

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DE MARCADORES DE
TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL E SUA CORRELAÇÃO
COM DADOS ANÁTOMO - PATOLÓGICOS E CLÍNICOS DE
PACIENTES COM NEOPLASIAS DE PRÓSTATA
SUBMETIDOS A PROSTATECTOMIA RADICAL**

SAMANTHA VIEIRA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

Co-Orientador: Dr. Stenio de Cássio Zequi

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Vieira, Samantha

Estudo imuno-histoquímico de marcadores de transição epitélio mesenquimal e sua correlação com dados anátomo-patológicos e clínicos de pacientes com neoplasias de próstata submetidos a prostatectomia radical / Samantha Vieira – São Paulo, 2012.

114p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL. 2. IMUNOISTOQUÍMICA. 3. NEOPLASIAS DA PRÓSTATA. 4. PROSTATECTOMIA. 5. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR. 6. CADERINAS. 7. VIMENTINA. 8. FATOR DE TRANSCRIÇÃO TWIST.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas...”

Antoine Saint-Exupéry

“O Senhor é meu pastor e nada me faltará” (Salmo 22)

“Não vos inquieteis com nada! Em todas as circunstâncias apresentai a Deus as vossas preocupações, mediante a oração, as súplicas e a ação de graças. E a paz de Deus, que excede toda a inteligência, haverá de guardar vossos corações e vossos pensamentos, em Cristo Jesus.” (Fl 4, 5-7)

DEDICATÓRIA

Para as minhas amadas filhas Stephanie, Tiffany e Larissa: vocês são a razão da minha vidacom todo o meu amor

Ao meu marido Osmar, pelo apoio incondicional, compreensão e por estar presente em todos os momentos

Á minha amada mãe Tereza, que tem o coração maior do mundo, cuja capacidade de amar seus filhos e netos não tem limites. Eu nunca conseguirei agradecer toda a sua ajuda em todos os momentos da minha vida e sua presença ao meu lado sempre. Muito Obrigada por me ensinar a importância de criar laços com as pessoas e nos momentos de conflito agir sempre com o coração e a verdade.

À minha querida tia e madrinha Clarice, por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade, por toda ajuda com a educação das meninas.

Á Deus....por fortalecer a cada dia a minha fé, proteção, ajudando-me todos os dias a reconhecer todas as graças que recebo, dar oportunidades de fazer o bem e ajudar as pessoas e tomar conta de todos os meus problemas, medos e aflições.

AGRADECIMENTOS

Ao querido Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha, meu orientador e principal incentivador, cujas qualidades sempre irão ser evidenciadas, pela oportunidade de ser sua aluna, pela confiança em mim, no meu trabalho e nas minhas ações. Exemplo de competência, dedicação e persistência em tudo o que dispõe a realizar. É dotado de uma capacidade incrível de transformar o impossível com o seu esforço, carisma e descontração. Tenho muito orgulho de ser sua aluna.

Ao querido Prof. Dr. Stênio de Cássio Zequi, meu co-orientador e incentivador. Todo o seu apoio, ajuda, e comprometimento com o meu trabalho foi fundamental. Agradeço por todos os ensinamentos na área médica, pelo acompanhamento ambulatorial, pela disponibilidade e principalmente por estar presente em todos os momentos que precisei. É um médico e pesquisador formidável que educa os seus alunos mostrando a importância da ética nas ações, palavras e condutas com os pacientes.

Ao meu amado pai Juventino, por me ensinar e mostrar durante a sua vida inteira o valor do trabalho, do esforço e da responsabilidade em tudo o que se propõe a fazer. Agradeço por sempre proporcionar o melhor, dentro de suas condições, para mim e meus irmãos.

À minha querida amiga Marina, minha companheira de jornada e de vida, por todo apoio, por sua amizade e companheirismo incondicional. Agradeço a Deus por você estar presente na minha vida e da minha família. Você é um exemplo de superação e conviver com você todos os dias me faz uma pessoa melhor. Agradeço por me acolher na sua família e por todos os momentos maravilhosos que passamos juntas.

À minha amada irmã Milena, por ser uma super madrinha para as minhas filhas. A sua presença e o seu amor é muito importante para mim.

Ao meu amado irmão Rodrigo, por estar presente na minha vida.

Aos meus amados tios Hélio e Maria Salete, exemplos de altruísmo. Eu não tenho palavras para agradecer todo amor, toda dedicação, e todo o esforço que vocês fazem para estar perto de nós e tudo o que vocês fazem pela nossa família. Eu amo vocês demais e vocês tem grande participação na conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Katia Ramos Moreira Leite, que fez parte de minha banca de qualificação e se tornou a minha “mãe científica”. A sua capacidade de despertar o interesse científico e principalmente o seu compromisso com a verdade são contagiantes. Agradeço por me deixar fazer parte da sua vida, por toda a disponibilidade, por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Francisco Paulo da Fonseca, por todos os ensinamentos na área médica, por todo o aprendizado e convivência no ambulatório, pela disposição de sempre em ajudar, pelo incentivo e estar sempre por perto para tudo o que eu precisei e preocupação com o meu bem estar.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C.Camargo, pela oportunidade de ser uma aluna desta Instituição, por todos os ensinamentos e disponibilidade em ajudar.

Aos queridos funcionários e amigos José Ivanildo Neves, Sueli Nonogaki, Carlos Ferreira Nascimento e Severino da Silva Ferreira, pelo apoio, colaboração, envolvimento com o meu trabalho e momentos de descontração.

Ao Rômulo, do laboratório de TMA, pela colaboração e boa vontade.

À querida Dra. Stephania Bezerra, exemplo de dedicação e responsabilidade cujo envolvimento com este trabalho foi fundamental. Agradeço pelo seu comprometimento e amizade.

Aos queridos amigos e companheiros do grupo: Beatriz Maia, Beatriz Schiavon, André, Iara, Mariana, Érika, Fernanda e Júlio. Agradeço pela colaboração e amizade.

Ao Prof. Dr. Gustavo Guimarães, médico titular do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C.Camargo, pela receptividade no Ambulatório e colaboração.

Ao Dr. Walter Henriques da Costa, pela competente colaboração nas análises estatísticas, pela disposição em ajudar e comprometimento com o meu trabalho.

À pesquisadora Thais Safranov, pela colaboração e disposição de sempre em ajudar.

À querida pesquisadora Ludmilla Chinen, por toda a colaboração no projeto, pela amizade, pela disponibilidade em ajudar sempre com competência e dedicação.

Aos funcionários da Biblioteca do Hospital A.C.Camargo, em especial à Sra. Suely Francisco, pela disponibilidade e ajuda em todas as fases da elaboração deste trabalho, sempre com muita competência e excelência no atendimento.

À equipe da Pós-Graduação: Ana Maria Kuninari, Luciana Pitombeira e Vanuza Barros pela competência, dedicação e disponibilidade em ajudar.

À querida amiga Luciene, pela competência técnica, pela colaboração neste trabalho, pela nossa amizade e disponibilidade de sempre em ajudar.

À querida amiga Carla Luana Dinardo, médica hematologista chefe do setor de Imunohematologia da Fundação Pró Sangue/ Hemocentro de São Paulo, que possui um carisma e competência contagiante, pela nossa amizade, por todos os momentos compartilhados, pela colaboração neste trabalho.

À querida amiga Rute Iamamoto, pela amizade e momentos compartilhados.

RESUMO

Vieira S. **Estudo imuno-histoquímico de marcadores de transição epitélio mesenquimal e sua correlação com dados anátomo-patológicos e clínicos de pacientes com neoplasias de próstata submetidos a prostatectomia radical.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O câncer de próstata ocupa o quinto lugar entre as neoplasias malignas de maior mortalidade, sendo o segundo tipo de câncer mais freqüente diagnosticado em homens principalmente acima dos 50 anos de idade. Alguns dos fenômenos relevantes no entendimento do processo da carcinogênese são alterações genéticas presentes em células neoplásicas, porém a importância dessas alterações é questionável neste carcinoma, bem como a relação destas alterações e a transição epitélio-mesenquimal. A transição epitélio mesenquimal (EMT) é um fenômeno importante durante a embriogênese e desenvolvimento em que as células epiteliais adquirem características mesenquimais com evidente capacidade migratória contribuindo para os processos patológicos como a fibrose e câncer. Assim, a principal dificuldade que o clínico encontra é o grande número de casos diagnosticados no estágio inicial da doença, dos quais uma proporção razoável tem progressão da doença e evoluem para a morte se não forem tratados. Tal progressão pode ser resultado de mutações aleatórias em que um tumor indolente não pode ser distinguido de um tumor agressivo ao longo do tempo do diagnóstico. Para determinar possíveis valores prognósticos para o câncer de próstata, alterações protéicas foram avaliadas. **Material e Métodos:** 100 casos de pacientes portadores de CaP (adenocarcinoma) submetidos à prostatectomia radical foram selecionados do Hospital A C Camargo. Foi realizada a confirmação diagnóstica e a reclassificação e graduação histológica dos tumores em lâminas de hematoxilina-eosina (H&E). Os blocos de parafina foram resgatados para a

confeção das lâminas e submetidos à Imuno-histoquímica para os marcadores E-caderina, Vimentina, Twist1 e Snail1. Ensaios de Western-blot e imunofluorescência em linhagens celulares também foram realizados a fim de verificar a especificidade dos anticorpos Snail 1 e Twist 1. Foi analisado o tempo de sobrevida global (SG), o tempo livre de recidiva bioquímica (SLRB) e o tempo livre de recidiva clínica (SLRC) em relação à expressão dos marcadores e às variáveis clínicas, que foram recuperadas dos prontuários dos pacientes. **Resultados:** Foi demonstrada a associação significativa da perda de E-caderina com o escore de Gleason ($p < 0,001$) e a invasão perineural ($p = 0,003$). A expressão do marcador Vimentina no epitélio tumoral apenas se relacionou com a área de maior Gleason e mostrou associação com a SG ($p = 0,021$), SLRB ($p = 0,02$) e SLRC ($p = 0,047$) em 10 anos. A superexpressão de Twist 1 e Snail 1 não demonstraram associação com as análises de sobrevida realizadas em um seguimento 10 anos. Em contrapartida, a superexpressão de Snail 1 demonstrou associação em relação à expressão de Vimentina ($p = 0,027$) e presença de invasão capsular ($p = 0,018$). A expressão de Twist corrobora a literatura, uma vez que está relacionada com os estádios clínicos TNM III e IV ($p = 0,05$) e com a presença de comprometimento de margem cirúrgica proveniente da prostatectomia radical ($p = 0,046$), indicando maior agressividade tumoral e proliferação celular. **Conclusões:** Dentre os processos que contribuem para a EMT, podemos citar a invasão e extravasamento das células tumorais para os tecidos adjacentes, circulação sanguínea e linfática aos quais pudemos demonstrar o envolvimento dos marcadores analisados neste estudo. A expressão do marcador Vimentina no epitélio tumoral, em especial, se mostrou um potencial marcador prognóstico para adoção na prática clínica, sendo necessária a validação desses achados em maiores séries e por técnicas moleculares mais refinadas.

SUMMARY

Vieira S. **[Immunohistochemical markers of epithelial mesenchymal transition and its correlation with anatomical-pathological and clinical features of patients with prostate cancer undergoing radical prostatectomy]**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Prostate cancer ranks fifth among the highest mortality rate of malignant neoplasms, the second most frequent type of cancer diagnosed in men mostly over 50 years of age. Some of the phenomena relevant in understanding the process of carcinogenesis are genetic alterations present in cancer cells, but the importance of these changes is questionable in this carcinoma and the relationship between these changes and epithelial-mesenchymal transition. The epithelial mesenchymal transition (EMT) is an important phenomenon during embryogenesis and development in which epithelial cells acquire characteristics of mesenchymal characteristics with the acquisition of migratory capacity contributes to pathological processes such as fibrosis and cancer. Thus, the main difficulty is that the clinician is the large number of cases diagnosed in the early stages of the disease, which has a reasonable progression of the disease and progress to death if untreated. This progression may be a result of random mutations in a tumor indolent can not be distinguished from an aggressive tumor over time of diagnosis. To determine possible prognostic value for prostate cancer, protein changes were evaluated. Material and Methods: 100 cases of patients with PCa (adenocarcinomas) undergoing radical prostatectomy were selected from the Hospital AC Camargo. Was performed to confirm the diagnosis and reclassification and histological grading of the tumors on slides with hematoxylin-eosin (H & E). The paraffin blocks were retrieved for the preparation of slides and subjected to immunohistochemistry for the markers E-cadherin, Vimentin, Snail1 and Twist1. Tests Western blot and

immunofluorescence cell lines were also performed to verify the specificity of an antibody Snail 1 and Twist 1. We analyzed the overall survival (OS), time free of biochemical recurrence (SLRB) and clinical relapse-free time (SLRC) in relation to the expression of markers and clinical variables, which were retrieved from patient charts. Results: There was a significant association between loss of E-cadherin with the Gleason score ($p = <0.001$) and perineural invasion ($p = 0.003$). Expression of Vimentin in epithelial tumor marker was related to only the area of highest Gleason and showed association with overall survival ($p = 0.021$), SLRB ($p = 0.02$) and SLRC ($p = 0.047$) in 10 years. Overexpression of Snail and Twist 1 1 showed no association with survival analyzes carried out in a follow-up 10 years. In contrast, overexpression of Snail showed an association to Vimentin expression ($p = 0.027$) and presence of capsular invasion ($p = 0.018$). The expression of Twist supports the literature, since it is related to the clinical stages III and IV TNM ($p = 0.05$) and the presence of compromised surgical margin from radical prostatectomy ($p = 0.046$), indicating more aggressive and tumor cell proliferation. Conclusions: Among the processes that contribute to EMT, we can mention the invasion and extravasation of tumor cells into the surrounding tissue, blood and lymph circulation which could demonstrate the involvement of the markers analyzed in this study. Expression of Vimentin in epithelial tumor marker, in particular, proved to be a potential prognostic marker for adoption in clinical practice is needed to validate these findings in larger series and more refined molecular techniques.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de carcinogênese para o desenvolvimento do carcinoma de próstata.....	10
Figura 2	EMT: Modificação de um fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal.....	20
Figura 3	Atuação da EMT no desenvolvimento da mesoderme e crista neural.....	21
Figura 4	Os três subtipos biológicos baseados nas diferenças funcionais e contexto biológico que envolvem a EMT.....	26
Figura 5	Epitélio tumoral com expressão do marcador E-caderina classificado como “mais forte” em relação ao epitélio glandular prostático.....	49
Figura 6	Epitélio tumoral mostrando dois padrões de expressão do marcador E-caderina.....	50
Figura 7	Epitélio tumoral com ausência de expressão do marcador Vimentina.....	52
Figura 8	Epitélio tumoral mostrando a presença de expressão do marcador Vimentina.....	53
Figura 9	Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 3 mostrando a expressão do marcador Twist 1.....	55
Figura 10	Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 4 mostrando a expressão do marcador Twist 1.....	56

Figura 11	Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 5 mostrando a expressão do marcador Twist 1.....	57
Figura 12	Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 3 mostrando a expressão do marcador Snail 1.....	60
Figura 13	Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 4 mostrando a expressão do marcador Snail 1.....	60
Figura 14	Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 5 mostrando a expressão do marcador Snail 1.....	61
Figura 15	Presença de marcação nuclear indicando o marcador Twist 1 na linhagem celular DU-145.....	64
Figura 16	Presença de marcação nuclear e citoplasmática indicando o marcador Snail 1 na linhagem celular DU-145.....	65
Figura 17	Western-blot em células HEK293 do anticorpo Twist 1 mostrando a banda da respectiva proteína.....	66
Figura 18	Western-blot em células DU-145, em diferentes concentrações de lisado protéico no anticorpo Snail 1 mostrando a banda da respectiva proteína.....	66
Figura 19	Curva de sobrevida global em 120 meses para os 99 pacientes portadores de CaP.....	67
Figura 20	Curva de sobrevida global em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo e positivo de expressão de Vimentina.....	69

Figura 21	Curva de sobrevida global em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo, mais fraco e mais forte de expressão de E-caderina.....	70
Figura 22	Curva de sobrevida global em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados $\geq 0,1$ (positivo) e $<0,1$ (negativo) de expressão de Snail 1.....	71
Figura 23	Curva de sobrevida global em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em ≥ 286000 (positivo) e <286000 (negativo) de expressão de Twist 1.....	71
Figura 24	Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 120 meses para os 99 pacientes portadores de CaP.....	73
Figura 25	Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo e positivo de expressão de Vimentina.....	75
Figura 26	Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo, mais fraco e mais forte de expressão de E-caderina.....	76
Figura 27	Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados $\geq 0,1$ (positivo) e $<0,1$ (negativo) de expressão de Snail 1.....	76
Figura 28	Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em ≥ 286000 (positivo) e <286000 (negativo) de expressão de Twist 1.....	77

Figura 29	Curva de sobrevida livre de recidiva clínica em 120 meses para os 99 pacientes portadores de CaP.....	78
Figura 30	Curva de sobrevida livre de recidiva clínica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo e positivo de expressão de Vimentina.....	80
Figura 31	Curva de sobrevida livre de recidiva clínica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo, mais fraco e mais forte de expressão de E-caderina.	81
Figura 32	Curva de sobrevida livre de recidiva clínica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados $\geq 0,1$ (positivo) e $<0,1$ (negativo) de expressão de Snail 1.....	82
Figura 33	Curva de sobrevida livre de recidiva clínica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em ≥ 286000 (positivo) e <286000 (negativo) de expressão de Twist 1.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização dos pacientes.....	37
Tabela 2	Anticorpos primários utilizados na Imuno-histoquímica.....	39
Tabela 3	Expressão de E-caderina em relação às variáveis clínicas e patológicas.....	51
Tabela 4	Expressão de Vimentina em relação às variáveis clínicas e patológicas.....	54
Tabela 5	Expressão de Twist 1 em relação às variáveis clínicas e patológicas.....	58
Tabela 6	Expressão de E-caderina em relação à expressão de Twist 1.	59
Tabela 7	Expressão de Vimentina em relação à expressão de Twist 1...	59
Tabela 8	Expressão de Snail 1 em relação às variáveis clínicas e patológicas.....	62
Tabela 9	Expressão de E-caderina em relação à expressão de Snail 1	63
Tabela 10	Expressão de Vimentina em relação à expressão de Snail 1...	63
Tabela 11	Probabilidade acumulada da sobrevida global em 10 anos de acordo com as variáveis clínicas e patológicas em 99 pacientes portadores de CaP.....	68
Tabela 12	Associação das expressões dos marcadores à sobrevida global em 10 anos.....	70

Tabela 13	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.....	72
Tabela 14	Risco de óbito em 99 pacientes portadores de CaP. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	72
Tabela 15	Probabilidade acumulada da sobrevida livre de recidiva bioquímica em 10 anos de acordo com as variáveis clínicas e patológicas em 99 pacientes portadores de CaP.....	74
Tabela 16	Associação das expressões dos marcadores à sobrevida livre de recidiva bioquímica em 10 anos.....	75
Tabela 17	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.....	77
Tabela 18	Risco de recidiva bioquímica em 99 pacientes portadores de CaP. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	78
Tabela 19	Probabilidade acumulada da sobrevida livre de recidiva clínica em 10 anos de acordo com as variáveis clínicas e patológicas em 99 pacientes portadores de CaP.....	79
Tabela 20	Associação das expressões dos marcadores à sobrevida livre de recidiva clínica em 10 anos.....	80
Tabela 21	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.....	83
Tabela 22	Risco de recidiva clínica em 99 pacientes portadores de CaP. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACT	α 2- antitripsina
AR	Receptor de andrógeno
BPH	Hiperplasia prostática benigna
CaP	Câncer de próstata
DAB	Diaminobenzidine
DDR2	Receptor domínio de tirosina quinase 2
EMT	Transição epitélio-mesênquima
FGF	Do inglês, <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FSP	Do inglês, <i>Fibroblast Specific Protein</i>
H&E	Hematoxilina / Eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MEC	Matriz extra celular
MET	Transição mesenquimal-epitelial
MG	Macroglobulinas
MMP	Do inglês, <i>Matrix Metalloproteinase</i>
NE	Células neuroendócrinas
PBS	Do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>
PIA	Atrofia proliferativa inflamatória
PIN	Neoplasia intra-epitelial prostática
PSA	Antígeno específico da próstata
RR	Riscos Relativos
SG	Sobrevida global
SLRB	Sobrevida livre de recidiva bioquímica
SLRC	Sobrevida livre de recidiva clínica
SLUG	Do inglês, <i>Zinc finger protein SNAI 2</i> ou <i>Protein snail homolog 2</i>
SNAIL	Do inglês, <i>Zinc finger protein</i> ou <i>Protein snail homolog 1</i>
SPSS	Do inglês, <i>Statistical Package for Social Science</i>
TNM	Estadio do tumor primário (T), presença de linfonodos positivos (N) e metástase (M)

INDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Próstata.....	1
1.2	A Transição Epitélio – Mesênquima (EMT)	19
1.3	E-caderina	27
1.4	Fatores de transcrição: Twist e Snail1	29
1.5	Vimentina.....	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	Pacientes e espécimes anátomo-patológicas.....	34
3.1.1	Critérios de Inclusão	35
3.1.2	Critérios de Exclusão.....	36
3.1.3	Exame Anátomo-patológico.....	36
3.1.4	Caracterização da amostra.....	36
3.2	Imuno-histoquímica (IHQ).....	38
3.3	Interpretação das reações de Imuno-histoquímica.....	40
3.4	Cultura da linhagem celular humana de câncer de próstata DU-145	43
3.5	Imunofluorescência	44
3.6	Western-blot	45
3.7	Análise estatística.....	46
4	RESULTADOS.....	48
4.1	Imuno-histoquímica	48
4.2	Imunofluorescência (ICC/IF).....	63
4.3	Western Blot	66
4.4	Análise de Sobrevida.....	67

4.4.1	Sobrevida global (SG)	67
4.4.2	Sobrevida Livre de Recidiva Bioquímica (SLRB).....	73
4.4.3	Sobrevida Livre de Recidiva Clínica (SLRC)	78
5	DISCUSSÃO	84
5.1	Aspectos Gerais	84
5.2	Varáveis Clínicas e Patológicas	88
5.3	E-caderina	92
5.4	Vimentina.....	95
5.5	Fatores de Transcrição: Twist1 e Snail1	97
6	CONCLUSÕES	103
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PRÓSTATA

A. Generalidades

O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia não cutânea mais frequente na população masculina e ocupa o quinto lugar entre as neoplasias malignas mundial. Para 2012, o Instituto Nacional do Câncer-INCA estimou 62.180 casos novos da doença correspondendo a um risco estimado de 62 casos novos a cada 100 mil homens sendo considerada a segunda causa de óbito por câncer em homens perdendo apenas para o câncer de pulmão em número de óbitos (Ministério da Saúde 2011). A incidência do CaP varia entre países e etnia das populações considerando hipóteses biológicas, ambientais e sociais para explicar estas diferenças baseadas nos mecanismos de iniciação, promoção ou progressão do tumor, predisposição genética, dieta rica em gorduras, altos níveis de testosterona, alto índice de massa corpórea, sendo raramente diagnosticado em homens abaixo de 50 anos, grande parte de incidência entre 70 a 74 anos e 85% dos casos diagnosticados após 65 anos (KHAMIS et al. 2011).

