 49–64, 2011.

GHOSH, A. et al. Novel Role of Prostate-Specific Membrane Antigen in Suppressing Prostate Cancer Invasiveness. v. 1, n. 8, p. 727–732, 2005.

HAGGMAN, M. J. et al. The relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: critical issues. *J.Urol.*, v. 158, p. 12–22, 1997.

Hall, J. E. Guyton, A. C. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology - Philadelphia, PA - Saunders/Elsevier - 2011*. p. 1-1120

HISTORY, T. H. E.; FOLIC, O. F. *Historical Review*. 2001.

HO, E. et al. Dietary factors and epigenetic regulation for prostate cancer prevention. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, v. 2, n. 6, p. 497–510, nov. 2011.

HOROSZEWICZ, J. S. et al. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma¹. n. April, 1983a.

HOROSZEWICZ, J. S. et al. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma¹. n. April, 1983b.

HUBNER, R. A; HOULSTON, R. S. MTHFR C677T and colorectal cancer risk: A meta-analysis of 25 populations. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 120, n. 5, p. 1027–35, 1 mar. 2007.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. [On-line]. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>>. Acesso em 17 dez. 2014.

ISRAELI, R. S. et al. Molecular Cloning of a Complementary DNA Encoding a Prostate-specific Membrane Antigen. *Cancer Res.*, v. 53, p. 227–230, 1993.

KAIGHN, M. E. et al. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology*, v. 17, p. 16–23, 1979.

KAWAKAMI, M.; NAKAYAMA, J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. *Cancer research*, v. 57, p. 2321–2324, 1997.

KIM, Y. I. Folate and DNA methylation: A mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 2004.

KIM, Y. I. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutrition reviews*, v. 58, p. 205–209, 2000.

KIM, Y.-I. Folate: a magic bullet or a double edged sword for colorectal cancer prevention? *Gut*, v. 55, n. 10, p. 1387–9, out. 2006.

KNOCK, E. et al. Low dietary folate initiates intestinal tumors in mice, with altered expression of G2-M checkpoint regulators polo-like kinase 1 and cell division cycle 25c. *Cancer research*, v. 66, n. 21, p. 10349–56, 1 nov. 2006.

KRISHNASWAMY, K.; NAIR, K. M. Importance of folate in human nutrition. *British Journal of Nutrition*, v. 85, n. S2, p. S115, 9 mar. 2007.

KRUMDIECK, C. L.; HOWARD-PEEBLES, P. N. On the nature of folic-acid-sensitive fragile sites in human chromosomes: an hypothesis. *American journal of medical genetics*, v. 16, p. 23–28, 1983.

LIGHTFOOT, T. J. et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with polymorphisms in folate-metabolizing genes. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, v. 14, n. 12, p. 2999–3003, dez. 2005.

MCPARTLIN, J. et al. Accelerated folate breakdown in pregnancy. *Lancet*, v. 341, p. 148–149, 1993.

MÜLLER, C.; SCHUBIGER, P. A.; SCHIBLI, R. In vitro and in vivo targeting of different folate receptor-positive cancer cell lines with a novel ^{99m}Tc-radiofolate tracer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, v. 33, n. 10, p. 1162–70, out. 2006.

NAZKI, F. H.; SAMEER, A. S.; GANAIE, B. A. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*, v. 533, n. 1, p. 11–20, 1 jan. 2014.

PETERSEN, L. F. et al. Elevated physiological levels of folic acid can increase in vitro growth and invasiveness of prostate cancer cells. *BJU international*, v. 109, n. 5, p. 788–95, mar. 2012.

POGRIBNY, I. P. et al. Genomic hypomethylation is specific for preneoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. *Mutation research*, v. 548, n. 1-2, p. 53–9, 14 abr. 2004.

RUSSELL, P. J.; KINGSLEY, E. A. Human Prostate Cancer Cell Lines. v. 81, n. 12, [s.d.].

RYCYNA, K. J.; BACICH, D. J.; O'KEEFE, D. S. Opposing roles of folate in prostate cancer. *Urology*, v. 82, n. 6, p. 1197–1203, dez. 2013.

STEMPAK, J. M. et al. Cell and stage of transformation-specific effects of folate deficiency on methionine cycle intermediates and DNA methylation in an in vitro model. *Carcinogenesis*, v. 26, n. 5, p. 981–90, maio 2005.

STEVENS, V. L. et al. Folate nutrition and prostate cancer incidence in a large cohort of US men. *American Journal of Epidemiology*, v. 163, n. 11, p. 989–996, 1 jun. 2006.

STONE, K. R. et al. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 1978.

STOVER, P. J. Polymorphisms in 1-carbon metabolism, epigenetics and folate-related pathologies. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*, v. 4, n. 5, p. 293–305, jan. 2011.

TOMASZEWSKI, J. J. et al. Impact of folate intake on prostate cancer recurrence following definitive therapy: Data from CaPSURE™. *Journal of Urology*, v. 191, n. 4, p. 971–976, abr. 2014.

WEIN, A. J. et al. *Campbell-Walsh Urology 10th Edition*. [s.l.: s.n.]. p. 1834–1846

WINKELS, R. M. et al. Bioavailability of food folates is 80 % of that of folic acid 1 – 3. n. 5, 2007.

WRIGHT, G. L. et al. Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. *Urology*, v. 48, p. 326–334, 1996.

YAO, V.; BACICH, D. J. Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) Expression Gives Prostate Cancer Cells a Growth Advantage in a Physiologically Relevant Folate Environment *InVitro*. v. 875, n. August 2005, 2006.