Embora as causas específicas do início do CaP ainda não estão elucidadas, evidências sugerem que fatores ambientais e genéticos estão envolvidos na origem e evolução da doença sendo que o risco relativo

aumenta de acordo com o número de indivíduos da família afetados, o grau de parentesco e a idade em que foram acometidos (BRATT 2002) .

A próstata é uma glândula tubular-alveolar formada por um compartimento estromal circundante acino–glandular composta por duas camadas (basal e luminal secretória) epiteliais. O compartimento estromal contém uma variedade de células incluindo nervos, fibroblastos, infiltração linfocitária e macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas. No compartimento epitelial encontram-se dispersas as células neuroendócrinas. O epitélio é composto por várias unidades de células tronco que possuem capacidade de auto-renovação ilimitada e raramente proliferam, mas sofrem diferenciação tornando-se transientes-amplificadoras ou células neuroendócrinas. As células transiente-amplificadoras diferenciam-se em células secretórias luminais ou células basais. As células neuroendócrinas (NE) prostáticas são encontradas intraglandular e intraducta, possuem características híbridas epitelial, neural e endócrina, expressam e secretam serotonina e peptídeos/neuropeptídeos. As células NE encontram-se dispersas em células individuais ou em pequenos “ninhos” entre as células epiteliais basais e luminais em toda a próstata e ocasionalmente apenas uma célula por glândula ou ducto. Elas não estão distribuídas uniformemente na próstata, mais encontradas nos ductos perineurais e verumontanum, e são encontradas em maior quantidade na zona de transição e periférica em relação à zona central sugerindo que podem estar envolvidas nos processos de doenças associados à estas áreas como por exemplo a hiperplasia prostática benigna e o CaP, sendo que o número de

células NE varia de indivíduo para indivíduo com uma pequena porcentagem de próstatas humanas que contém grande quantidade delas (SUN et al. 2009).

A neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), caracterizada por mudanças arquitetural e nuclear nas células epiteliais luminiais com manutenção do epitélio e membrana basal é considerada por alguns estudos uma lesão precursora para o adenocarcinoma. A atrofia proliferativa inflamatória (PIA) é uma lesão recentemente estabelecida como sendo precursora candidata a PIN e/ ou CaP na hipótese que a inflamação desempenha um papel importante no CaP. O CaP é frequentemente multifocal, com vários focos distintos de PIN e/ou CaP encontrados na glândula prostática expressando diferentes graus de displasia celular e desorganização do tecido (TOMLINS et al. 2006).

O CaP raramente apresenta sintomas no curso da doença devido ao fato de que a maioria dos adenocarcinomas localizam-se na periferia da glândula distante da uretra sendo que a presença de sintomas sistêmicos (dor óssea, falência renal, anemia) sugerem que a doença está localmente avançada ou progredindo para doença metastática. O crescimento do CaP dentro da uretra ou bexiga resulta em sintomas obstrutivos e irritativos à micção, enquanto que a invasão local do CaP pode envolver o trígono da bexiga e levar a obstrução uretral que, se bilateral, pode causar insuficiência, renal enquanto que a progressão local da doença e obstrução dos ductos ejaculatórios causam hematospermia e diminuição do volume ejaculatório.

A doença metastática envolvendo o esqueleto axial ou apendicular pode causar dor óssea ou anemia em função do comprometimento da medula óssea ou microfraturas. Já a presença de edema em extremidades inferiores é resultado do envolvimento de linfonodos pélvicos e compressão das veias ilíacas ou linfáticas enquanto que fibrose maligna retroperitoneal em função da disseminação das células cancerígenas nos vasos linfáticos periuretral, síndromes paraneoplásicas por produção de hormônio ectópico e coagulação intravascular disseminada são achados menos comuns da doença metastática.

O diagnóstico é baseado no antígeno específico da próstata (PSA) e no exame clínico. Se o resultado apresentar qualquer suspeita de câncer é indicada biópsia, único meio diagnóstico (transretal guiada por ultrassom). Desta forma, os dados obtidos através desses testes independentes (exame digital retal, PSA, ultrassom e biópsia transretal) são levados em conta para decidir a estratégia de tratamento para cada indivíduo sendo que na maioria dos casos é indicada a ressecção cirúrgica ou radioterapia. Nos casos de estágio inicial da doença, nos quais a biópsia revela lesão mínima de baixa agressividade, em que o tumor é pequeno (em tamanho), pode ser indicada a vigilância ativa através do acompanhamento com exames clínicos de rotina e intervenção terapêutica postergada.

O PSA é uma glicoproteína 33 kDa que pertence a família calicreína e atua como uma serina protease. É produzido inicialmente pelas células epiteliais prostáticas luminiais e sua função como protease regulada por andrógeno é tornar o sêmen liquefeito através de sua ação em proteínas

formadoras de gel como a semenogelina e fibronectina no sêmen durante a ejaculação. O PSA é normalmente encontrado em baixa concentração no soro (ng/mL) sendo que a maioria do PSA circulante encontra-se ligado a um complexo de antiproteases α_2 -antiquimotripsina (ACT) e macroglobulinas (MG). O PSA livre sem a atividade proteolítica torna-se inativo dentro das células epiteliais prostáticas antes de ser lançado no soro e este PSA livre circulante é inativo e além de não formar complexos com as antiproteases.

O nível de PSA elevado no soro é um produto do rompimento da arquitetura celular dentro da glândula prostática, onde a perda da barreira da camada e membrana basal dentro da glândula normal possibilita a entrada do PSA dentro da circulação. Isto pode ocorrer em diversas doenças prostáticas (BPH, prostatite e o CaP) ou por manipulação prostática (massagem ou biópsia prostática) sendo que no caso de inflamação prostática (aguda e crônica) e retenção urinária entre outras, e também podem causar elevações nos níveis do PSA.

Apesar de ter mudado a história do câncer de próstata o PSA é um marcador órgão-específico, mas não doença-específico, podendo se alterar em caso de prostatite e hiperplasia benigna. Níveis acima de 2,5ng/mL a 4,0 ng/mL são indicativos de biópsia, onde o câncer é detectado em apenas 25 a 30%. Assim, com um marcador mais específico grande parte dos homens poderia ser poupados da biópsia.

O grau do tumor refere sua característica histológica enquanto o estágio refere a sua extensão. O grau do CaP é baseado no sistema de

Gleason, uma escala de medição que tem como parâmetro de 1 (mais bem diferenciado) a 5 (pouco diferenciado) demonstrando as características arquiteturais do tumor devido as características citológicas do alargamento nuclear e nucléolo proeminente que são bastante constantes. O sistema de Gleason reconhece a heterogeneidade do CaP atribuindo um grau primário e um grau secundário, que pode ser igual ou diferente, sendo que o grau primário é baseado no padrão mais frequente observado enquanto que o grau secundário é baseado no segundo padrão mais frequente. A soma destes dois graus é o escore de Gleason variando de 2 a 10. Na prática, os graus 1 e 2 quase nunca são usados e o grau 5 é raro, portanto a maioria dos cânceres são graduados $3+3=6$, $3+4=7$ ou $4+3=7$. Além da graduação, outro determinante do resultado histopatológico é o estágio do tumor de acordo com o sistema tumor- nódulos- metástase (TMN) demonstrando que o estágio T1 estabelece o tumor clinicamente indetectável por imagem ou exame físico na próstata, diagnosticado na ressecção transretal ou necessidade de biópsia devido ao aumento do PSA. O estágio T2 refere que o tumor está confinado à próstata e é subdividido em T2a, T2b e T2c. O estágio T3 refere um tumor infiltrativo além da cápsula prostática indicando 3a dentro da extensão extraprostática e 3b indicando espalhamento unilateral na vesícula seminal. O acometimento da bexiga ou reto é o estágio T4. O envolvimento de linfonodos pélvicos ou inguinais é denominado N1 sendo que N0 significa que não há envolvimento. O tumor metastático é denominado M1 e M0 significa a ausência de metástases (QIAN et al. 1997; KHAMIS et al. 2011).

Os critérios prognósticos hoje utilizados são o nível sérico de PSA, o estágio clínico e o escore de Gleason. A estratificação baseada nesses parâmetros resulta em grupos de tumores que representam tanto a baixa probabilidade de progressão, em que nenhuma terapia será indicada nos casos de tumores que requeiram tratamentos uni ou multinodais e até mesmo aqueles em que os cuidados paliativos serão tomados devido à impossibilidade de cura. Porém esses critérios prognósticos tradicionais apresentam importantes imperfeições, limitando a sua utilidade na prática clínica (DAMBER e AUS 2008).

Uma vez que o CaP é diagnosticado clinicamente ocorre uma incerteza em relação aos vários tipos diferentes de tratamentos disponíveis e isso se atribui a falta de estudos randomizados que investigam as diferentes opções sendo que poucos estudos prospectivos conseguem chegar até o final por causa da dificuldade de recrutamento de pacientes para tal finalidade e o tempo necessário para a obtenção de resultados devido a longa evolução clínica da doença. O tratamento padrão ainda é muito discutido sendo que o básico e fundamental desafio no CaP é a separação prospectiva de tumores indolentes que exigem pouco tratamento daqueles que irão progredir, metastatizarem e causar morte antecipadamente (BERNEY e CHENG 2012).

Deste modo, a busca de marcadores específicos, diagnósticos e prognósticos para o câncer de próstata tem sido incessante, e os marcadores moleculares são uma grande fonte de expectativas (BERNEY e CHENG 2012).

B. A Biologia Molecular do Câncer de Próstata

O CaP é convencionalmente dividido em três fenótipos: esporádico, familiar e hereditário sendo que os casos esporádicos compreendem 85% dos casos e 15% são hereditários e familiar. O câncer esporádico ocorre em indivíduos com história familiar negativa (e por vezes desconhecida) enquanto que o familiar é definido como câncer em homens com um ou mais parentes afetados. Já o CaP hereditário é um subconjunto do tipo familiar e é definido como grupos familiares com três ou mais membros afetados e CaP em três gerações sucessivas ou dois indivíduos afetados diagnosticados com a doença antes dos 55 anos de idade (BERNEY e CHENG 2012).

As evidências genéticas de susceptibilidade para o CaP segregados em famílias foram obtidas de vários complexos de análises de segregação com a maioria mostrando herança dominante sendo o restante recessivo ou ligado ao cromossomo X. Deste modo, oito genes candidatos com susceptibilidade ao CaP tem sido mostrados: **RNase L/HPC1** (ribonuclease que degrada RNA viral e celular relacionado com apoptose e susceptibilidade para infecção), **ELAC2/HPC2** (hidrolase dependente de metal, sem função definida), **SR-A/MSR1** (relacionado com inflamação e susceptibilidade a infecção), **CHEK2** (envolvido na sinalização de danos do DNA e controle do ciclo celular), **BRCA2** (relacionado com reparo do DNA), **PON1** (antioxidante e liberação de radicais livres), **OGG1** (reparo do DNA por danos oxidativos), **MIC1** (inflamação) (BERNEY e CHENG, 2012).

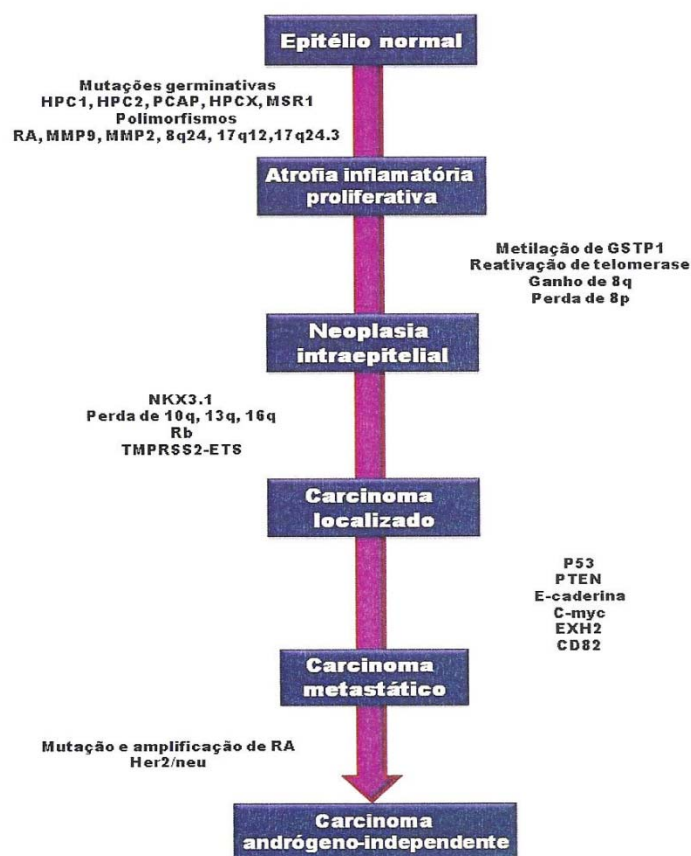
Outros estudos de segregação sugerem a existência de outros *loci* cromossômicos envolvidos na susceptibilidade do CaP como por exemplo 1q42.2-43 (*PCAP*), 1p36(*CAPB*) e Xq27-28, embora os genes envolvidos nestas regiões ainda não terem sido identificados.

Apesar de se acreditar que a hereditariedade tenha um papel importante no CaP, todas as análises de associação têm-se mostrado fracas e não reprodutíveis em diferentes populações. Especula-se que esta dificuldade na identificação de genes de alta penetrância se deve ao início tardio da neoplasia, que torna difícil a identificação do acometimento de mais de duas gerações sucessivas, e à alta incidência do tumor, que pode considerar fenocópias como segregações familiares. Outra dificuldade é a ausência de diferenças fenotípicas entre os carcinomas esporádicos e hereditários.

O CaP contém um grande número de alterações somáticas no genoma que contribuem para o fenótipo do câncer. Estas alterações podem ser genéticas (mudanças na sequência do DNA) como mutações pontuais, amplificações e translocações ou epigenéticas (mudanças no fenótipo da células que são herdadas através da divisão celular mas não tem como resultado a mudança da sequência do DNA) como por exemplo mecanismos que incluem a metilação de resíduos de deoxicitidina dentro de dinucleotídeos CpG, modificações de histonas (como acetilação e metilação, RNA de interferência) e modificações na metilação de deoxycitidina e estrutura da cromatina (HUGHES et al. 2005b). Um modelo

de carcinogênese foi proposto por BOSTWICK et al. (1996) e está atualizado no presente texto (Figura 1).

A maioria dos CaP são esporádicos e de acordo com a patologia molecular podem ser divididos nas seguintes categorias: polimorfismos associados ao risco de aumento do CaP, alterações somáticas genéticas e fatores envolvidos na progressão da doença, como os receptores de andrógenos, fatores de crescimento e genes relacionados à invasão e metástases.



Fonte: Adaptado de BOSTWICK et al. (1996)

Figura 1 - Modelo de carcinogênese para o desenvolvimento do carcinoma de próstata.

b.1. Polimorfismos genéticos associados com aumento do risco de desenvolvimento do CaP

TLR4: codifica um receptor que desempenha função importante nas vias de sinalização de resposta imune inata à infecção por bactérias Gram negativas, **CDKN1B:** pertence a família Cip/Kip, cuja função está relacionada com a perda de controle do ciclo celular promovendo a carcinogênese, receptor de andrógeno (AR): o crescimento celular depende de andrógenos e os genes envolvidos tem um papel importante na indução da estimulação de andrógeno da glândula prostática. O receptor androgênico, que tem oito éxons, é um membro da família dos fatores de transcrição e está localizado no cromossomo Xq11-12 sendo que polimorfismos neste gene têm sido relacionados a uma maior ou menor predisposição ao CaP. O éxon 1 contém uma área de repetição de poliglutamina (CAG)_n, cujo comprimento é inversamente relacionado à atividade transcripcional dos genes-alvos; assim quanto menor a zona de polimorfismo, maior a sensibilidade ao andrógeno. Isto explica parcialmente a maior incidência e maior gravidade da doença em afroamericanos, que possuem uma sequência CAG curta (correlacionada com alto grau, alto estágio, metástase e CaP fatal), e menor incidência entre os asiáticos que possuem longa e são menos acometidos por este tipo de neoplasia. Na população brasileira foi demonstrado que repetições CAG menores que 21 representam um risco de 2,44 para o desenvolvimento da doença.

CY17: codifica o citocromo P-450c17 α , uma enzima responsável pela biossíntese da testosterona. Este alelo está relacionado com o aumento da transcrição gênica, aumento da produção de andrógeno e aumento do risco da doença.

SRD5A2: codifica uma isoenzima predominante de 5 α - redutase na próstata que converte a testosterona ao mais potente di-hidrotestosterona. Os alelos que codificam estas enzimas estão associados com aumento do risco e pior prognóstico da doença.

As proteínas transcritas pelos genes das metaloproteinases 1, 2, 7 e 9 estão envolvidos em todas as etapas da carcinogênese, desde a facilitação do crescimento, invasividade e angiogênese até a invasão dos vasos, sobrevivência na circulação e estabelecimento os sítios metastáticos. Foi demonstrado que o genótipo heterozigoto da **MMP2** no SNP-1306C $\rightarrow$ 7 aumenta em duas vezes a incidência da neoplasia, e o genótipo homozigoto polimórfico do gene **MMP9** (Arg279Gln) se relacionou com um risco 140 vezes maior de desenvolvimento do tumor (REIS et al.2009), **receptor de Vitamina D:** as concentrações fisiológicas de vitamina D promovem a diferenciação e crescimento das células do CaP. As diferenças alélicas no gene receptor de vitamina D (**VDR**) resulta na variação da atividade **VDR** e estes alelos tem sido significativamente associados com a doença tendo sua associação nos casos mais avançados da doença (HUGHES et al. 2005a).

b.2. Genes supressores de tumor e perda de heterozigosidade

Estes genes estão envolvidos nas vias da carcinogênese. A perda de genes supressores de tumor foi inicialmente proposta, ocorre via perda de função dos dois alelos por mutação ou deleção e atualmente estão incluídas modificações epigenéticas por inativação de um ou ambos os alelos por metilação do DNA nas ilhas CpG dos genes promotores, baixa regulação da função de herdabilidade ou comprometimento de uma forma clonal. As mudanças podem ser por mutação, metilação no promotor ou por alguma modificação no produto proteico e devem estar associadas com evidências de que o gene normal reprime o crescimento das células tumorais.

Glutadiona S- transferase (GSTP1): as metilações das ilhas CpG do gene *GSTP1* já são observadas na neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e ocorrem em mais de 90% dos carcinomas. O gene *GSTP1* codifica a enzima Glutadiona-S-transferase que protege o DNA das lesões ocasionadas por uma série de elementos carcinogênicos, levando a um stress oxidativo, mantendo a integridade do genoma e impedindo a estabilidade cromossômica. A ausência da proteína devido ao silenciamento do gene pela metilação aberrante permite a lesão do gene pelos carcinógenos como PhIP e agentes oxidantes propiciando a mutagenicidade.

PTEN: é um gene codifica uma fosfatase ativa diante de substratos de lipídios e proteínas tornando-se alvo comum de alterações somáticas durante a progressão do CaP. Está presente nas células epiteliais normais e na neoplasia prostática intraepitelial (PIN) e no CaP as concentrações do

PTEN estão reduzidas principalmente nos casos de alto grau da neoplasia. O mecanismo que o gene pode atuar como supressor de tumor na próstata envolve a inibição da via de sinalização do fosfatidilinositol 3'-proteína quinase B (P13K-Akt) que é essencial para a progressão e sobrevivência celular.

CDKN1B (p27): concentrações reduzidas de *p27*, uma ciclina dependente de inibidor de quinase codificada pelo gene *CDKN1B*, é comum em CaP, principalmente nos casos de pior prognóstico.

NKX3.1: este gene se liga ao DNA e reprime a expressão do gene do PSA e a perda de expressão está relacionada com o aumento da concentração do PSA causando a progressão da doença.

KLF6: o Kruppel – like (KLFs) é um grupo de fatores de transcrição envolvido nos processos biológicos como a carcinogênese. As alterações genéticas neste gene como deleções e perda de expressão estão relacionadas com CaP de alto grau.

Retinoblastoma (Rb): o rompimento da via normal regulatória do *Rb* está associada com a patogênese de muitos cânceres porque desempenha um papel importante na fase G1 do ciclo celular. A proteína *Rb* se liga fortemente a família E2F de fatores de transcrição e quando fosforilados, a proteína *Rb* libera as proteínas E2F causando ativação transcrricional de uma variedade de genes envolvidos no ciclo celular e a inativação do *Rb* está relacionada com a transformação neoplásica por causa da expressão do *Rb* normal com *Rb* negativo em linhagens de CaP resultando na perda de tumorigenicidade (BERNEY e CHENG 2012).

P53: este gene limita a entrada da fase de síntese do ciclo celular e promove a apoptose nas células que estão desorganizadas ou tem dano no DNA e a perda da função normal do gene resulta no crescimento celular descontrolado. As mutações neste gene são comuns em neoplasias sendo que no CaP ocorre em baixa frequência relacionado à progressão da doença, doença metastática e crescimento independente de andrógeno.

b.3. Oncogenes

O incremento de função de genes normais por mutação, amplificação ou translocação promove um aumento na proliferação ou diminuição na morte programada, favorecendo a promoção e progressão da neoplasia. Algumas anormalidades neste grupo de genes tem sido descritas no CaP :

TMPRSS2-ETS: a fusão do gene *TMPRSS2* regulado pelo andrógeno e genes da família de transcrição ETS é uma das alterações genéticas mais frequentes no CaP, detectada em 50% a 80% dos casos. A anormalidade mais descrita é a fusão *TMPRSS2-ERG*, ambos localizados no cromossomo 21q22, determinada por uma deleção. A proteína truncada, resultado da fusão *TMPRSS2-ERG*, parece ocorrer entre PIN e o carcinoma invasivo. Clinicamente esta alteração molecular tem sido relacionada com tumores de mais alto grau histológico e aumento da mortalidade câncer-específica e ainda têm-se associado a um padrão morfológico específico, principalmente secreção de mucina e padrão em anel de sinete. A detecção

da translocação no sangue e na urina pode constituir uma nova metodologia para avaliação diagnóstica para o CaP .

c-Myc: gene que codifica proteína envolvida no crescimento, diferenciação e apoptose. Encontra-se amplificado no CaP, principalmente nos tumores metastáticos e hormônio- independentes.

BCL2: a família *BCL2* está geralmente expressa em CaP primário e metastáticos . Embora o gene *BCL2* não está expresso na próstata normal, ele está envolvido no desenvolvimento do CaP andrógeno independente por causa do aumento de expressão nos cânceres andrógeno independentes em estádios avançados . As proteínas da família *BCL2* desempenham função importante na morte celular programada (BERNEY e CHENG 2012).

RAS: importante em muitos tumores humanos, a mutação mais comum no códon 12 mantém sua atividade constitutiva, impedindo seu retorno a condição GDP, mantendo a via de sinalização MAPquinase permanentemente ativa, perpetuando a informação de proliferação. A mutação de *RAS* é um evento raro e tardio em CaP.

MDM2: gene transcrito por ação da proteína *P53* que tem como papel a inibição da mesma, caracterizando uma alça de *feedback* negativo. Estudando 118 pacientes demonstramos que *MDM2* foi expressa por 40,1% dos CaP com associação a aumentada atividade proliferativa e maior volume tumoral .

Her2/NEU: ou EGFR2: é um receptor tirosina quinase amplificado em 30% dos carcinomas de mama e relacionados a mau prognóstico. Em próstata, os resultados são controversos, sendo descrita amplificação em

um quarto dos tumores primários e em quase 80% dos tumores hormonioresistentes sendo que os estudos ainda são poucos.

b.4. Atividade da telomerase

Os telômeros estabilizam e protegem as extremidades dos cromossomos podendo ser reduzidos por causa da divisão celular e/ ou danos oxidativos. O desgaste desta estrutura pode causar instabilidade cromossômica levando a um aumento da incidência de câncer como resultado de fusões, quebras e rearranjos cromossômicos. A telomerase é uma enzima que realiza a manutenção dos telômeros adicionando sequencias teloméricas repetitivas no final dos cromossomos protegendo do desgaste contínuo a cada replicação do DNA. Um evento precoce no desenvolvimento da neoplasia é a reativação da telomerase e mais de 90% dos tumores readquirem a atividade da enzima incluindo o CaP.

b.5. Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são importantes no desenvolvimento, regulação e crescimento normal da próstata e a expressão anormal de membros das famílias de fatores de crescimento estão associada a progressão do CaP.

Interleucina 6: é uma citocina multifuncional que ativa o mitógeno STAT pela via de sinalização proteína quinase (MAPK) modulando o

crescimento celular e apoptose. A IL-6 tem função importante na interação entre as células estromais e epiteliais no CaP e os valores de IL-6 estão alterados nos tecidos e soro dos pacientes mostrando a detecção da expressão do receptor de IL-6 em linhagens celulares de CaP e espécimes clínicas.

b.6. Genes supressores de metástases

As mudanças na adesão ao substrato são essenciais para a invasão tumoral e metástases a distância.

KAI-1/CD82: codifica uma proteína de superfície celular da superfamília das tetraspaninas e tem sido correlacionada com o potencial metastático de vários cânceres incluindo o CaP. As células tumorais que expressam KAI-1 se ligam a DARC, uma proteína de superfície das células endoteliais, o que resulta na inibição da proliferação e indução da senescência celular.

CD44: molécula de adesão uniformemente expressa nas células normais da próstata. A diminuição da expressão está relacionada com tumores de alto grau, aneuplóides e com presença de metástase a distância.

EZH2: exerce uma função regulatória sobre a diferenciação e proliferação celular, embriogênese e inativação do cromossomo X. É encontrado em maior concentração no CaP metastáticos em relação ao tumor primário.

b.7. Micro RNA:

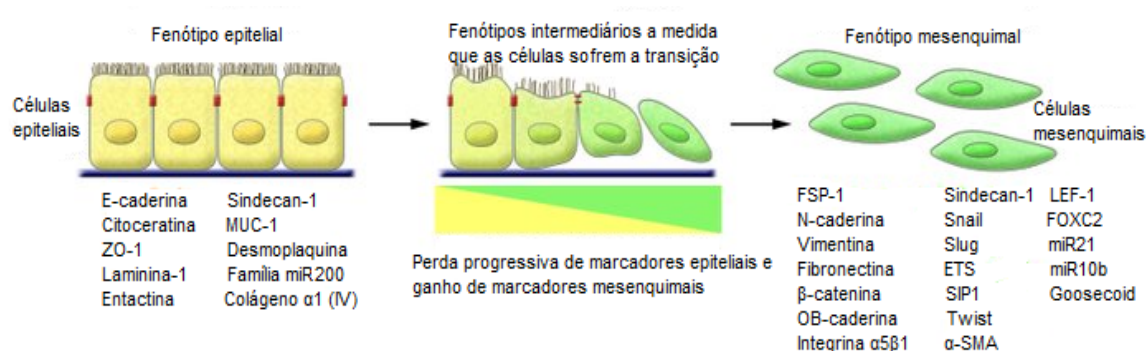
MiRNA formam um grupo de moléculas pequenas de RNA que contém entre 19 a 25 nucleotídeos, não codificantes, com ação fundamental na regulação da expressão dos genes. São responsáveis pela regulação de processos fundamentais na célula como a proliferação, diferenciação, resposta ao stress e apoptose. Metade dos miRNA estão localizados nos chamados sítios frágeis do genoma cujas anormalidades estão associadas ao câncer sendo que as alterações da biogênese e expressão são similares àquelas descritas nos processos carcinogénicos e resultam em anormalidades dos níveis de expressão tanto de genes supressores de tumor como oncogenes. No CaP ainda são poucos os estudos dedicados à avaliação dos perfis de miRNA, principalmente em espécimes clínicos. Como exemplo, é citado o papel oncogénico do miR-125b envolvido no crescimento andrógeno-independente. Em um estudo recente utilizando 470 miRNAs humanos em tumores e tecidos normais de 76 prostatectomias, 10 miRNAs estavam subexpressos e cinco superexpressos como por exemplo o miR-96 correlacionado com a recidiva bioquímica (MORENO-BUENO et al. 2008).

1.2 A TRANSIÇÃO EPITÉLIO – MESÊNQUIMA (EMT)

A transição epitélio-mesênquima, processo no qual há uma troca de fenótipo epitelial das células tumorais para um fenótipo mesenquimal, é um

dos possíveis mecanismos envolvidos na disseminação de células carcinomatosas além do sítio inicial da doença (LAWRENCE et al. 2007). O epitélio caracteriza-se por um conjunto de células fortemente aderidas lateralmente por junções célula-célula, formando uma fina camada celular. Esta camada é polimerizada, sendo que ápice e base da célula apresentam propriedades diferentes (ZHAU et al. 2008). Já as células mesenquimais formam uma rede tecidual difusa, onde a camada celular não é completa e a superfície da célula está conectada às células vizinhas somente por alguns pontos de contato. A matriz extracelular apresenta-se, diferentemente da lâmina basal, como uma rede com vários pontos de adesão às células. Não há polarização ápico-basal no citoesqueleto. (Figura 2)

Assim, a perda por parte das células epiteliais da polaridade ápico-basal, da integridade da lâmina basal e da forte adesão entre as células são marcas registradas da transição epitélio-mesenquimal (USHINO et al. 2010).

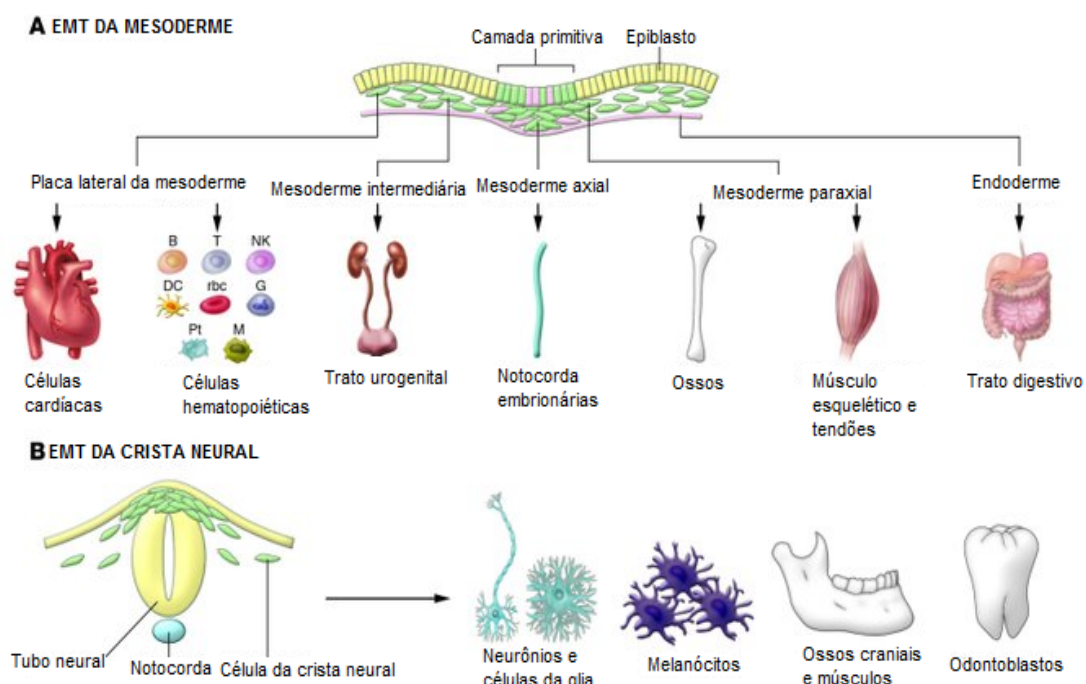


Fonte: Adaptado de KALLURI (2009).

Figura 2 - EMT: Modificação de um fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal.

A EMT pode ser encontrada em três subtipos biológicos baseados nas diferenças funcionais e contexto biológico que estão envolvidos: desenvolvimento (tipo 1), fibrose/ cicatrização (tipo 2) e câncer (tipo 3). (Figura 4)

a. Desenvolvimento: A formação da faixa primitiva é considerada o primeiro sinal da gastrulação e tem como consequência a formação de três camadas germinativas que dão origem a todos os tipos de tecido do organismo. (Figura 3)



Fonte: Adaptado de KALLURI e WEINBERG (2009)

Figura 3 - Atuação da EMT no desenvolvimento da mesoderme e crista neural.

Inicialmente, ela é formada na camada do epiblasto, cujas células epiteliais expressam e-caderina, exibem polaridade ápico-basal e sofrem mudanças programadas pela expressão de proteínas associadas com a

migração e diferenciação celular. Durante a gastrulação, a primeira evidência de EMT é a desagregação da membrana basal subjacente ao epiblasto. Posteriormente, a ação do Fibroblast Growth Factor (FGF) nas células da faixa primitiva resulta no aumento da regulação do fator de transcrição zinc finger Snail, reprimindo a E-caderina e desestabilizando as junções celulares e sinais adicionais completam a indução de EMT levando à ingressão das células com a faixa primitiva e sofrem MET dando origem à endoderme ou permanecem mesenquimais e dão origem à mesoderme. Outro exemplo de EMT ocorre nas células do neuroectoderme que dão origem à segunda população de células mesenquimais primárias como o fechamento do tubo neural. A neurulação ocorre nas células próximas à junção da neuroectoderme com a ectoderme embrionária, submetidas à EMT, gerando uma população celular na crista neural migratória. Após a delaminação e migração do desenvolvimento embrionário, estas células dão origem a vários tipos celulares e tecidos como, por exemplo, as estruturas cervicais e faciais, os neurônios e sistema nervoso periférico, pigmentos celulares e células da medula adrenal.

A migração de células da crista neural é realizada de forma coletiva visto que as células mesenquimais transientemente interagem através de interações físicas e bioquímicas modulando a migração das células vizinhas movendo-se como uma faixa organizada. Este tipo de EMT é desencadeada por vias de sinalização mediadas por Wnts, FGFs, BMPs, c-Myb e homeobox 1 (Msx-1) similares às da gastrulação. Entre elas, a BMP predominantemente induz a capacidade migratória das células da crista

neural enquanto que Noggin, um inibidor de BMP, é essencial na regulação negativa dessa atividade e sua expressão controla a EMT. Além disso, a E-caderina e N-caderina necessitam ser reprimidas para que a EMT possa ocorrer. Além da gastrulação e formação da crista neural, a EMT também está presente no desenvolvimento na formação das válvulas cardíacas, músculo esquelético e palato.

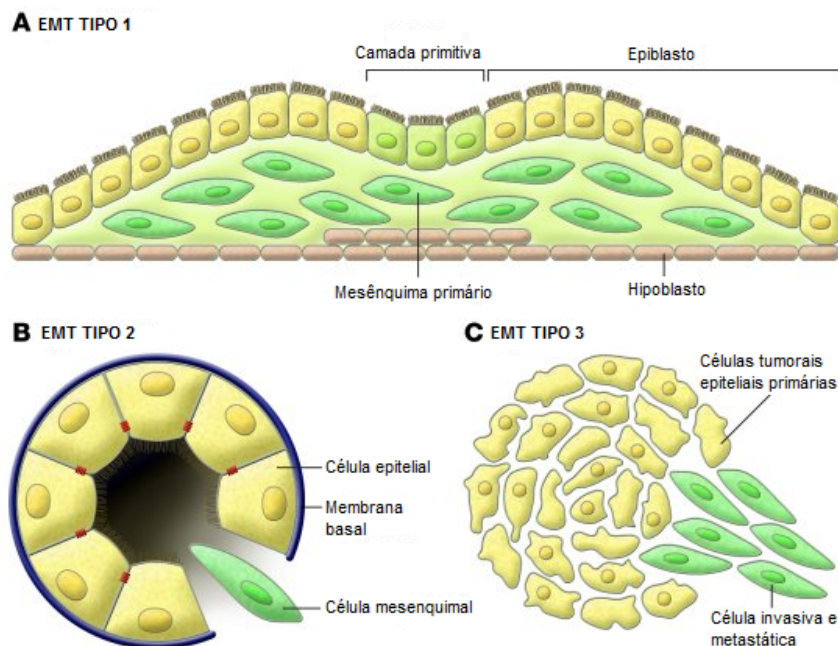
b. Regeneração do tecido (cicatrização) e fibrose: A fibrose ocorre em vários tecidos epiteliais e é mediada por células inflamatórias e fibroblastos que liberam uma variedade de sinais inflamatórios e componentes do complexo de matriz extra celular (ECM) como colágenos, lamininas, elastina e tenacinas. De forma mais específica, estão associadas com a fibrose que ocorre nos rins, fígado, pulmão e intestino. Os marcadores FSP (proteína fibroblasto – específica) , α – SMA e colágeno I tem demonstrado confiabilidade na caracterização de produtos gerados pelas EMTs que ocorrem durante o desenvolvimento da fibrose em vários órgãos.

Estes marcadores, juntamente com o DDR2 (domínio receptor de tirosina quinase 2) , vimentina e desmina tem sido utilizados para identificar células epiteliais que sofreram EMT associados com a inflamação crônica. As células que continuam a exibir morfologia epitelial específica e marcadores moleculares como a citoqueratina e E-caderina também mostram expressão de FSP 1 (marcador mesenquimal) e α -SMA e tornam-se susceptíveis a representam um estágio intermediário de EMT em que

marcadores epiteliais continuam sendo expressos enquanto que marcadores mesenquimais são adquiridos. Tal comportamento indica que as células epiteliais envolvidas no processo inflamatório podem progredir em diferentes níveis através da EMT, criando uma noção de “EMT parcial” e eventualmente estas células deixam a camada epitelial, direcionam seu caminho através da membrana basal e se acumulam no interstício do tecido expressando os marcadores epiteliais e exibindo um fenótipo totalmente fibroblástico. Durante a lesão, os limites do tecido se desintegram e a arquitetura de proteção da MEC é perturbada, expondo assim as células a mudanças drásticas no ambiente mecânico. Diante desse desequilíbrio, as células são expostas a citocinas, inicialmente derivadas de células modificadas, as células inflamatórias e os miofibroblastos, que realizam a reparação tecidual através da secreção de colágeno e reorganização da MEC. A fibrose é caracterizada pela produção de MEC como um processo reativo iniciado a partir de uma lesão e está associada com o crescimento excessivo, endurecimento e cicatrização dos tecidos e é frequentemente observada em doenças crônicas do pulmão, fígado, rins e coração. Em estágios avançados, resulta em disfunção e eventualmente falência dos órgãos (KALLURI 2009; MICALIZZI et al. 2010).

c. Câncer e Metástases: A ocorrência de metástases devido à progressão do tumor é responsável pela maioria das mortes relacionada ao câncer. A progressão metastática é complexa, ocorre em várias etapas que implicam no local da invasão e posterior disseminação das células malignas

e reestabelecimento em lugares distantes resultando na formação de metástases. A EMT contribui na primeira fase como um complexo molecular e programa celular em que as células epiteliais perdem suas características diferenciadas, por exemplo, a adesão célula – célula, polaridade ápico-basal e falta de motilidade e adquire ao mesmo tempo características mesenquimais como motilidade, invasividade e resistência a apoptose e ação de indutores no microambiente tumoral. As vias de sinalização relacionadas neste processo são várias como por exemplo a TGF- β (promotora de progressão tumoral), NF-kB (supressão de genes específicos epiteliais), Wnt e Notch (reguladoras de EMT nas células cancerígenas e manutenção de propriedade de auto – renovação das células tronco) (JING et al. 2011b). A EMT favorece um mecanismo em que as células tumorais deixam o local primário e invadem os tecido e vasos sanguíneos, definido como estágio de “espalhamento” metastático. Estas células com capacidade metastática adquirem uma capacidade de se auto renovarem, similar às das células tronco, a fim de gerarem metástases macroscópicas, favorecendo desta forma a idéia de que a EMT é um mecanismo que transmite a capacidade de se auto renovação e disseminação das células cancerígenas.



Fonte: Adaptado de KALLURI e WEINBERG (2009)

Figura 4 - Os três subtipos biológicos baseados nas diferenças funcionais e contexto biológico que envolvem a EMT.

Alterações moleculares que ocorrem durante esse processo e, que conseqüentemente, modificam a expressão, distribuição e função das células são influenciadas por inúmeras proteínas, como fatores de crescimento, fatores de transcrição, moléculas de adesão intracelular e adesão célula/ lâmina basal, que também estimulam o aumento da capacidade de migração e invasão celular.

A importância da transição epitélio-mesenquimal em doenças, como o CaP é mais controverso por causa da dificuldade em capturar o processo transiente para o invasivo em amostras patológicas de pacientes com câncer. Além do mais, a maneira como este fenômeno varia em cânceres de diferentes órgãos e sua modulação por fatores tecido-específicos ainda é mal compreendido (LAWRENCE et al. 2007).

1.3 E-CADERINA

Tratando-se de importantes determinantes moleculares, as alterações em moléculas de adesão estão envolvidas tanto no desenvolvimento embrionário como na progressão do tumor (GRAVDAL et al. 2007).

As caderinas (*E-caderina*, *N-caderina* e *P-caderina*) formam uma superfamília de glicoproteínas transmembrana responsáveis pela adesão intercelular cálcio-dependente, que interagem de uma maneira homofílica célula-célula. Apresentam uma região extracelular, uma região transmembrana e uma região citoplasmática ou intracelular. Estruturalmente, a região extracelular forma dímeros laterais na superfície celular que interagem com dímeros da célula oposta e no domínio citoplasmático, as caderinas ligam-se a proteínas denominadas cateninas (CHU et al. 2006).

As moléculas de E-caderina, expressas por células epiteliais, encontram-se mais freqüentemente alteradas em tecidos tumorais. Estudos experimentais revelaram que a E-caderina é freqüentemente inativada durante o desenvolvimento de carcinomas humano, como o carcinoma de mama, cólon, fígado, pele, próstata, esôfago, rim, vulva e pulmão e possivelmente é responsável pelo processo de invasão e a formação de metástases em linfonodos à distância.

Uma alternativa para determinar a relevância da transição epitélio-mesenquimal em CaP é analisar a expressão de marcadores associados a essa mudança de fenótipo. A perda de E-caderina é um sinal de transição epitélio-mesenquimal e tem sido mostrada a sua correlação com o aumento

de grau (desdiferenciação) e invasão local do câncer prostático e disseminação das células cancerígenas no sangue (MORENO-BUENO et al. 2008).

A expressão de N-caderina e E-caderina em células individuais em amostra de pacientes parece ser mutuamente exclusivas. É notável que as diferenças funcionais em CaP acompanhem a alteração na expressão destas proteínas (ZHAU et al. 2008).

Por exemplo, a diminuição na expressão de E-caderina está relacionada com vários índices de progressão do tumor incluindo grau, invasão local, disseminação no sangue e tumor recidivado após radioterapia (MORENO-BUENO et al. 2008).

O padrão clássico de expressão de marcadores para epitélio e mesênquima em amostra de pacientes mostram que o CaP torna-se mais parecido com fibroblasto com aumento desse padrão na frente invasiva e que juntamente com mudanças funcionais as evidências indicam que o fenômeno de transição epitélio- mesenquimal está associado com a progressão da doença.

A β -catenina é outra proteína que exerce papel importante na junção célula-célula. Essa proteína é responsável pela estabilização do complexo caderina-catenina e a sua perda também está relacionada a eventos do processo de transição epitélio-mesenquimal. Além disso, também possui um papel importante na regulação da transcrição gênica dependente da ativação da via de sinalização Wnt/Wingless, a qual ativa os fatores de transição LEF/Tcf, que por sua vez controlam a transcrição de genes como

ciclina D1, Myc e metaloproteínases, podendo levar a proliferação celular e inibição da apoptose.

1.4 FATORES DE TRANSCRIÇÃO: TWIST E SNAIL1

Genes primariamente descritos como importantes no controle da embriogênese como o *Twist-1*, *Snail-1* e *Snail-2 (Slug)* têm sido descritos como importantes no prognóstico e progressão de algumas neoplasias (SAVAGNER 2010).

A ativação dos fatores de transcrição, Twist e Snail leva a indução de uma alteração fenotípica tornando as células com características de uma célula primordial. Além disso, essa ativação também desencadeia EMT através da repressão direta da E-caderina (YUEN et al. 2008).

O Twist é um fator de transcrição importante no desenvolvimento embrionário com papel fundamental está envolvido no processo de metástase, pois induz perda de expressão da E-caderina e uma transição epitélio-mesênquima nas células epiteliais. A expressão de Twist somada à transição epitélio-mesênquima provocada por essa proteína são componentes importantes para a metástase tumoral.

A perda de expressão de Twist quase que completamente inibe a formação de nódulos metastáticos no pulmão, enquanto que a expressão ectópica em células epiteliais induz uma morfologia fibroblástica e leva a uma perda das junções aderentes, resultando num enfraquecimento do contato célula-célula (KWOK et al. 2007).

A superexpressão de Twist provoca a regulação negativa de proteínas relacionadas às junções aderentes nas células epiteliais (como a e-caderina), enquanto que a expressão de proteínas mesenquimais (como a n-caderina e a actina do músculo liso) é induzida. As células que expressam Twist apresentam um aumento considerável na sua capacidade migratória sendo predominantemente expresso em cânceres metastáticos e a perda da expressão de twist evita a invasão das células metastáticas na corrente sanguínea.

Em células epiteliais, a elevada expressão de Twist está associada a uma perda de marcadores epiteliais, incluindo e-caderina e beta-catenina.

Ao invés desses marcadores, tais células expressam marcadores mesenquimais, incluindo a vimentina e a n-caderina (COLOMIERE et al. 2009).

Já a regulação positiva de Twist em pacientes com câncer de próstata está relacionada a um aumento no potencial metastático (HUGO et al. 2007).

A expressão aumentada de Snail correlaciona-se com metástase linfonodal e diminuição da sobrevida livre de doença. Estudos têm evidenciado o aumento de expressão de Snail1 com o aumento da agressividade de tumores epidermóides. Slug também está associado com pior prognóstico em tumores de mama, ovário, pulmão e carcinoma epidermóide de esôfago (JIN et al. 2010a).

Snail 1, Slug e Twist 1 apresentam uma expressão aumentada em vários tumores incluindo rabdomiossarcoma, carcinoma gástrico, câncer de

mama, neuroblastomas, carcinoma epidermóide de esôfago, e câncer colon estando associados a um menor tempo de sobrevida livre de doença e metástase em carcinomas de próstata e de cabeça e pescoço.

1.5 VIMENTINA

Os filamentos intermediários são os componentes majoritários do citoesqueleto nas células mesenquimais.

A Vimentina é a proteína mais abundante constituinte dos filamentos intermediários nas células mesenquimais normais e neoplásicas e é freqüentemente usada no diagnóstico de lesões mesenquimais (SAVAGNER 2010).

É um marcador bem conhecido para evidenciar a transição epitélio-mesenquimal, cuja expressão e perturbação da adesão celular mediada pela e-caderina é considerada uma marca característica dos eventos associados à transição epitélio-mesenquimal.

Foi demonstrado que a Vimentina é expressa pelas linhagens celulares prostáticas móveis e correlaciona-se positivamente com carcinomas fracamente diferenciados e metástases, sendo que ela promove a invasibilidade das células tumorais pela regulação do complexo e-caderina/beta-catenina via C-src em células tumorais prostáticas (KOKKINOS et al. 2007; WEI et al. 2008).

A Vimentina pode representar um potencial alvo para agentes terapêuticos que agem através do bloqueio da metástase em CaP, seja

através da transfecção antisense da vimentina ou através do uso de inibidores específicos, tais como os inibidores C-src .

A expressão de vimentina é frequentemente conservada em carcinoma metastático para linfonodos e preditor independente de metástase linfonodal no carcinoma de células escamosas do esôfago e se associa à invasão linfática e metástases a distância.

Numa situação de transição epitélio-mesenquimal em câncer, o status dos filamentos intermediários numa célula se altera a partir de uma rede rica em queratina (que conecta as junções aderentes e desmossomos) para uma rede rica em vimentina e está relaciona-se a um prognóstico ruim (KOKKINOS et al. 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar alterações de expressão protéica de marcadores da transição epitélio-mesenquimal buscando correlacionar estas alterações com fatores prognósticos já determinados em CaP e dados clínicos dos pacientes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar, através de imuno-histoquímica, a expressão de proteínas: E-caderina, Snail, Twist, Vimentina .
- 2 Correlacionar os níveis de expressão dos marcadores com fatores prognósticos e dados demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes.
- 3 Investigar o impacto da expressão dos marcadores nas taxas de Sobrevida livre de recidiva bioquímica (SLRB), Sobrevida livre de recidiva clínica (SLRC) e Sobrevida global (SG).
- 4 Validar a especificidade dos anticorpos para Twist 1 e Snail 1, através das técnicas de Western-blot e Imunofluorescência aplicadas em linhagens celulares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES E SPÉCIMES ANÁTOMO-PATOLÓGICAS

Cem casos de carcinomas de próstata (adenocarcinoma) diagnosticados e foram selecionados de forma retrospectiva e aleatória dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A C Camargo.

O projeto foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital AC Camargo (CEP) em 28 de Janeiro de 2011 e registrado com o número 1474/10.

Todos os pacientes em questão foram submetidos à prostatectomia radical. Em razão de ser um estudo retrospectivo, sem mudança de conduta clínica, não foi necessária a elaboração de um termo de consentimento aos pacientes.

Foram utilizados dados de prontuários e material arquivado em blocos de parafina no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo. O uso do material parafinado não acarretou prejuízo aos pacientes, pois, a terapêutica julgada necessária para os mesmos já havia sido instituída e sempre foi mantido material residual no bloco.

A confirmação diagnóstica foi feita pela coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e os espécimes cirúrgicos foram fixados em formalina e embebidos em parafina para a confecção das lâminas.

Os seguintes dados clínicos das pacientes foram coletados dos prontuários médicos disponíveis no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital AC Camargo: idade, raça, tabagismo, PSA inicial, estágio patológico (TNMUICC 2010), graduação de Gleason, estratificação de risco pré-terapêutica de acordo com os Critérios de D'Amico (D'AMICO et al. 1998) invasão de estruturas adjacentes, margens cirúrgicas, invasão de vesículas seminais ou linfonodos, invasão capsular, extensão extraprostática, embolização linfo vascular, infiltração perineural, data de cirurgia, PSA nadir pós- operatório, recidiva bioquímica, data da recidiva bioquímica, recidiva clínica (data, órgão afetado: ossos, pulmões, vísceras, outra), data do último seguimento, situação clínica no último seguimento, óbito, motivo do óbito (oncológico ou não), critérios de recidiva : recidiva bioquímica: PSA > 0,2 ng/ml, sem evidência de doença clínica e recidiva clínica: presença de metástases linfonodais, ósseas ou viscerais, com ou sem elevação de PSA, doença hormônio refratária: progressão de PSA após terapia de supressão hormonal, com níveis de castração adequados (PSA < 20 ng/dl).

3.1.1 Critérios de Inclusão

Foram selecionados pacientes com diagnóstico de câncer de próstata (adenocarcinoma), sem metástase a distância e com tratamento cirúrgico exclusivo (prostatectomia radical).

3.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos pacientes com metástases a distância, aqueles submetidos à prostatectomia de resgate (após radio ou braquiterapia) e pacientes cujo material anátomo-patológico e/ou dados clínicos forem insuficientes.

3.1.3 Exame Anátomo-patológico

Foi realizada a confirmação diagnóstica, a reclassificação e graduação histológica dos tumores em lâminas de H&E (hematoxilina-eosina) pela Dra. Stephania Bezerra, patologista do Hospital AC Camargo.

As lâminas foram examinadas no microscópio, utilizando objetiva de 40x, determinadas as áreas de maior intensidade da coloração e posteriormente submetidas a uma nova análise em grande aumento (aumento total de 400x) para classificação final.

3.1.4 Caracterização da amostra

A Tabela 1 apresenta as características clínicas, patológicas e de estadiamento dos pacientes. A idade variou entre 46 a 85 anos, com média de 66 anos e haviam 87 brancos, 5 pardos, 4 negros e 4 amarelos. Após 10 anos de seguimento 73 pacientes (73,73%) tiveram recidiva bioquímica, sendo que o valor da mediana do PSA pré-operatório foi de 10,1 ng/ ml, e 19 (19,19%) progrediram para a doença metastática.

Ocorreram 9 (9%) óbitos, dos quais 8 (88,88%) pelo câncer. Ao final do seguimento, 49 (49%) pacientes estavam vivos e sem doença clínica, 40 pacientes (40%) estavam vivos e com doença e 01 (1%) perdido no seguimento.

Tabela 1 - Caracterização dos pacientes

Características	n	%
Escore de Gleason		
6 (3+3)	42	42,42
7 (3+4)	24	24,24
7 (4+3)	13	13,13
8 (4+4)	9	9,09
9 (4+5)	10	10,1
9 (5+4)	1	11,12
Estádio TNM		
II	26	26,26
III	68	68,68
IV	5	5,06
Idade (anos)		
< 50	2	2,02
50 - 70	64	64,64
>70	33	33,34
Margem cirúrgica positiva		
Sim	28	28,29
Não	71	71,21
Invasão capsular		
Focal	57	58,16
ECE	17	17,34
Ausência	24	24,25
Invasão perineural		
Presença	81	81,81
Ausência	12	12,13
Extensa	06	6,06
Invasão angiolinfática		
Sim	22	22,22
Não	77	77,78
PSA pré-operatório (ng/ ml)		
< 10	45	45,45
10 ≥ PSA < 20	36	36,36
≥ 20	18	18,18
Recidiva clínica		
Sim	19	19,19
Não	80	80,81
Invasão da vesícula seminal		
Sim	17	17,17
Não	82	82,83
Recidiva bioquímica		
Sim	73	73,73
Não	26	26,27
Tratamento adjuvante		
Sim	61	61,61
Não	38	38,39
Tratamento neoadjuvante		
Sim	13	13,4
Não	84	86,6

3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

Foram realizados cortes de quatro micrômetros de espessura postos em lâminas com carga elétrica (StarFrost) e mantidas em estufa a 60°C *overnight*. As lâminas foram identificadas e desparafinadas em xilol (2 trocas de 10 minutos cada); então, passadas em álcool etílico em concentração decrescente (100%, 85% e 75%) e lavadas em água corrente por 5 minutos. A recuperação antigênica por calor foi realizada utilizando o equipamento PT-Link (DAKO®) seguindo as recomendações de tempo e pH fornecidas pelo fabricante para cada marcador.

Após a recuperação antigênica, as lâminas foram inseridas no Autostainer (DAKO®) para a realização automatizada das reações. A peroxidase endógena foi bloqueada com reagente do mesmo fabricante por 5 minutos. Em seguida os cortes foram incubados com bloqueador de proteínas (DAKO®) por 5 minutos, à temperatura ambiente e em câmara úmida.

Os cortes foram incubados com anticorpo primário por 90 minutos à temperatura ambiente e posteriormente incubados com o anticorpo secundário e com o polímero HRP (Flex Plus, DAKO®) durante 30 minutos cada à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB – DAKO®), por 5 minutos e então lavados em água corrente e contracolorados com hematoxilina de Harris, por 2 segundos.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek film).

Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados na Imuno-histoquímica

Anticorpo	Clone	Marcação	Fabricante	Diluição
E-caderina	NCH-8 (monoclonal de camundongo)	membrana	DAKO Denmark	1:200
Vimentina	V9 (monoclonal de camundongo)	citoplasma	DAKO Denmark	1:400
Twist 1	2C1A (monoclonal de camundongo)	núcleo	AbCam Cambridge,USA	1:100
Snail 1	20C8 (monoclonal de camundongo)	citoplasma / núcleo	AbCam Cambridge,USA	1:30

Para testar a fidelidade da reação foi utilizado um controle positivo de tecidos que sabidamente reagem com os anticorpos primários estudados indicados pelo fabricante. Para os anticorpos E-caderina e Snail1, respectivamente, foram utilizadas lâminas de tumor de mama, tumor de rim para a Vimentina, e rim normal para o Twist1. Como controle negativo, foram omitidos os respectivos anticorpos primários. As características de cada anticorpo primário bem como a diluição empregada estão listadas na Tabela 2.

3.3 INTERPRETAÇÃO DAS REAÇÕES DE IHQ

A análise das lâminas foi conduzida pela Dra. Stephania Bezerra, patologista do Hospital AC Camargo, observadas em menor aumento (40x) e selecionadas as áreas com maior concentração de células reagentes “hot spots” e a partir destas regiões analisadas conforme os critérios descrito abaixo:

A avaliação da reação de IHQ, no caso dos marcadores Snail 1 e Twist 1, foi realizada utilizando-se o aparelho Scanscope XT Scanner System – Aperio Technologies, Inc., Vista CA, EUA. De maneira resumida, o Scanscope utiliza detectores de arranjo linear em conjunto com os componentes de controle de movimento em uma lente objetiva de microscópio óptico. Uma câmera com dispositivo de carga acoplada tradicional realiza a captura de várias regiões de uma lâmina em uma linha de varredura. Os fragmentos biológicos são alinhados para criar uma imagem digital de alta definição da lâmina histológica. Esse equipamento vem acompanhado de um programa de digitalização da imagem onde a região representativa do tumor é demarcada, quantificada e são atribuídos valores à intensidade da marcação. Esses dados são organizados em uma planilha.

No caso dos marcadores E – caderina e Vimentina, avaliação da reação de IHQ, foi realizada através da seleção de áreas com maior concentração de células reagentes “hot spots” utilizando a microscopia

óptica (microscópio NikonLabophot®, ou similar), observados em menor aumento (40x).

- **E-caderina**

Para a avaliação da perda de expressão de E-caderina foram consideradas positivas, as células que apresentavam marcação de membrana (UMBAS et al. 1992; MANZO et al. 2003). A análise das lâminas foi realizada no epitélio tumoral, sendo que nos casos que possuem mais de um padrão de Gleason foi analisado o padrão de marcação em cada escore individualmente, através de microscopia óptica (microscópio NikonLabophot®, ou similar), observadas em menor aumento (40x), e selecionadas as áreas com maior concentração de células reagentes “hot spots”. O padrão de marcação foi determinado como “positivo” nos casos que se apresentava “*mais forte*” ou “*mais fraco*” em relação à glândula prostática normal ou “negativo” nos casos que ocorreu a perda da expressão no epitélio tumoral.

- **Vimentina**

A análise das lâminas foi realizada de acordo com a presença de expressão do marcador no epitélio tumoral e nos casos que possuem mais de um padrão de Gleason foi evidenciado se houve diferença de expressão nos dois padrões, através de microscopia óptica (microscópio NikonLabophot®, ou similar), observadas em menor aumento (40x), e selecionadas as áreas com maior concentração de células reagentes “hot

spots”. O padrão de marcação foi determinado como “*positivo*” quando envolvia a área tumoral total analisada, ou “*positivo focal*” nos casos classificados com dois padrões de Gleason e apresentaram diferença de expressão entre eles e “*negativo*” quando houve ausência de expressão no epitélio tumoral.

- **Twist 1**

A análise deste marcador foi realizada de forma automatizada pelo programa analisador de imagens (Scope, APERIO®) e selecionadas as seguintes áreas com maior concentração de células “hot spots” (no mínimo 300 células) reagentes: epitélio glandular prostático normal, epitélio tumoral (de acordo com a classificação pelo score de Gleason, sendo que nos casos que possuem mais de um padrão foi analisado o padrão de marcação individualmente), no interstício e no infiltrado inflamatório.

O algoritmo selecionado para a análise denominado “IHC nuclear” possui um esquema de pontuação obtido pela combinação entre a intensidade de coloração e porcentagem de tecido corado.

- **Snail 1**

A análise (marcação citoplasmática) deste marcador foi realizada de forma automatizada pelo programa analisador de imagens (Scope, APERIO®) e selecionada uma área do epitélio tumoral com maior concentração de célula reagentes “hot spots”, sendo que nos casos que

possuem mais de um padrão de Gleason foi analisado o padrão de marcação em cada escore individualmente.

O algoritmo selecionado para a análise denominado “Pixel Count” é utilizado para quantificar a presença de coloração específica em uma imagem digitalizada. É possível analisar uma coloração (através da saturação) em três faixas de intensidade (fraca, positiva e forte), em “pixels”, que satisfazem a especificação de cor, e determinar o número e a intensidade através da soma em cada intervalo de intensidade, juntamente com três quantidades adicionais: intensidade média, proporção de forte / número total, e a intensidade média de fraco acrescido dos pixels positivos. Foi considerado como positivo os casos que apresentavam a intensidade de marcação $\geq 0,1$ e negativo $< 0,1$.

3.4 CULTURA DA LINHAGEM CELULAR HUMANA DE CÂNCER DE PRÓSTATA DU-145

A linhagem celular humana de CaP DU-145 foi obtida da ATCC (do inglês, *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) e mantida em meio DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com uma alta concentração de glicose, suplementado com 10% soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, São Paulo, SP, BR), 100 unidades/ ml penicilina e 100 µg/ ml estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2mM L-glutamina (Invitrogen, CA, USA), e 1.0 mM piruvato de sódio (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.5 IMUNOFLOURESCÊNCIA (ICC/IF)

Para observar a localização celular dos marcadores Snail 1 e Twist 1, foi feito um ensaio de imunofluorescência utilizando os dois anticorpos. A linhagem celular humana de CaP DU-145 foi fixada em solução recém preparada contendo 4% de paraformaldeído por 1 hora à temperatura de 4°C. Tais células foram, então, permeabilizadas com uma solução 0,25% Triton X-100 (0,1% Tween-20 em PBS) por 30 minutos e bloqueadas em 1% BSA (do inglês, *bovine serum albumin*) e PBS por 30 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas nos respectivos anticorpos primários diluídos em solução de PBS contendo 1% BSA, por 12 horas à temperatura de 4°C (o anticorpo Snail 1 foi utilizado em uma diluição de 1:100; já o anticorpo Twist 1 foi usado em uma diluição de 1/200). Após lavar 3 vezes com PBS, as células foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo 10µg/ ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole) para corar o núcleo numa diluição de 1/200 em 1% BSA por 1 hora à temperatura ambiente. Por fim, as células DU-145 foram lavadas 3 vezes com PBS e visualizadas no microscópio confocal Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Thonwood, NY, USA). Para os controles negativos, todas as condições acima descritas foram mantidas, exceto que foram omitidos os respectivos anticorpos primários.

3.6 WESTERN-BLOT

Os dois anticorpos (Snail 1 e Twist 1) utilizados no presente estudo foram validados através da técnica de Western-blot. Resumidamente, as células DU-145 (para o anticorpo Snail 1) e HEK293 (Twist 1) foram lisadas num tampão de lise contendo 60mM tris-HCL pH6,8; 5% glicerol e 2% SDS (do inglês, *sodium dodecyl sulfat*e) e uma mistura de inibidores de protease (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). Após 10 minutos no gelo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a fim de remover os restos celulares. Em seguida, os lisados celulares (10, 20 e 40 µg) foram corridos num gel SDS–PAGE de concentração 10%. Após a eletroforese, as respectivas proteínas foram eletrotransferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), sendo que a eficiência da transferência foi monitorada por meio do corante de Ponceau (0,5%). Posteriormente, as membranas foram incubadas no tampão de bloqueio contendo 10% BSA, 10 mM Tris–HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, e 0.1% Tween 20 por 2 horas à temperatura ambiente e, então, incubadas *overnight* à temperatura de 4°C com os respectivos anticorpos primários (o anticorpo Snail 1 foi utilizado em uma diluição de 1/1000 e o anticorpo Twist 1 em uma diluição 1:250). Após incubação com os anticorpos conjugados à peroxidase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a detecção foi realizada por meio de reagentes quimioluminescentes de alta performance (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste do Qui-Quadrado de Pearson foi utilizado para avaliar a expressão dos marcadores (E-caderina, Vimentina, Twist 1 e Snail 1) em relação às variáveis clínicas e as associações entre variáveis qualitativas. Para frequências menores que cinco em uma casela, empregou-se o Teste Exato de Fisher. O nível de significância adotado foi $p < 0,005$.

As curvas de sobrevida livre de recidiva bioquímica (SLRB), sobrevida livre de recorrência clínica (SLRB) e sobrevida global (SG) foram construídas pelo método de Kaplan-Meier (a SLRB é baseada no aumento do PSA pós-operatório e definida como um nível de PSA pós-operatório $> 0,2$ ng/ ml). A avaliação da associação das variáveis clínicas e da expressão dos marcadores estudados em relação à SLRB foi feita através do teste de Log-Rank.

Pacientes considerados perdidos de seguimento na data da última informação contribuíram para a curva de sobrevida até tal data, sendo então considerados sob censura.

A identificação dos fatores independentes relacionados às taxas de sobrevidas estudadas foi realizada através da regressão logística múltipla, ou modelo de Cox. As variáveis selecionadas para o estudo múltiplo foram as que atingiram significância estatística na análise univariada, bem como aquelas que atingiram valores de p menores ou iguais a 0,20. O resultado final foi obtido através da estratégia *stepwise forward selection*, na qual à

variável de maior significância na análise univariada são acrescentadas, uma a uma e em ordem crescente, as outras variáveis.

O nível de significância foi definido como sendo acima de 0,05 e a análise estatística do presente estudo foi realizada por meio do software *Windows Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 17.0 (EUA).

4 RESULTADOS

4.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Nas reações de imuno-histoquímica (IHQ) aplicadas às amostras dos pacientes com câncer de próstata (CaP), os seguintes critérios foram utilizados para a avaliação das lâminas:

a. E-caderina

Do total de 100 pacientes analisados, levando em consideração o maior padrão de Gleason de cada paciente, 65 (65%) apresentaram o padrão de marcação considerado “*mais forte*” e 34 (34%) “*mais fraco*” em relação à glândula prostática normal e somente 1 (1%) paciente apresentou a perda de expressão do marcador no epitélio tumoral.

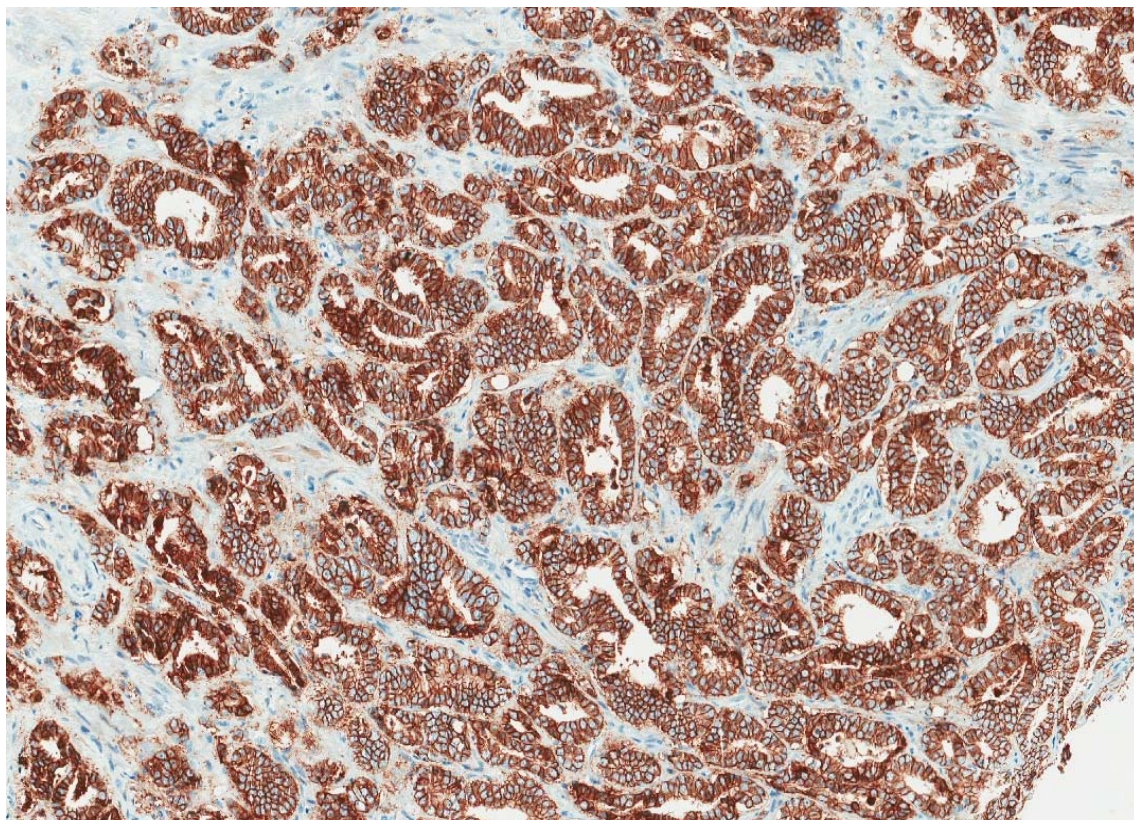


Figura 5 - Epitélio tumoral com expressão do marcador E-caderina classificada como “mais forte” em relação ao epitélio glandular prostático. (Aumento original 400X)

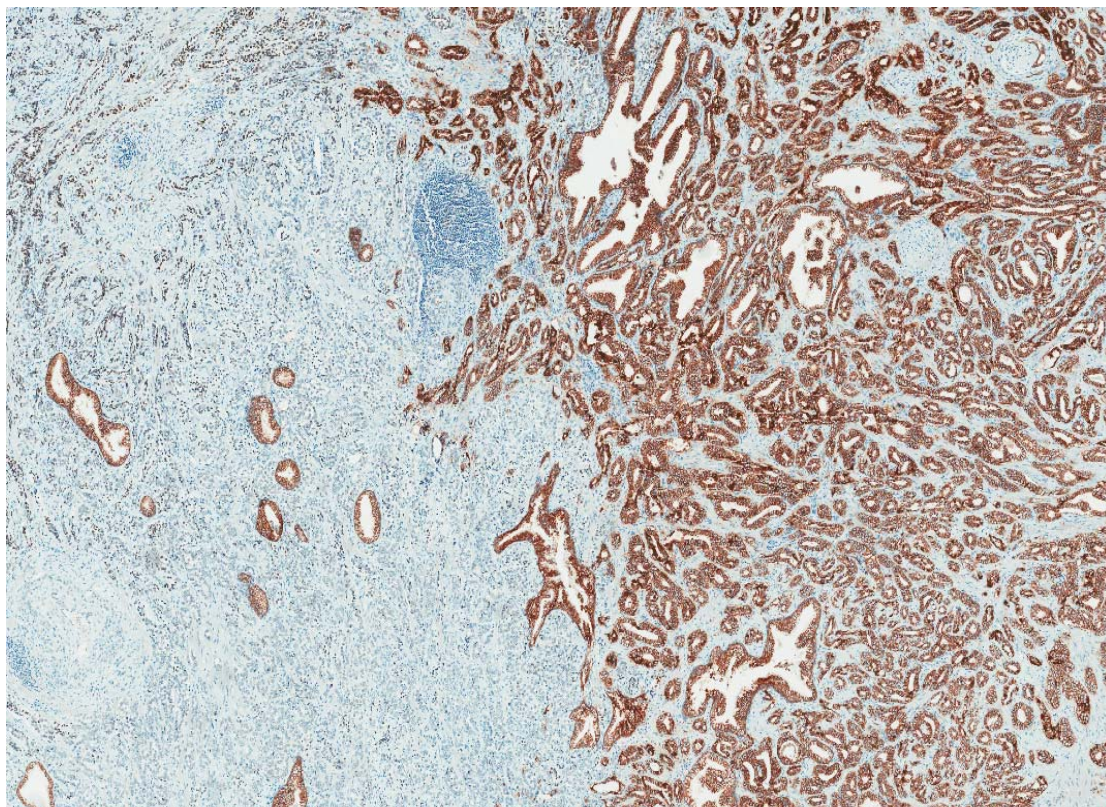


Figura 6 – Epitélio tumoral mostrando dois padrões de expressão do marcador E-caderina. A área que apresenta expressão “mais forte” que o epitélio glandular prostático foi classificado como Gleason 4 e a área que apresenta perda total de expressão do marcador (ou negativa) foi classificada como Gleason 5. (Aumento original 400X)

Quando comparado frente às variáveis patológicas, foi observada a associação entre a diminuição da expressão do marcador E-caderina com o maior padrão de Gleason ($p=0,001$) a presença de invasão perineural ($p=0,003$), conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Expressão de E-caderina em relação às variáveis clínicas e patológicas

Variáveis clínicas	Categoria	Positividade			p
		n (%)	n (%)	n (%)	
		Negativo	Mais fraco	Mais forte	
PSA pré-operatório (ng/ ml)	< 10,1*	0 (0)	31 (47)	18 (58,1)	0,359
	≥ 10,1*	1 (100)	35 (53)	13 (41,9)	
Maior Gleason	3	0 (0)	20 (30,3)	22 (68,8)	0,001
	4	0 (0)	37 (56,1)	9 (28,1)	
	5	1 (100)	9 (13,6)	1 (3,1)	
Estadio TNM	II	0 (0)	17 (25,8)	9 (28,1)	0,810
	III e IV	1 (100)	49 (74,2)	23 (71,9)	
Invasão perineural	Ausência	0 (0)	8 (12,1)	4 (12,5)	0,003
	Presença	0 (0)	54 (81,8)	27 (84,4)	
	Extensa	1 (100)	4 (6)	1 (3,1)	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	1 (100)	55 (83,3)	26 (81,3)	0,871
	Presença	0 (0)	11 (16,7)	6 (18,7)	
Invasão capsular	Ausência	0 (0)	18 (27,3)	6 (19,4)	0,747
	Focal	1 (100)	38 (57,6)	18 (58,1)	
	ECE	0 (0)	10 (15,1)	7 (22,5)	
Margem cirúrgica	Negativa	0 (0)	18 (27,3)	10 (31,3)	0,753
	Positiva	1 (100)	48 (72,7)	22 (68,7)	
Linfonodo positivo	Ausência	1 (100)	63 (95,5)	28 (87,5)	0,341
	Presença	0(0)	3 (4,5)	4 (12,5)	
Invasão vasculolinfática	Ausência	1 (100)	48 (72,7)	29 (90,6)	0,279
	Presença	0 (0)	18 (27,3)	3 (9,4)	

*Mediana do PSA pré-operatório

b. Vimentina

Do total de 100 pacientes analisados, levando em consideração o maior padrão de Gleason de cada paciente, 65 (65%) não apresentaram marcação no epitélio tumoral, 31 (31%) apresentaram o padrão de marcação em apenas um dos padrões de Gleason, na maioria deles o de maior graduação, e somente 4 (4%) pacientes apresentaram a expressão do marcador no epitélio tumoral.

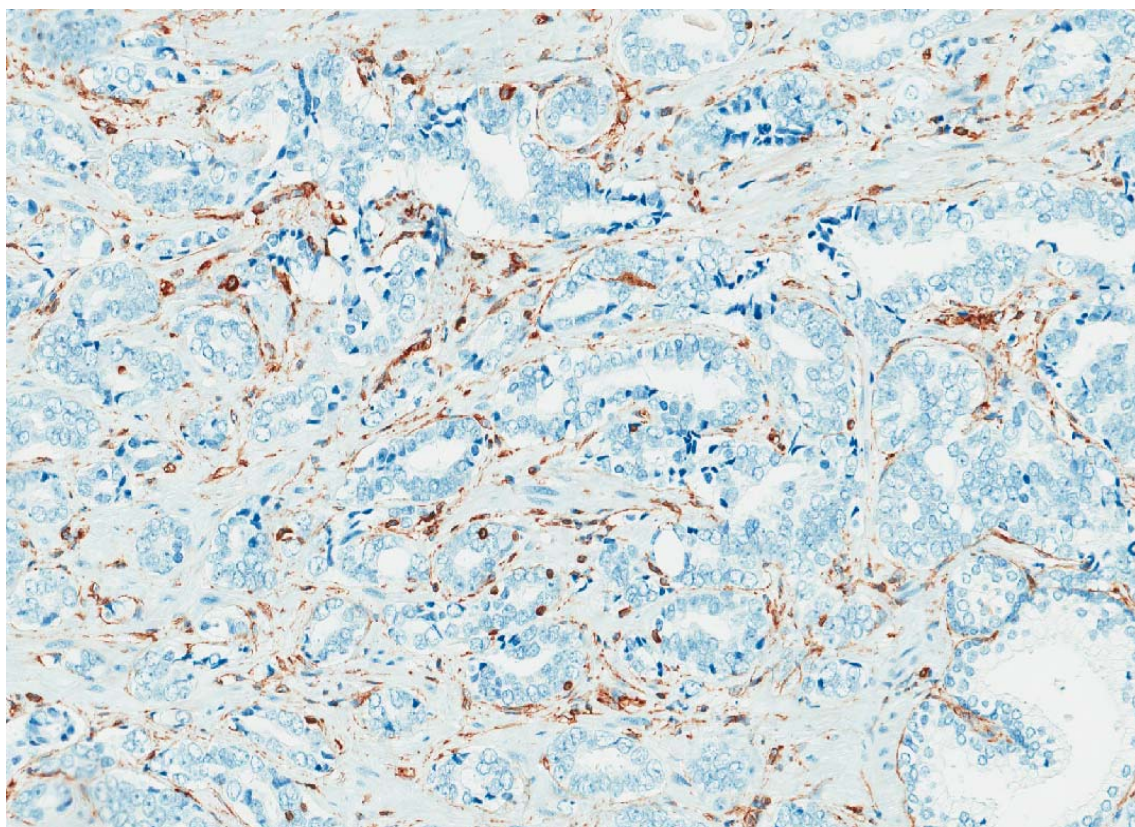


Figura 7 – Epitélio tumoral com ausência de expressão do marcador Vimentina. (Aumento original 400X)

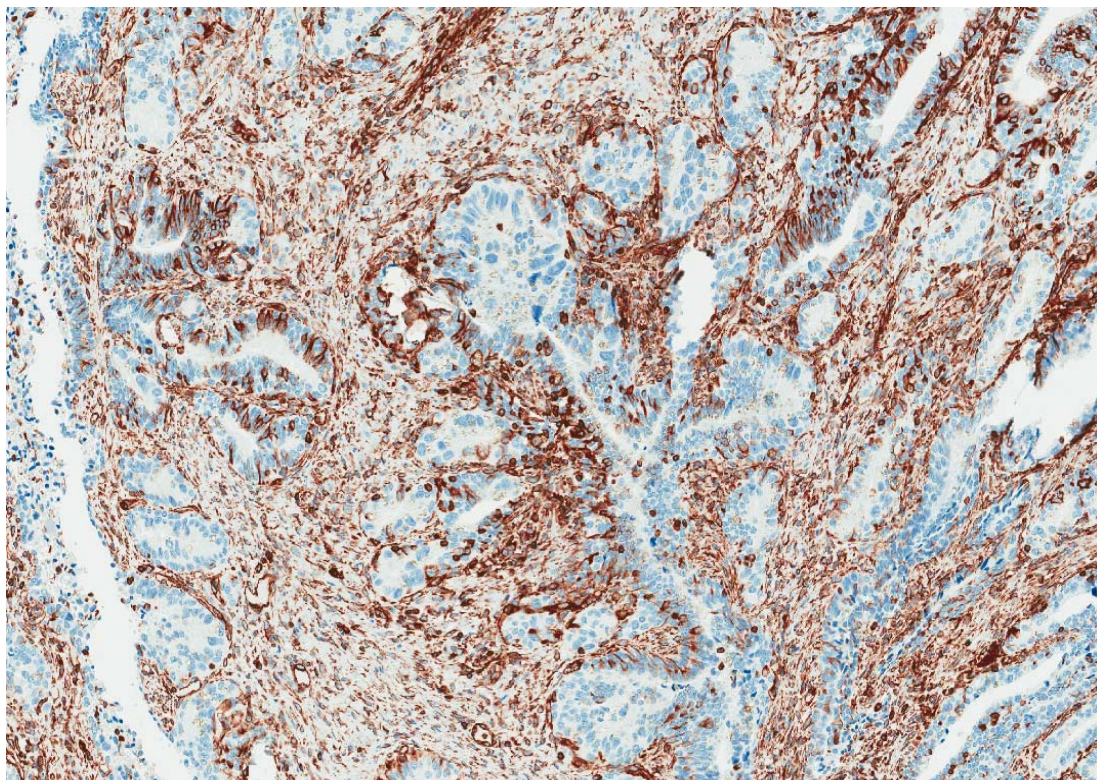


Figura 8 - Epitélio tumoral mostrando a presença de expressão do marcador vimentina. (Aumento original 400X)

Quando comparado frente às variáveis patológicas, foi observada a associação entre a presença de expressão no epitélio tumoral do marcador Vimentina com maior padrão de Gleason ($p = 0,001$), conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Expressão de Vimentina em relação às variáveis clínicas e patológicas

Variáveis clínicas	Categoria	Positividade		<i>p</i>
		n (%)	n (%)	
		Negativo	Positivo	
PSA pré-operatório (ng/ ml)	< 10,1*	33 (50,8)	16 (48,5)	0,831
	≥ 10,1*	32 (49,2)	17 (51,5)	
Maior Gleason	3	39 (60)	3 (8,8)	<0,001
	4	21 (32,3)	25 (73,5)	
	5	5 (7,7)	6 (17,6)	
Estadio TNM	II	18 (27,7)	8 (23,5)	0,655
	III e IV	47 (72,3)	26 (76,5)	
Invasão perineural	Ausência	10 (15,4)	2 (5,9)	0,362
	Presença	51 (76,9)	31 (91,2)	
	Extensa	5 (7,7)	1 (2,9)	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	55 (84,6)	27 (79,4)	0,514
	Presença	10 (15,4)	7 (20,6)	
Invasão capsular	Ausência	17 (26,6)	7 (20,6)	0,800
	Focal	36 (56,3)	21 (61,8)	
	ECE	11 (17,1)	6 (17,6)	
Margem cirúrgica	Negativa	20 (30,8)	8 (23,5)	0,448
	Positiva	45 (69,2)	26 (76,5)	
Linfonodo positivo	Ausência	61 (93,8)	31 (91,2)	0,623
	Presença	4 (6,2)	3 (8,8)	
Invasão vasculolinfática	Ausência	54 (81,5)	24 (70,6)	0,285
	Presença	11 (18,5)	10 (29,4)	

*Mediana do PSA pré-operatório

c. Twist 1

O algoritmo selecionado para a análise denominado “IHC nuclear” possui um esquema de pontuação obtido pela combinação entre a intensidade de coloração e porcentagem de tecido corado (<286000 = negativo e ≥ 286000 = positivo).

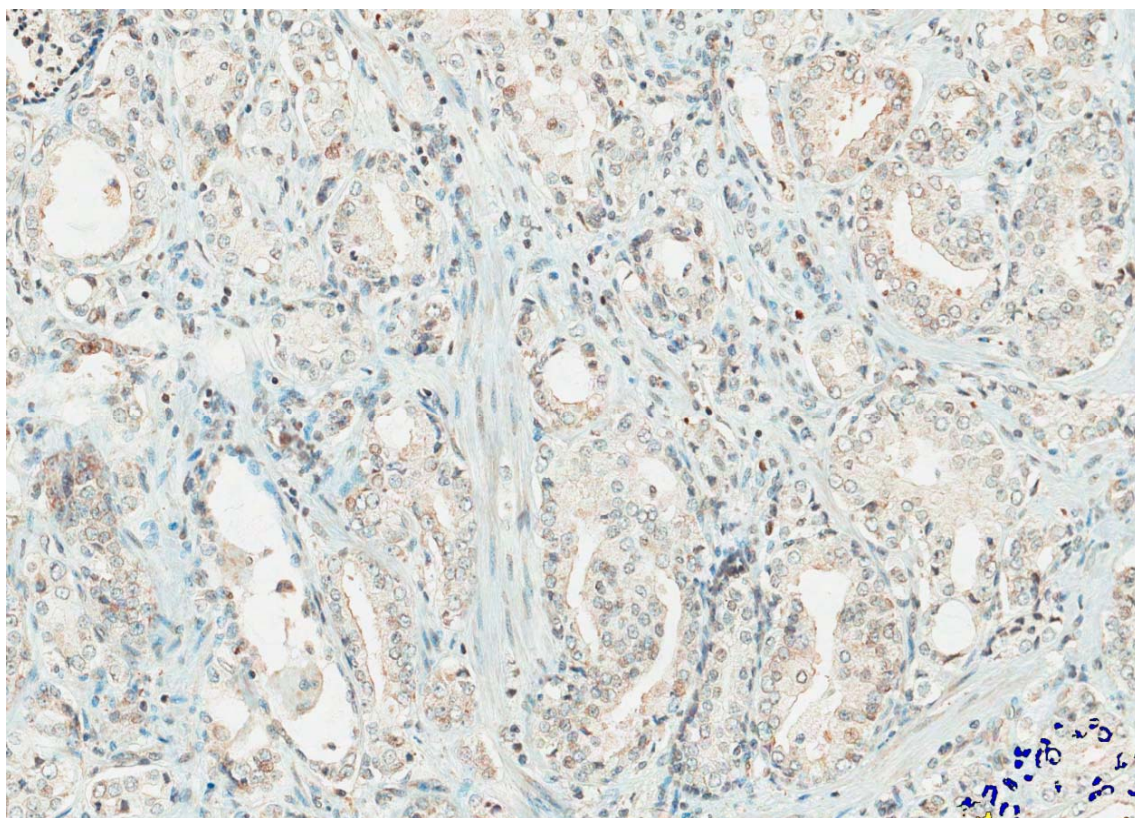


Figura 9 - Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 3 mostrando a expressão do marcador Twist 1. (Aumento original 400X)

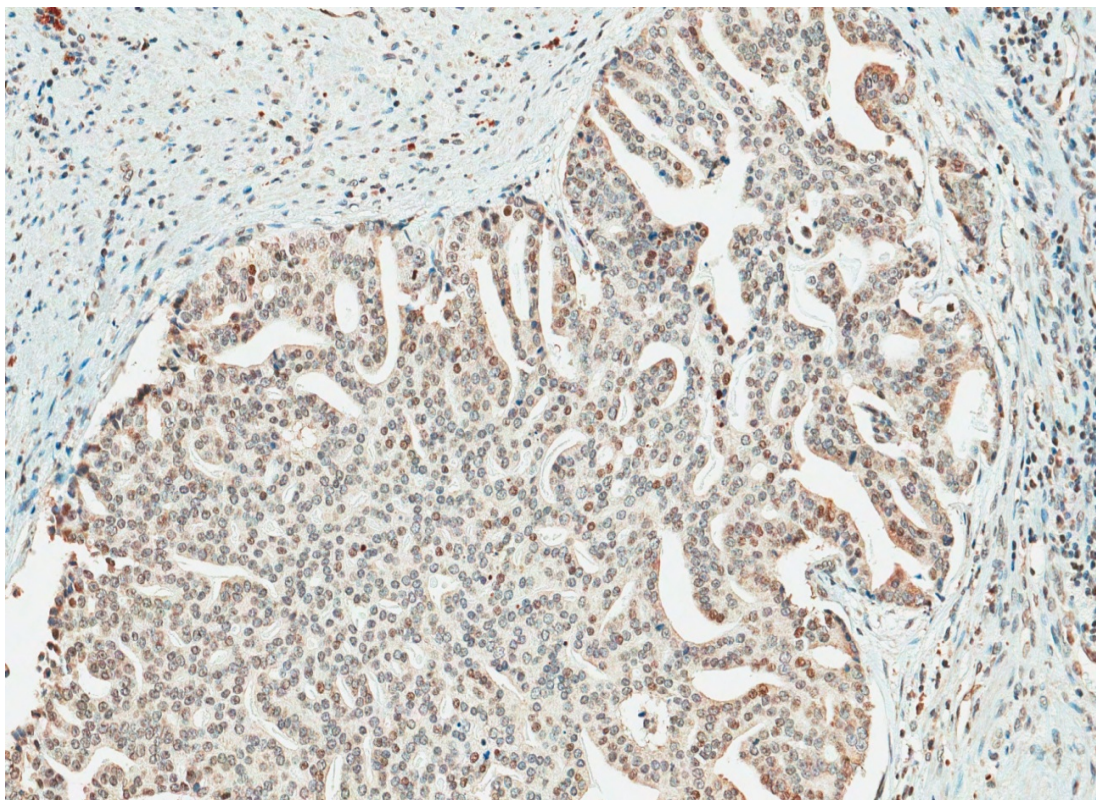


Figura 10 - Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 4 mostrando a expressão do marcador Twist 1. (Aumento original 400X)

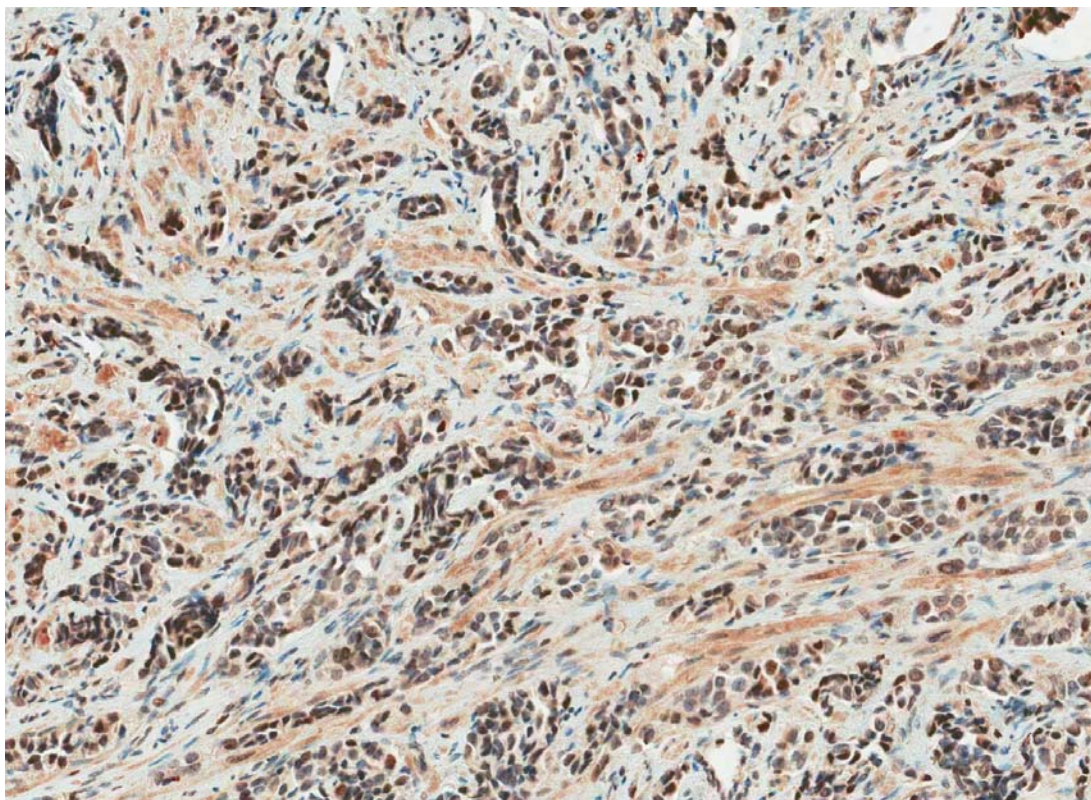


Figura 11 - Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 5 mostrando a expressão do marcador Twist 1. (Aumento original 400X)

Quando comparado frente às variáveis clínicas e patológicas, foi observada a associação entre a positividade da expressão do marcador Twist 1 com os casos que mostraram a presença de margem cirúrgica comprometida ($p=0,046$), conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Expressão de Twist 1 em relação às variáveis clínicas e patológicas

Variáveis clínicas	Categoria	Positividade		<i>p</i>
		n (%)	n (%)	
		< 286000**	≥ 286000**	
PSA (ng/ ml)	< 10,1*	29 (50,9)	20 (48,8)	0,838
	≥ 10,1*	28 (49,1)	21 (51,2)	
Maior Gleason	3	26 (44,8)	16 (39)	0,724
	4	25 (43,1)	21 (51,2)	
	5	7 (12,1)	4 (9,8)	
Estadio TNM	II	11 (19)	15 (36,6)	0,050
	III e IV	47 (81)	26 (63,4)	
Invasão perineural	Ausência	8 (13,8)	4 (9,8)	0,767
	Presença	46 (79,3)	35 (85,4)	
	Extensa	4 (6,9)	2 (4,9)	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	45 (77,6)	37 (90,2)	0,100
	Presença	13 (22,4)	4 (9,8)	
Invasão capsular	Ausência	11 (19)	13 (32,5)	0,246
	Focal	35 (60,3)	22 (55)	
	ECE	12 (20,7)	5 (12,5)	
Margem cirúrgica	Negativa	12 (20,7)	16 (39)	0,046
	Positiva	46 (79,3)	25 (61)	
Linfonodo positivo	Ausência	53 (91,4)	39 (95,2)	0,474
	Presença	5 (8,6)	2 (4,8)	
Invasão vasculolinfática	Ausência	48 (82,7)	30 (73,2)	0,379
	Presença	10 (17,3)	11 (26,8)	

*Mediana do PSA pré-operatório/ **Mediana da positividade

Como foi demonstrado nas Tabelas 6 e 7, a positividade de expressão do marcador Twist 1 não se correlacionou com a expressão de E-caderina e Vimentina no presente estudo.

Tabela 6 - Expressão de E-caderina em relação à expressão de Twist 1.

Positividade (E-caderina)	Positividade (Twist 1)		<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
	< 286000*	≥ 286000*	
Negativo	1 (1,7)	0 (0)	0,234
Mais fraco	35 (60,3)	31 (75,6)	
Mais forte	22 (38)	10 (24,4)	

*Mediana da positividade

Tabela 7 - Expressão de Vimentina em relação à expressão de Twist 1

Positividade (Twist 1)	Positividade (Vimentina)		<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
	Negativo	Positivo	
< 286000*	38 (58,5)	20 (58,8)	0,972
≥ 286000*	27 (41,5)	14 (41,2)	

*Mediana da positividade

d. Snail 1

O algoritmo selecionado para a análise denominado “Pixel Count” é utilizado para quantificar a presença de coloração específica em uma imagem digitalizada. Foi considerado como positivo os casos que apresentavam a intensidade de marcação $\geq 0,1$ e negativo $< 0,1$.

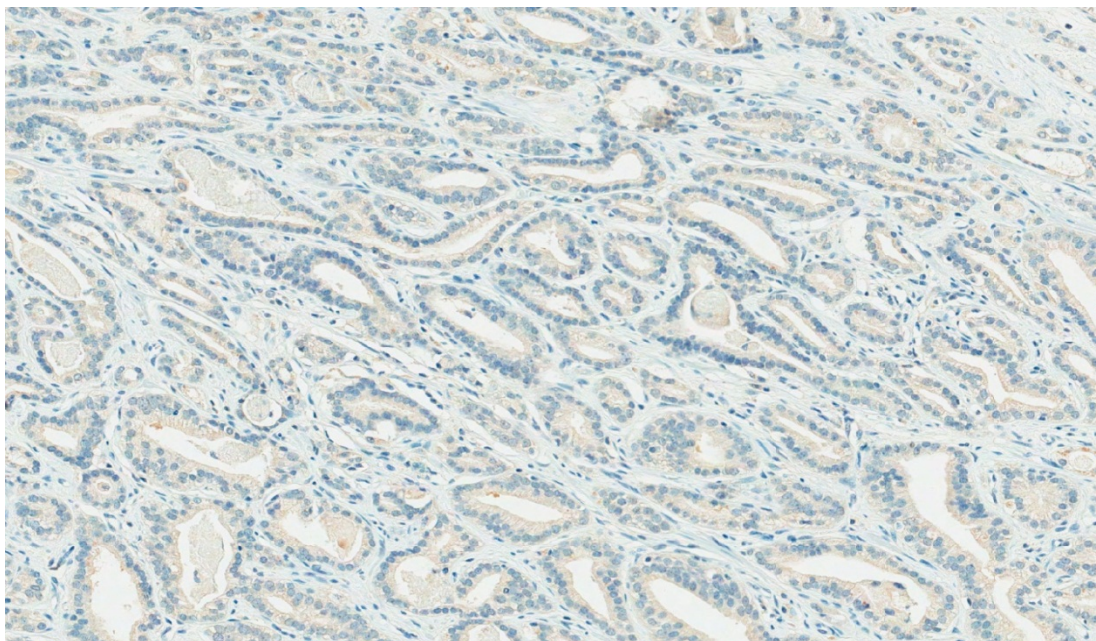


Figura 12 - Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 3 mostrando a expressão do marcador Snail1. (Aumento original 400X)

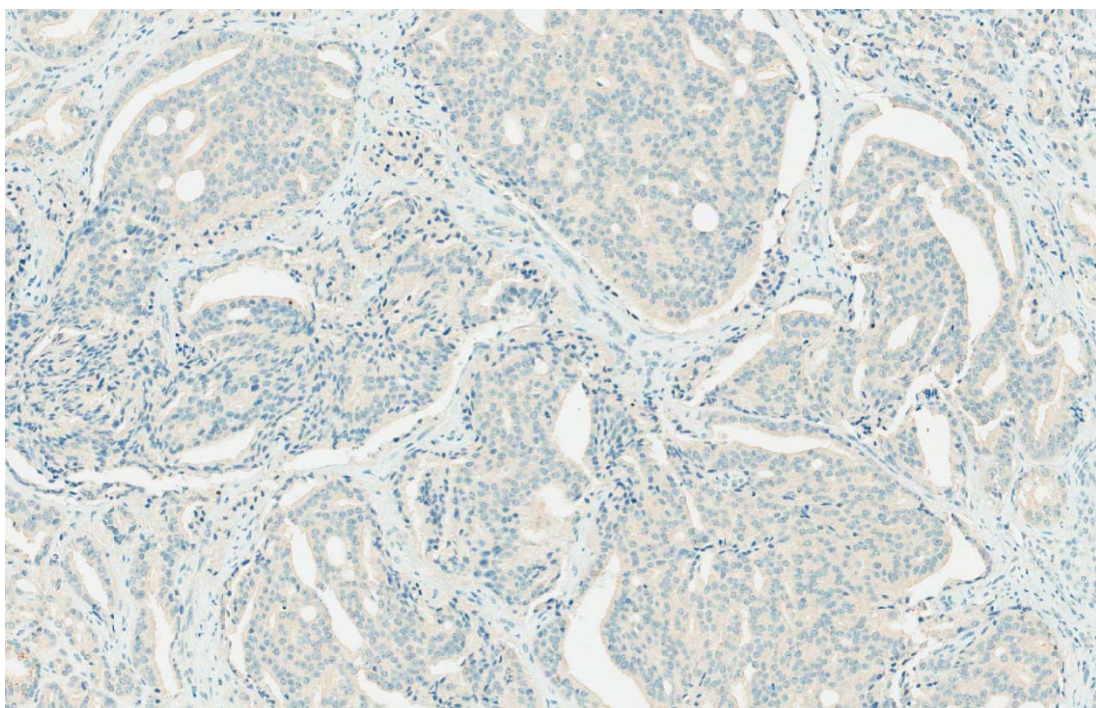


Figura 13 - Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 4 mostrando a expressão do marcador Snail1. (Aumento original 400X)

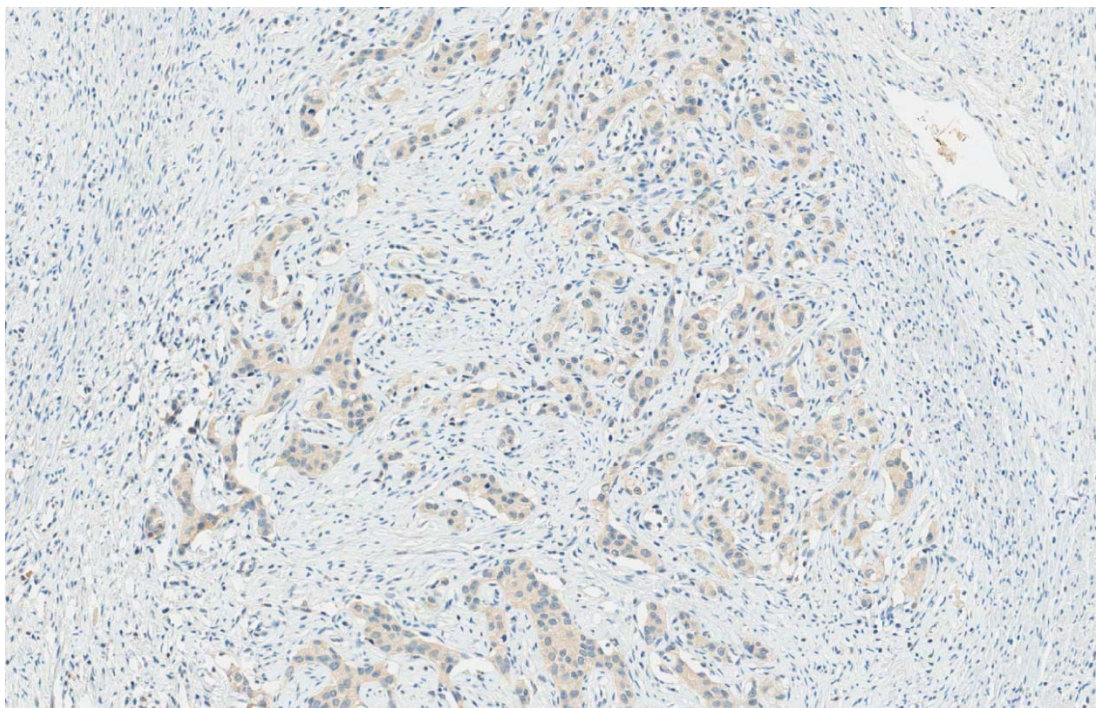


Figura 14 - Epitélio tumoral prostático classificado como padrão de Gleason 5 mostrando a expressão do marcador Snail1. (Aumento original 400X)

Quando comparado frente às variáveis patológicas, foi observada a associação entre a ausência de expressão do marcador Snail 1 com a presença de invasão capsular prostática ($p=0,048$), conforme mostra a Tabela 8.

Tabela 8 - Expressão de Snail 1 em relação às variáveis clínicas e patológicas

Variáveis clínicas	Categoria	Positividade		p
		n (%)	n (%)	
		< 0,1**	≥ 0,1**	
PSA pré-operatório (ng/ ml)	< 10,1*	22 (42,3)	27 (58,7)	0,105
	≥ 10,1*	30 (57,7)	19 (41,3)	
Maior Gleason	3	21 (41,2)	21 (43,8)	0,957
	4	24 (47,1)	22 (45,8)	
	5	6 (11,8)	5 (10,4)	
Estadio TNM	II	14 (27,5)	12 (25)	0,782
	III e IV	37 (72,5)	36 (75)	
Invasão perineural	Ausência	5 (9,8)	7 (14,6)	0,625
	Presença	43 (84,3)	38 (79,2)	
	Extensa	3 (5,9)	3 (6,3)	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	43 (84,3)	39 (81,3)	0,686
	Presença	8 (15,7)	9 (18,7)	
Invasão capsular	Ausência	7 (14)	17 (35,4)	0,048
	Focal	33 (66)	24 (50)	
	ECE	10 (20)	7 (14,6)	
Margem cirúrgica	Negativa	16 (31,4)	12 (25)	0,482
	Positiva	35 (68,6)	36 (75)	
Linfonodo positivo	Ausência	45 (88,2)	47 (97,9)	0,060
	Presença	6 (11,8)	1 (2,1)	
Invasão vasculolinfática	Ausência	38 (74,5)	40 (83,4)	0,347
	Presença	13 (25,5)	8 (16,7)	

*Mediana do PSA pré-operatório/ **Mediana da positividade

É demonstrada na Tabela 9, a associação entre a positividade de expressão do marcador Vimentina e a positividade de expressão do marcador Snail1 ($p=0,027$).

Tabela 9 - Expressão de E-caderina em relação à expressão de Snail 1

Positividade (E-caderina)	Positividade (Snail)		<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
	< 0,1*	≥ 0,1*	
Negativo	0 (0)	1 (2,2)	0,554
Mais fraco	36 (67,9)	30 (65,2)	
Mais forte	17 (32,1)	15 (32,6)	

*Mediana da positividade

Tabela 10 - Expressão de Vimentina em relação à expressão de Snail 1

Positividade (Vimentina)	Positividade (Snail)		<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
	< 0,1*	≥ 0,1*	
Negativo	40 (75,5)	25 (54,3)	0,027
Positivo	13 (24,5)	21 (45,7)	

*Mediana da positividade

4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA (ICC/IF)

Nas células DU-145, observa-se que o marcador TWIST 1 encontra-se no núcleo e o marcador Snail 1 no citoplasma (vide Figuras 15 e 16 respectivamente).

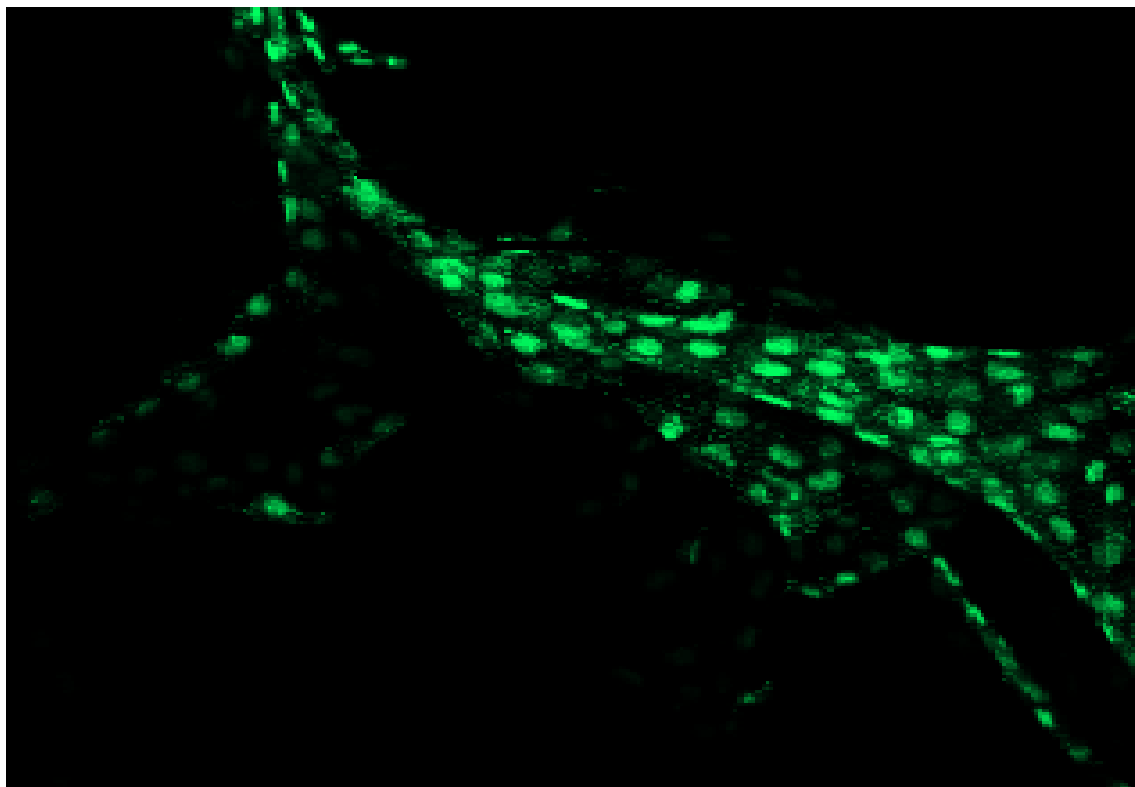


Figura 15 - Presença de marcação nuclear indicando o marcador Twist 1 na linhagem celular DU-145. (Aumento original 400X)

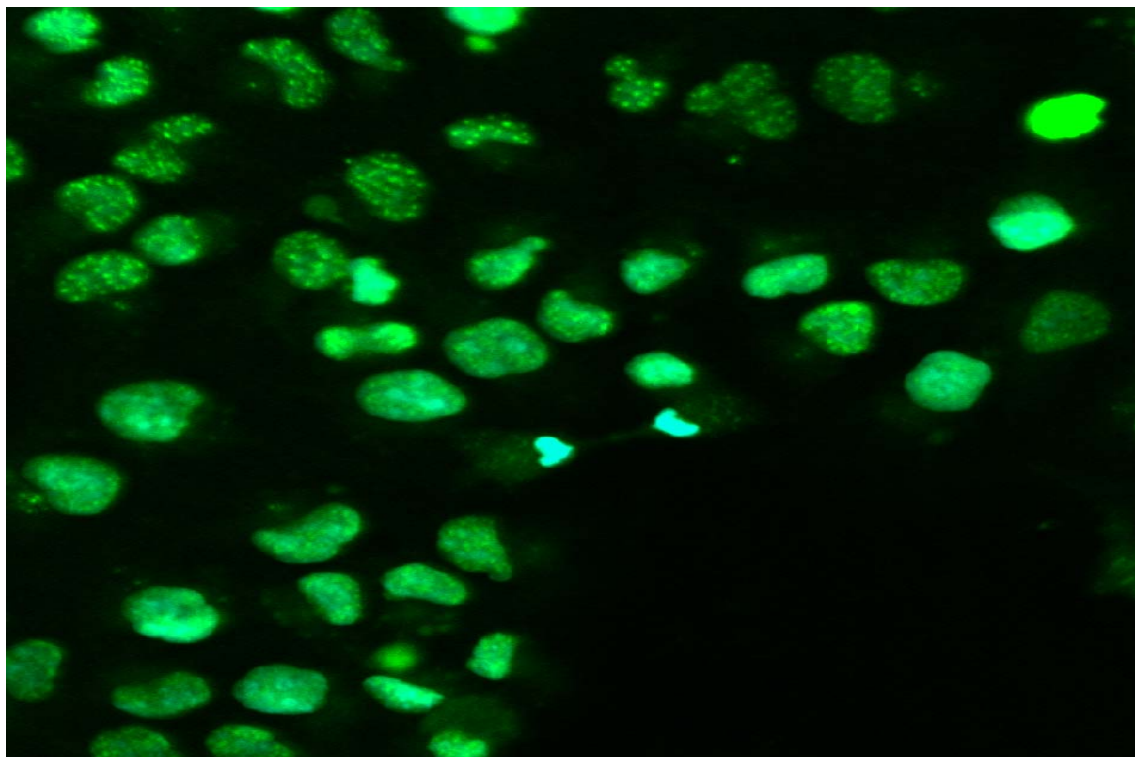


Figura 16 - Presença de marcação nuclear e citoplasmática indicando o marcador Snail 1 na linhagem celular DU-145. (Aumento original 800X)

4.3 WESTERN BLOT

Conforme os resultados do Western-blot aplicado em células DU-145, para o marcador Snail 1, e em células HEK293 para o marcador Twist 1, foi obtida uma banda de aproximadamente 25 kDa para ambos os anticorpos. As células MDA-231 (adenocarcinoma de mama) foram utilizadas como controle positivo da reação. (vide Figuras 17 e 18 abaixo, respectivamente).

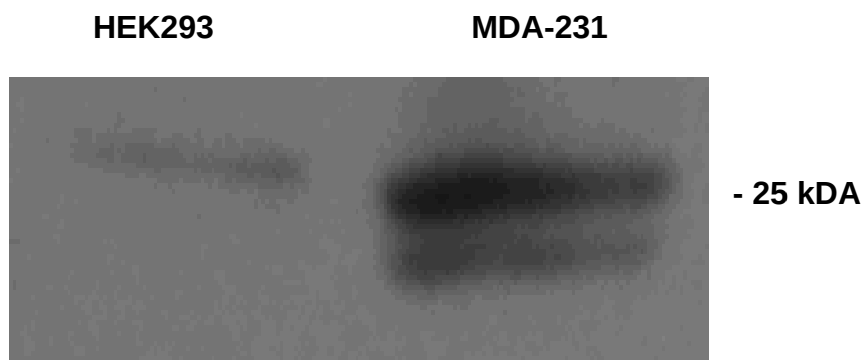


Figura 17 – Western-blot em células HEK293 do anticorpo Twist 1 demonstrando a banda da respectiva proteína.

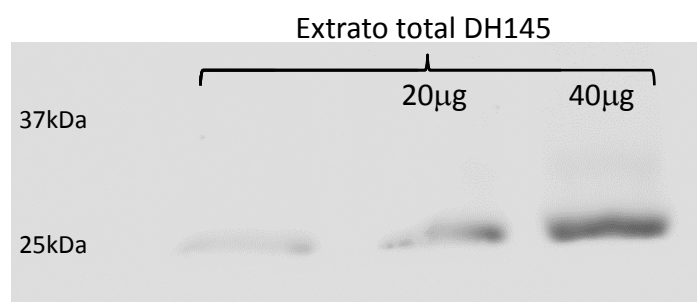


Figura 18 - Western-blot em células DU-145, em diferentes concentrações de lisado protéico do anticorpo Snail 1 demonstrando a banda da respectiva proteína.

4.4 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.4.1 Sobrevida global (SG)

Durante o seguimento, ocorreram 9 óbitos. A SG em 120 meses foi de 90,9%.

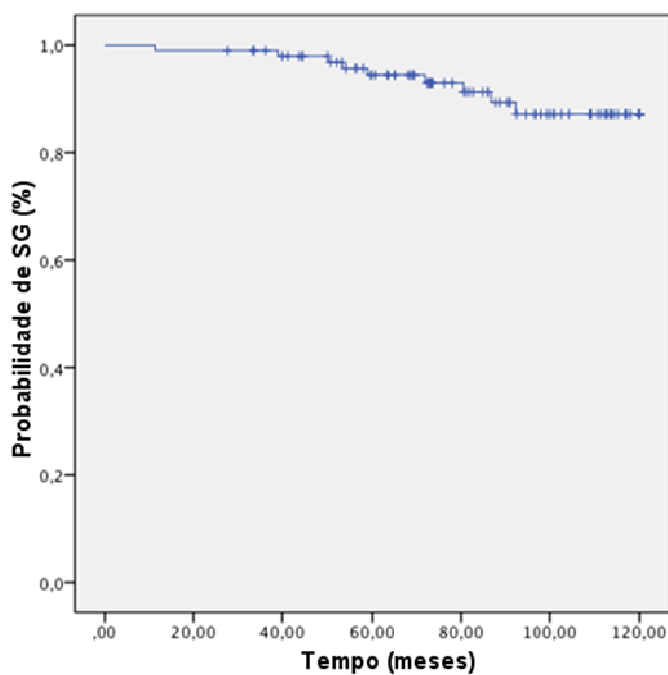


Figura 19 – Curva de sobrevida global em 120 meses para os 99 pacientes portadores de CaP.

Análise Univariada

Variáveis clínicas e patológicas

Dentre as variáveis clínicas e patológicas, as que influenciaram a SG foram: invasão vasculolinfática ($p < 0,001$), maior Gleason ($p < 0,001$) e risco de D'Amico ($p = 0,001$) conforme ilustrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 10 anos de acordo com as variáveis clínicas e patológicas em 99 pacientes portadores de CaP.

Variáveis	Categoria	SG em 10 anos (%)	<i>p</i>
PSA pré-operatório	< 10,1*	91,8	0,971
	≥ 10,1*	91,8	
Maior Gleason	3	100	<0,001
	4	89,1	
	5	63,6	
Estadio TNM	II	96,2	0,296
	III e IV	89	
Invasão perineural	Ausência	100	0,223
	Presença	88,9	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	92,7	0,125
	Presença	82,4	
Invasão capsular	Ausência	91,7	0,940
	Presença	91,2	
Margem positiva	Ausência	96,4	0,301
	Presença	88,7	
Linfonodo positivo	Ausência	91,3	0,351
	Presença	85,7	
Invasão vasculolinfática	Ausência	97,4	< 0,001
	Presença	71,4	
Risco de D'Amico	Baixo	100	0,001
	Intermediário	94,4	
	Alto	76,7	

*Mediana do PSA pré-operatório

Variáveis biomoleculares

Os pacientes que apresentaram a expressão do marcador Vimentina no epitélio tumoral apresentaram menor SG ($p=0,021$) conforme mostra a Tabela 12 e a Figura 20.

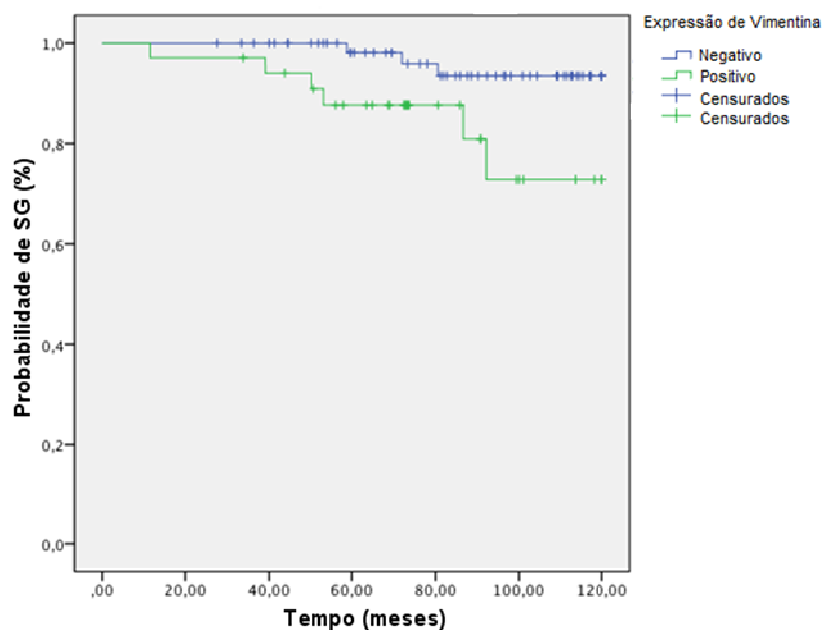


Figura 20 - Curva de sobrevida global em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo e positivo de expressão de Vimentina.

Tabela 12 - Associação das expressões dos marcadores à sobrevida global em 10 anos.

Marcador	Categoria	SG em 10 anos (%)	p
Snail 1	< 199*	90,2	0,742
	≥ 199*	91,7	
Vimentina	Negativo	95,4	0,021
	Positivo	82,4	
Twist 1	< 286000*	87,9	0,269
	≥ 286000*	95,1	
E-caderina	Negativo	100	0,636
	Mais fraco	89,4	
	Mais forte	93,8	

*Mediana da positividade

Não foi observado o impacto do grau de expressão dos marcadores Snail 1 (p=0,742), Twist 1(p=0,269) e E-caderina (p=0,636) na SG, conforme demonstrado a seguir nas Figuras 21, 22 e 23.

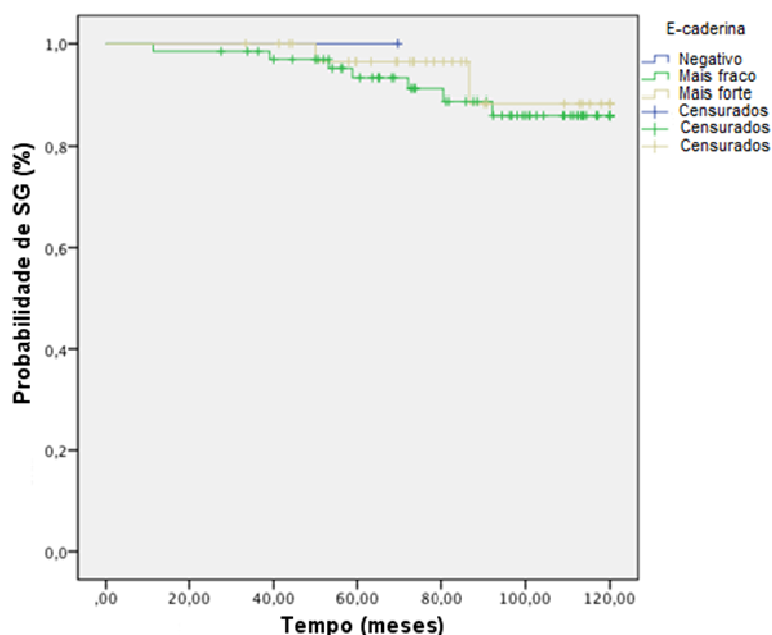


Figura 21 - Curva de sobrevida global em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo, mais fraco e mais forte de expressão de E-caderina.

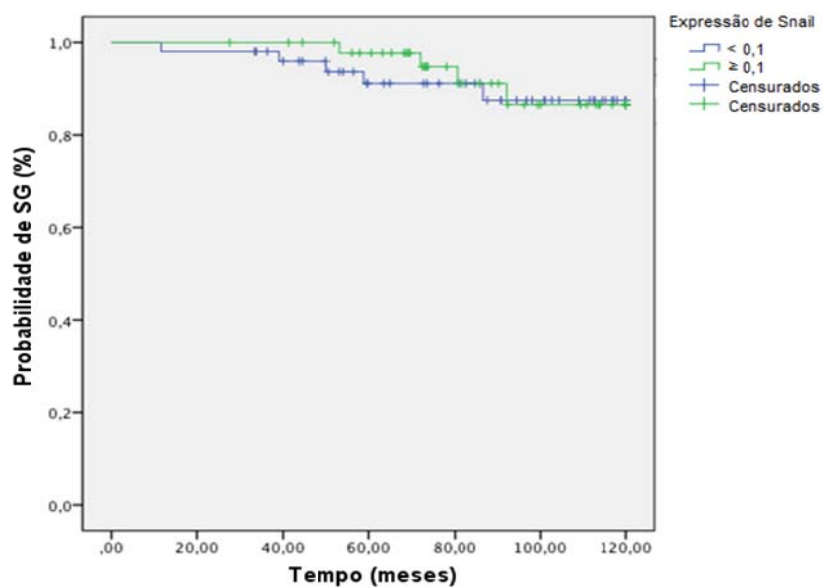


Figura 22 - Curva de sobrevida global em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em $<0,1$ (negativo) e $\geq 0,1$ (positivo) de expressão de Snail 1.

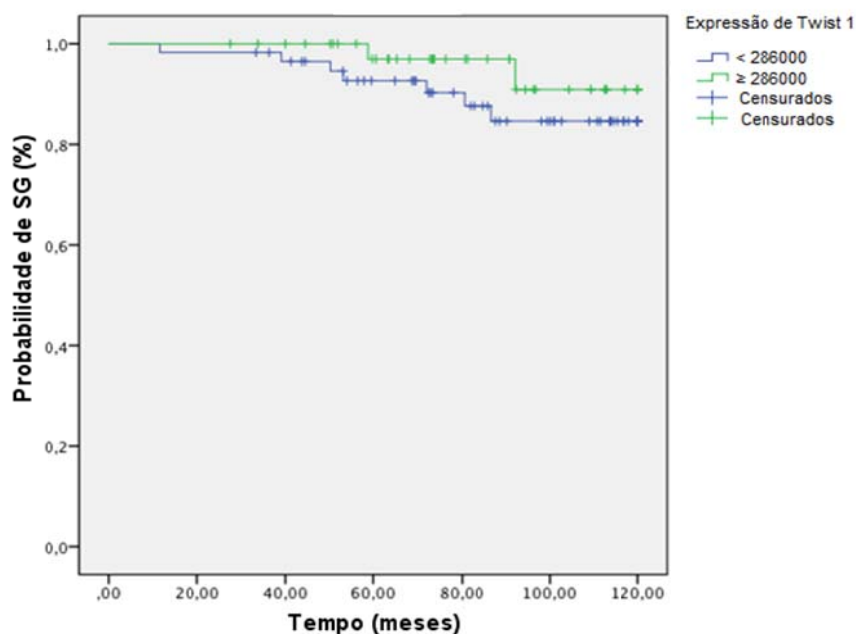


Figura 23 - Curva de sobrevida global em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em <286000 (negativo) e ≥ 286000 (positivo) de expressão de Twist 1.

Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para SG bem como aquelas que atingiram valores de p até 0,20 foram selecionadas para a análise multivariada e estão listadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.

Variáveis	p
Maior Gleason	0,001
Invasão vasculolinfática	0,001
Risco de D'Amico	0,001
Expressão de Vimentina	0,021
Invasão da vesícula seminal	0,125

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, a invasão vasculolinfática (RR= 1,236; IC 95% [0,991-1,541]) e o risco D'Amico (RR=5,566; IC 95% [1,39 – 22,281]) se apresentaram como fatores independentes para o risco de óbito. (Tabela 14)

Tabela 14 – Risco de óbito em 99 pacientes portadores de CaP. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variáveis	Risco Relativo (RR)	Intervalo de Confiança (IC) de 95%	Categoria
Invasão vasculolinfática	1,236	0,991 - 1,541	Presença
Risco de D'Amico	5,566	1,39 - 22,281	Alto

4.4.2 Sobrevida Livre de Recidiva Bioquímica (SLRB)

Setenta e três pacientes apresentaram recidiva bioquímica (73,73%). A SLRB em 10 anos na população estudada foi de 13,91% como ilustrado na Figura 24.

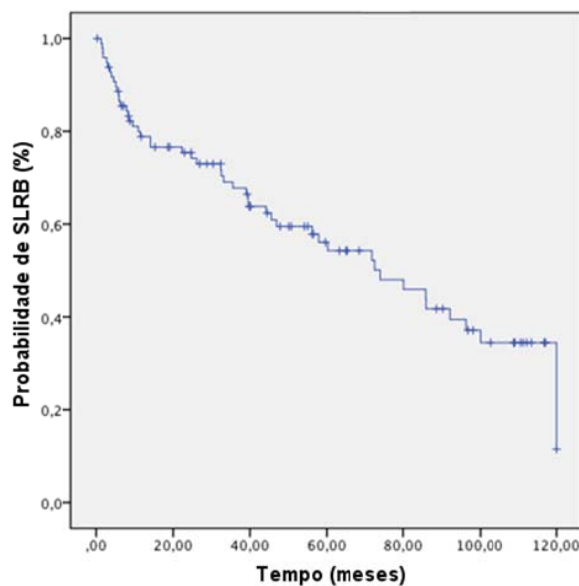


Figura 24 – Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 120 meses para os 99 pacientes com CaP.

Análise Univariada

Variáveis clínicas e patológicas

As variáveis clínicas e patológicas que influenciaram a SLRB na análise univariada foram : maior Gleason ($p= 0,001$), invasão da vesícula seminal ($p=0,003$), linfonodo positivo ($p=0,013$), invasão vasculolinfática ($p=0,013$), risco de D'Amico ($p= 0,001$) e a Vimentina ($p=0,002$), conforme descrito na Tabela 15.

Tabela 15 - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 10 anos de acordo com as variáveis clínicas e patológicas em 99 pacientes portadores de CaP.

Variáveis	Categoria	SLRB em 10 anos (%)	<i>p</i>
PSA pré-operatório	< 10,1*	53,1	0,068
	≥ 10,1*	47,9	
Maior Gleason	3	69	< 0,001
	4	40	
	5	18,2	
Estadio TNM	II	34,6	0,381
	III + IV	55,6	
Invasão perineural	Ausência	66,7	0,204
	Presença	47,5	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	53,7	0,003
	Presença	31,2	
Invasão capsular	Ausência	45,8	0,995
	Presença	48,2	
Margem positiva	Ausência	42,9	0,806
	Presença	52,9	
Linfonodo positivo	Ausência	51,1	0,013
	Presença	33,3	
Invasão vasculolinfática	Ausência	55,8	<0,001
	Presença	30	
Risco de D'Amico	Baixo	57,6	<0,001
	Intermediário	60	
	Alto	30	

*Mediana do PSA pré-operatório

Variáveis biomoleculares

Os pacientes que apresentaram a expressão do marcador Vimentina no epitélio tumoral apresentaram menor SLRB ($p=0,02$) conforme mostra a Tabela 16 e a Figura 25.

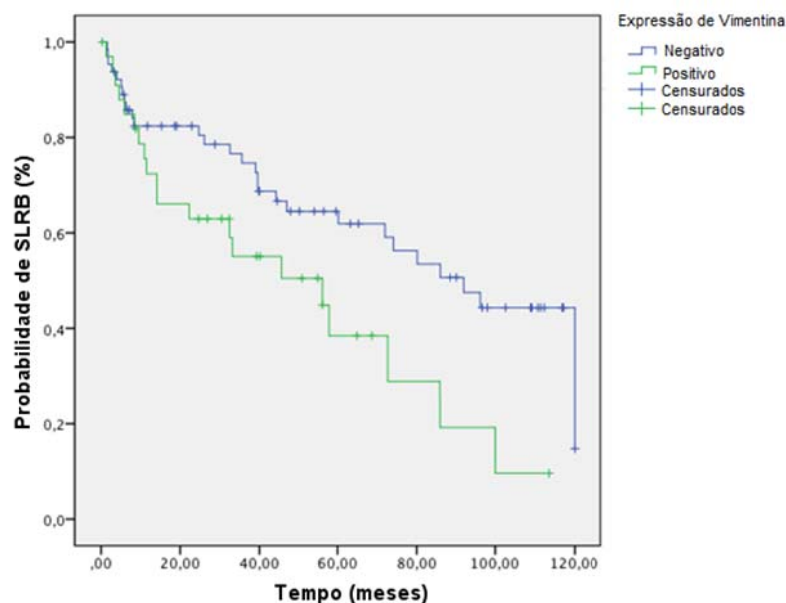


Figura 25 - Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo e positivo de expressão de Vimentina.

Tabela 16 - Associação das expressões dos marcadores à sobrevida livre de recidiva bioquímica em 10 anos.

Marcador	Categoria	SLRB em 10 anos (%)	<i>p</i>
Snail 1	< 199*	46	0,365
	≥ 199*	54,2	
Vimentina	Negativo	54,7	0,020
	Positivo	41,2	
Twist 1	< 286000*	51,7	0,951
	≥ 286000*	47,5	
E-caderina	Negativo	100	0,957
	Mais fraco	47,7	
	Mais forte	53,1	

*Mediana da positividade

Não foi observado o impacto do grau de expressão dos marcadores Snail 1 ($p=0,365$), Twist 1 ($p=0,951$) e E-caderina ($p=0,957$) na SLRB, conforme demonstrado a seguir nas Figuras 26, 27 e 28.

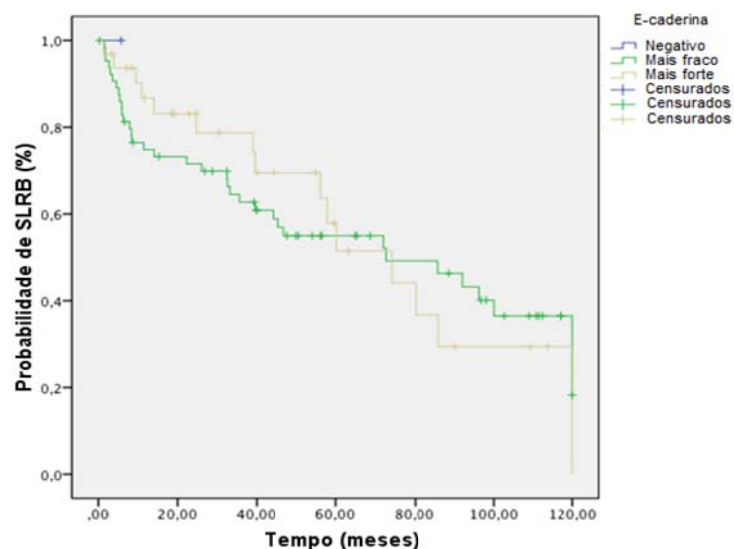


Figura 26 - Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo, mais fraco e mais forte de expressão de E-caderina.

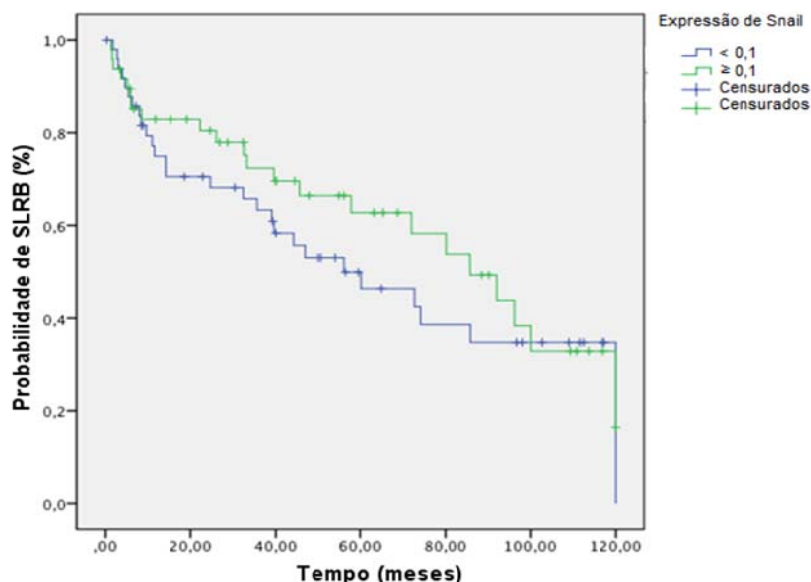


Figura 27 - Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em <0,1 (negativo) e $\geq 0,1$ (positivo) de expressão de Snail 1.

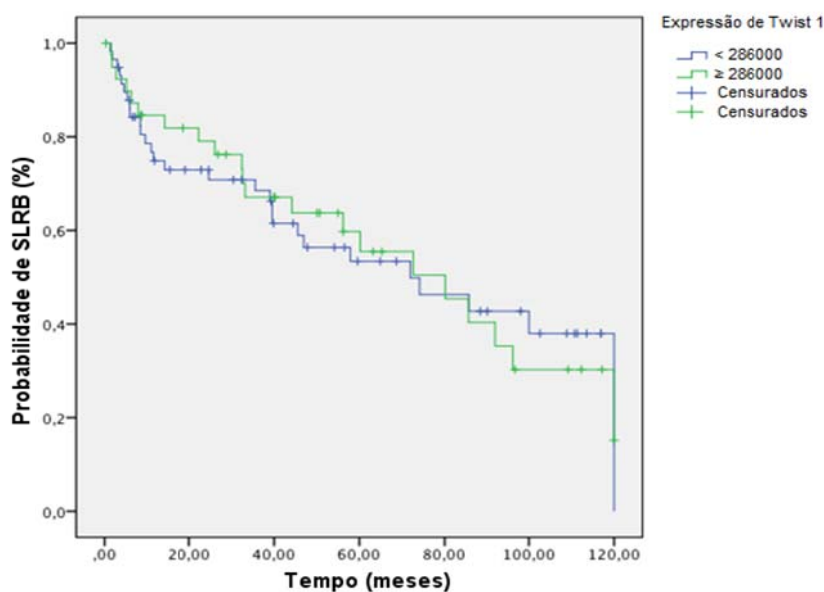


Figura 28 - Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em <286000 (negativo) e ≥ 286000 (positivo) de expressão de Twist 1.

Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para SLRB bem como aquelas que atingiram valores de p até 0,20 foram selecionadas para a análise multivariada e estão listadas na Tabela 17.

Tabela 17 – Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.

Variáveis	p
Maior Gleason	0,001
Invasão vasculolinfática	0,001
Risco de D'Amico	0,001
Expressão de Vimentina	0,020
Invasão da vesícula seminal	0,003
Linfonodo positivo	0,013

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, o maior Gleason (RR= 4,484; IC 95% [2,724 – 7,381]) e a presença de linfonodo positivo (RR=6,884; IC 95% [2,276 – 20,816]) se apresentaram como fatores independentes para o risco de recidiva bioquímica. (Tabela 18)

Tabela 18 - Risco de recidiva bioquímica em 99 pacientes portadores de CaP. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variáveis	Risco Relativo (RR)	Intervalo de Confiança (IC) de 95%	Categoria
Maior Gleason	4,484	2,724 - 7,381	5
Linfonodo Positivo	6,884	2,276 - 20,816	Presença

4.4.3 Sobrevida Livre de Recidiva Clínica (SLRC)

Dezenove pacientes apresentaram metástases. A SLRC em 10 anos na população estudada foi de 79,81% como ilustrado na Figura 29.

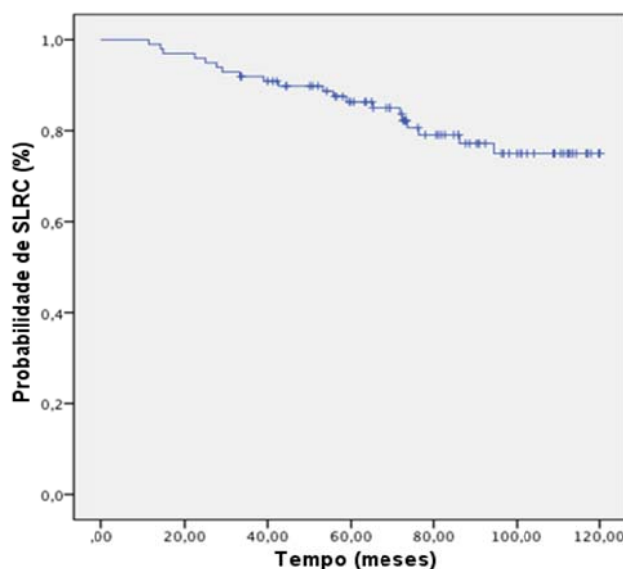


Figura 29 – Curva de sobrevida livre de recidiva clínica em 120 meses para os 99 pacientes com CaP.

Análise Univariada

Variáveis clínicas e patológicas

As variáveis clínicas e patológicas que influenciaram a SLRC na análise univariada foram: maior Gleason ($p= 0,001$), invasão da vesícula seminal ($p=0,015$), invasão vasculolinfática ($p= 0,001$), risco de D'Amico ($p= 0,001$) e a Vimentina ($p=0,047$), conforme descrito na Tabela 19.

Tabela 19 - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de recidiva clínica em 10 anos de acordo com as variáveis clínicas e patológicas em 99 pacientes portadores de CaP.

Variáveis	Categoria	SLRC em 10 anos (%)	<i>p</i>
PSA pré-operatório	< 10,1*	85,7	0,258
	≥ 10,1*	75,5	
Maior Gleason	3	97,6	< 0,001
	4	73,9	
	5	36,4	
Estadio TNM	II	84,6	0,444
	III + IV	78,1	
Invasão perineural	Ausência	83,3	0,661
	Presença	80,2	
Invasão da vesícula seminal	Ausência	84,1	0,015
	Presença	58,8	
Invasão capsular	Ausência	79,2	0,948
	Presença	78,9	
Margem positiva	Ausência	78,6	0,858
	Presença	80,3	
Linfonodo positivo	Ausência	81,5	0,050
	Presença	57,1	
Invasão vasculolinfática	Ausência	89,6	< 0,001
	Presença	47,6	
Risco de D'Amico	Baixo	97	< 0,001
	Intermediário	86,1	
	Alto	53,3	

*Mediana do PSA pré- operatório

Variáveis biomoleculares

Os pacientes que apresentaram a expressão do marcador Vimentina no epitélio tumoral apresentaram menor SLRC ($p=0,047$) conforme mostra a Tabela 20 e a Figura 30.

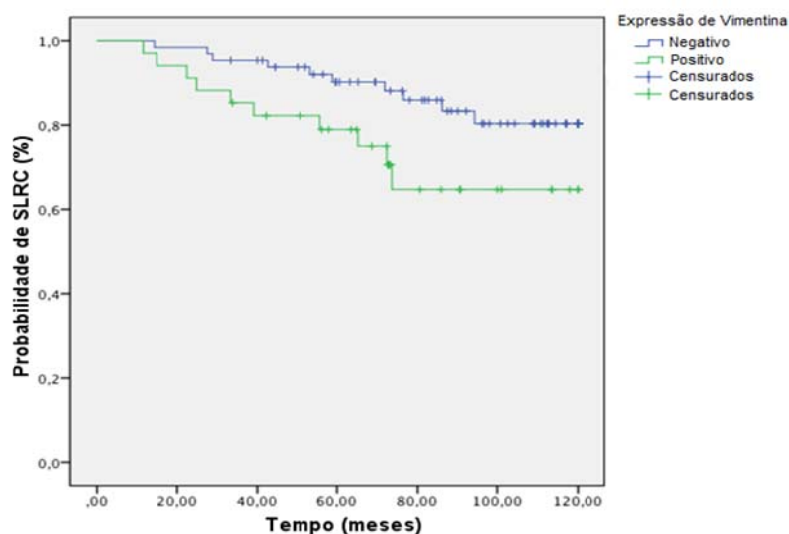


Figura 30 - Curva de sobrevida livre de recidiva clínica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo e positivo de expressão de Vimentina.

Tabela 20 - Associação das expressões dos marcadores à sobrevida livre de recidiva clínica em 10 anos.

Marcador	Categoria	SLRC em 10 anos (%)	<i>p</i>
Snail 1	< 199*	80,4	0,927
	≥ 199*	79,2	
Vimentina	Negativo	84,6	0,047
	Positivo	70,6	
Twist 1	< 286000*	75,9	0,279
	≥ 286000*	85,4	
E-caderina	Negativo	100	0,553
	Mais fraco	77,3	
	Mais forte	84,4	

*Mediana da positividade

Não foi observado o impacto do grau de expressão dos marcadores Snail 1 ($p=0,927$), Twist 1 ($p=0,279$) e E-caderina ($p=0,553$) na SLRC, conforme demonstrado a seguir nas Figuras 31, 32 e 33.

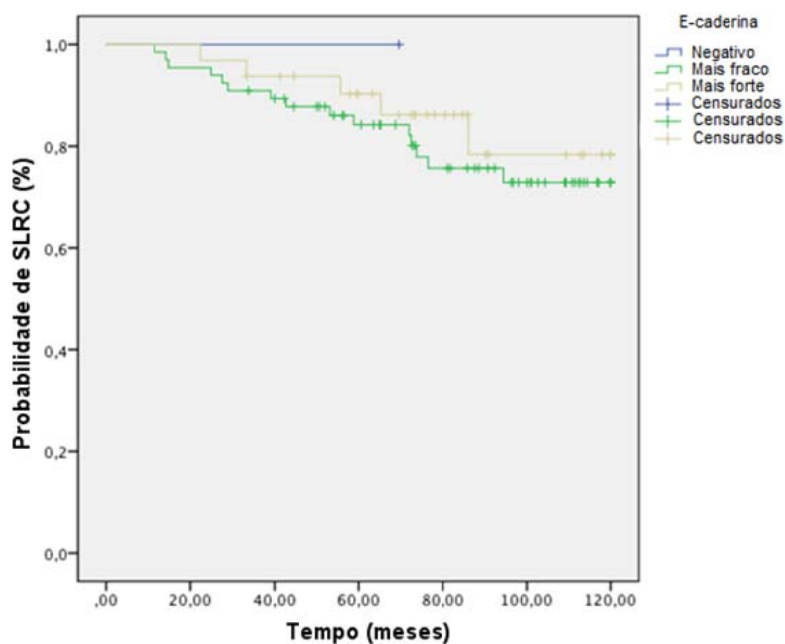


Figura 31 – Curva de sobrevida livre de recidiva clínica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em negativo, mais fraco e mais forte de expressão de E-caderina.

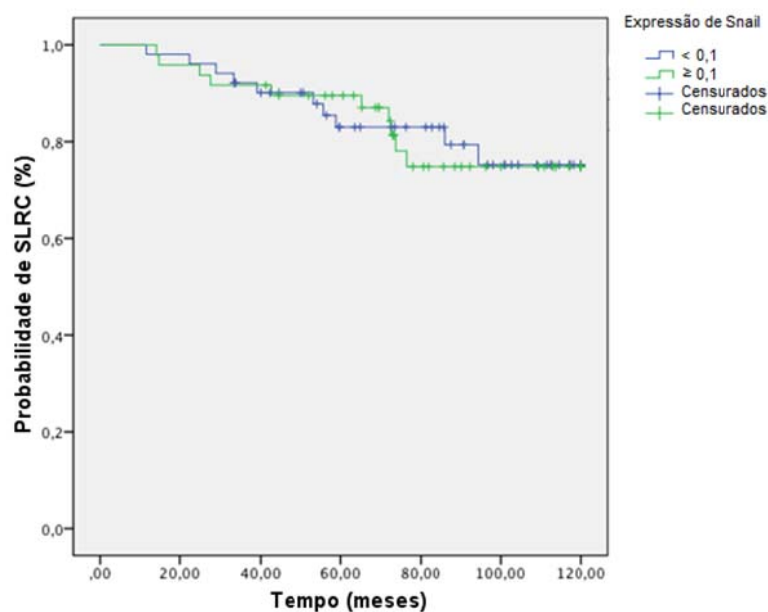


Figura 32 - Curva de sobrevida livre de recidiva clínica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em $<0,1$ (negativo) e $\geq 0,1$ (positivo) de expressão de Snail 1.

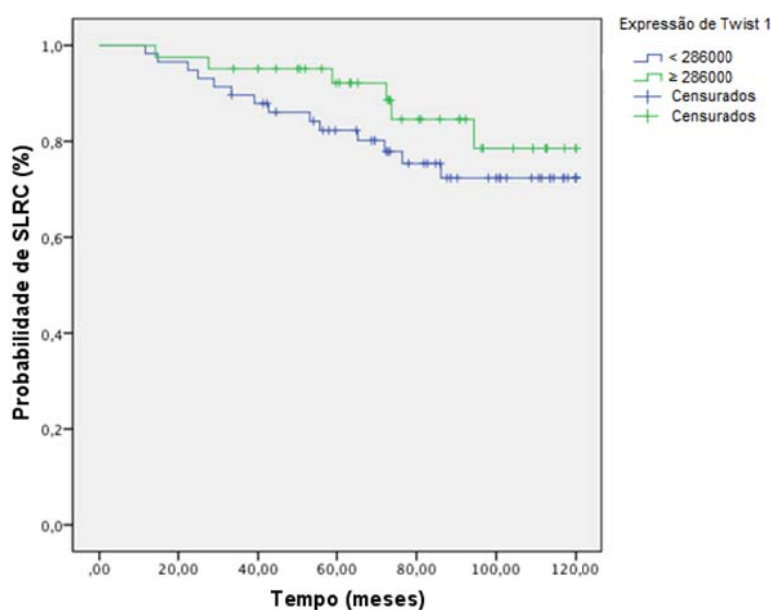


Figura 33 - Curva de sobrevida livre de recidiva clínica em 120 meses para 99 pacientes portadores de CaP estratificados em <286000 (negativo) e ≥ 286000 (positivo) de expressão de Twist 1.

Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para SLRC bem como aquelas que atingiram valores de p até 0,20 foram selecionadas para a análise multivariada e estão listadas na Tabela 21.

Tabela 21 – Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.

Variáveis	p
Maior Gleason	0,001
Invasão vasculolinfática	0,001
Risco de D'Amico	0,001
Invasão da vesícula seminal	0,015
Expressão de Vimentina	0,047
Linfonodo positivo	0,050

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, o maior Gleason (RR= 3,230; IC 95% [1,238 – 8,423]), a presença de linfonodo positivo (RR= 3,873; IC 95% [1,050 – 14,278]) e o risco de D'Amico (RR= 2,364; IC 95% [0,876 – 6,377]) se apresentaram como fatores independentes para o risco de recidiva clínica. (Tabela 22)

Tabela 22 - Risco de recidiva clínica em 99 pacientes portadores de CaP. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variáveis	Risco Relativo (RR)	Intervalo de Confiança (IC) de 95%	Categoria
Maior Gleason	3,23	1,238 - 8,423	5
Risco de D'Amico	2,364	0,876 - 6,377	Alto
Linfonodo Positivo	3,873	1,050 - 14,278	Presença

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS

O CaP é a segunda causa de óbito mais frequente em homens. Embora alguns fatores de risco genéticos já tenham sido identificados, nenhum deles está fortemente associado com a doença como os marcadores de risco vistos em câncer de mama e cólon (BERNEY e CHENG 2012). As diferenças entre a incidência e grupos étnicos sugerem que o CaP se comporta de maneira diferente nos grupos. Embora a maioria dos pacientes atualmente diagnosticados apresentem clinicamente a doença órgão-confinado, o conhecimento ainda é limitado quanto à progressão, recorrência e predição de resultado.

A progressão da doença é pode resultar de predisposição, estimulação, interação ambiental ou de uma combinação de ambos tornando algumas células neoplásicas mais agressivas, podendo propiciar invasão de órgãos adjacentes ou disseminação metastática linfática e hematogênica (YE et al. 2007).

Atualmente, esforços são realizados para reconhecer os pacientes com CaP agressivo que necessitam de algum tratamento imediato. Além disso, estratificando pacientes de acordo com riscos individuais de progressão, pode-se propor para aqueles casos de maior risco de recaída

ou progressão, tratamentos mais agressivos, multimodais e seguimento clínico mais intenso.

Na tentativa de predição dos desfechos, o emprego de variáveis demográficas, clínicas e patológicas de modo isolado tem valor limitado, uma vez que o prognóstico sofre influencia multifatorial. Assim, para maior acurácia prognóstica na última década a literatura passou a lançar mão de modelos que incluem múltiplas variáveis concomitantemente.

Usualmente são incluídas nestes modelos informações demográficas (idade, raça), clínicas (níveis de PSA, estágio, estado geral, por exemplo) e patológicas nestes modelos (grau, invasão vasculolinfática, número e proporção de fragmentos acometidos a biópsia, graduação de Gleason, entre outros). Ainda assim, a acurácia destes modelos não é perfeita. Na maioria destes a área sobre a curva ROC, oscila entre 65 a 78-80% das vezes

Como supra-citado, muitos pacientes recebem o diagnóstico do CaP quando ainda estão assintomáticos. Por vezes, cerca de 12 anos antes de qualquer manifestação clínica, no fenômeno conhecido como “lead time bias” muitos casos (20-40%) de baixa agressividade biológica são super diagnosticados e podem resultar em super tratamentos com os inerentes efeitos colaterais nas esferas sexual, urinária e psicológica entre outras. Seria interessante identificarmos adequadamente estes casos e poupar estes indivíduos de terapêuticas desnecessárias.

Em contrapartida, há casos que requerem tratamentos mais agressivos e procedimentos adjuvantes à prostatectomia radical ou à

radioterapia. Por melhores que sejam as ferramentas atuais, a extensão dos fragmentos na biópsia e o emprego de modernos aparelhos de diagnóstico por imagem, ainda assim o subestadiamento é uma realidade, verificada ao redor de 30% dos casos.

Assim, a principal dificuldade que o clínico encontra é o grande número de casos diagnosticados no estágio inicial da doença, dos quais uma proporção razoável tem progressão da doença e evoluem para a morte se não forem tratados. Tal progressão pode ser resultado de mutações aleatórias em que um tumor indolente não pode ser distinguido de um tumor agressivo ao longo do tempo do diagnóstico (DAMBER e AUS 2008). A rotina bioquímica, como o PSA, e os parâmetros cirúrgicos como o grau de Gleason, margem, comprometimento linfonodal e a invasão de vesícula, oferecem uma visão do potencial biológico do tumor. Aproximadamente, 50 a 60% pacientes com CaP tem doença clinicamente localizada, apresentam níveis de PSA entre 4 e 10 ng/ml e escore de Gleason biópsia entre 6 e 7, demonstram uma limitação na capacidade de prognóstico destes marcadores.

Entre 20 a 30% dos pacientes apresentam escore de Gleason maior no espécime da prostatectomia radical quando comparado ao espécime da biópsia transretal prévia. Foi demonstrado por LEITE et al. (2008) uma concordância exata de apenas 56,9% entre o escore de Gleason da biópsia e prostatectomia radical, com uma média de 13 fragmentos examinados. Em 29,1% dos casos comparados, o escore de Gleason foi subestimado e em 14% superestimado. Quando um carcinoma recebeu o escore 6 (3+3), em 44% das vezes o escore final foi 7 ou 8. Quando o tumor foi considerado de

alto grau na biópsia, com escores de Gleason de 8, 9 ou 10, em 29,2% dos casos a graduação final foi alterada para 7 ou mais raramente 6. Estes dados estão de acordo com a literatura e demonstram a fragilidade do sistema de graduação quando se analisa o material da biópsia.

Até 57% dos espécimens cirúrgicos de pacientes considerados como portadores de neoplasias de baixo risco, considerados selecionáveis para protocolos de vigilância ativa, quando submetidos à cirurgia apresentam maiores escores de Gleason, invasão de vesículas seminais ou doença não confinada ao órgão. Nesses casos, seria interessante dispormos de ferramentas prognósticas de risco desfavorável mais precisas.

Mesmo esgotando todas as variáveis demográficas, clínicas e patológicas conhecidas, isoladamente ou em análises multivariadas, ainda não somos capazes de estabelecer precisamente o prognóstico de nossos pacientes. Desta forma, recentemente tem se buscado marcadores biomoleculares de modo extensivo na literatura nos últimos anos.

Em nossa instituição foi demonstrado que perdas genômicas e deleções homozigóticas do gene PTEN estão associadas com recidiva bioquímica precoce após a prostatectomia radical ($p=0,002$), e se associam com extensão extraprostática e invasão de vesículas seminais (YOSHIMOTO et al. 2007) e COUTINHO-CAMILLO et al. (2011) reportaram que as claudinas são hiporeguladas no CaP, e que embora não influenciem as taxas de sobrevida estudadas, se associaram com a ocorrência de invasão perineural.

Neste estudo, além de avaliarmos variáveis clínico-patológicas conhecidas, concentramos esforços na análise de marcadores (E-caderina, Twist, Snail e Vimentina), os quais já demonstraram algum valor prognóstico em outras neoplasias sólidas.

Por questões de custos e tempo para conclusão do mestrado, embora estando numa Instituição terciária com grande volume cirúrgico de prostatectomias radicais, optamos por uma casuística restrita (100 pacientes), escolhidos aleatoriamente, a partir de um banco de dados de 1200 pacientes consecutivamente tratados em nossa Instituição. A partir desta análise piloto, e se caso indentificássemos algum(s) marcador(s) com potencial prognóstico, poderíamos empregá-lo(s) numa maior casuística no futuro, com técnicas de biologia molecular, de maior acurácia, como proteômica, genômica ou transcriptômica deste(s) marcador(s).

A despeito do número limitado de casos, trabalhamos com num grupo de pacientes submetidos à análise e revisão anatomopatológica criteriosa, com dados de seguimento bastante adequados, e submetidos à técnicas de Imuno-histoquímica e de biologia molecular de excelência.

5.2 VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS

O aumento do escore de Gleason está diretamente relacionado a diversos aspectos histopatológicos da doença, tais como invasão do espaço linfovascular, tamanho do tumor, existência de margem cirúrgica positiva e estadio patológico, incluindo extensão extraprostática e metástase. O grau

histológico da peça cirúrgica provinda da prostatectomia radical, incluindo o obtido pelo escore de Gleason, é um dos mais poderosos preditores de recidiva bioquímica após a cirurgia. Os padrões 4 e 5 são representativos de um maior risco para os pacientes. A presença de qualquer carcinoma de alto grau, inclusive sob a forma de um padrão terciário, compreendendo uma porcentagem ínfima do tumor, possui um impacto deletério nas taxas de cura do câncer de próstata (CaP). Pacientes com um escore de Gleason 7 apresentam uma evolução clínica intermediária em comparação aos pacientes que apresentam escore de Gleason até 6 e aqueles situados entre 8 e 10. Foi demonstrado por ALENDÁ et al. em 2011 que pacientes com escore de Gleason 7(4+3) apresentaram um maior risco de recidiva bioquímica em comparação aos pacientes com um escore de Gleason 7(3+4), sendo o padrão primário 4 um fator prognóstico independente para a ocorrência da recidiva bioquímica, caracterizada pela elevação do PSA após a prostatectomia radical (HUMPHREY 2004).

Em relação à SG, as análises univariada e multivariada do presente trabalho corroboram a literatura em relação aos fatores prognósticos mais tradicionais para o CaP. Na análise univariada, pacientes com o maior escore de Gleason da biópsia (5; $p= 0,001$), invasão vasculolinfática ($p= 0,001$) e segundo D'Amico classificados como alto risco em relação à falha bioquímica (estadio T3, escore de Gleason ≥ 8 e PSA >20 ; $p=0,001$) apresentaram uma menor sobrevida global. Na análise multivariada, a invasão vasculolinfática (RR= 1,236; IC 95% [0,991-1,541]) e o risco D'Amico (RR=5,566; IC 95% [1,39 –22,281]) permaneceram como fatores

prognósticos independentes em relação ao risco de óbito em 10 anos.

Em diversas neoplasia sólidas, a invasão linfovascular se associa com eventos desfavoráveis e maior risco de progressão de doença. No CaP este evento sua se associa a maior risco de recidiva local e a distância.

Já em relação à SLRB na população estudada, a análise univariada mostrou que pacientes com o maior escore de Gleason da biópsia (5; $p=0,001$), invasão de vesícula seminal ($p=0,003$), invasão vasculolinfática ($p=0,001$), linfonodo positivo ($p=0,013$) e segundo D'Amico classificados como alto risco em relação à falha bioquímica (estadio T3, escore de Gleason ≥ 8 e $PSA > 20$; $p < 0,001$) apresentaram uma menor sobrevida livre de recidiva bioquímica (SLRB). Na análise multivariada, o maior Gleason ($RR=4,484$; IC 95% [2,724 – 7,381]) e a presença de linfonodo positivo ($RR=6,884$; IC 95% [2,276 – 20,816]) se apresentaram como fatores independentes para o risco de recidiva bioquímica em 10 anos.

A análise de SLRC no presente estudo mostrou que pacientes com o maior escore de Gleason da biópsia (5; $p=0,001$), invasão da vesícula seminal ($p=0,015$), linfonodo positivo ($p=0,05$), invasão vasculolinfática ($p < 0,001$) e segundo D'Amico classificados como alto risco em relação à falha bioquímica (estadio T3, escore de Gleason ≥ 8 e $PSA > 20$; $p < 0,001$) apresentaram uma menor sobrevida livre de recidiva clínica (SLRC). Os fatores que se apresentaram como independentes para o risco de recidiva clínica em 10 anos foram: maior escore de Gleason ($RR=3,230$; IC 95% [1,238 – 8,423]), a presença de linfonodo positivo ($RR=3,873$; IC 95% [1,050 – 14,278]) e o risco de D'Amico ($RR=2,364$; IC 95% [0,876 – 6,377]).

Como já citado acima, a ocorrência de escores de Gleason elevados e ou de invasão linfovascular são reconhecidamente fatores desfavoráveis, e em toda oncologia, a ocorrência de metástases linfonodais é sobejamente conhecida como um dos fatores mais adversos no tocante à progressão doença e morte específica. Apesar destas variáveis serem fatores prognósticos independentes, e se associarem nesta série à recidivas clínica, bioquímica e influenciarem a sobrevida global como fatores independentes, são dados que dispomos somente após a realização da cirurgia e com os dados do espécime cirúrgico.

Procuramos utilizar uma ferramenta que contivesse informação concomitante de diversas variáveis, fornecendo uma visão completa do paciente e de sua neoplasia no pré-operatório, antes da cirurgia. Optamos por empregar a Classificação de Riscos proposta por D'Amico (D'AMICO et al. 1998); trata-se de uma ferramenta de fácil memorização, a qual estratifica os pacientes em 3 grupos de risco para recidiva clínica, bioquímica e morte (riscos baixo, intermediário e alto) que não requer a consulta a tabelas, ou a complexa inclusão de paciente em normogramas.

Outra vantagem dessa classificação especialmente para nossa casuística, é que estratifica os pacientes em apenas 3 grupos (mantendo o poder estatístico, ao contrário de múltiplos subgrupos), e permite uma análise multivariada do paciente (estádio, grau e nível de PSA) ao invés de utilizar apenas uma variável preditiva, dessa forma sendo útil para pacientes para os quais não disporemos de espécimens anatomopatológicos cirúrgicos (aqueles submetidos a radioterapia, braquiterapia, HIFU (ultrassom de alta

intensidade) ou crioterapia.

É uma classificação consagrada pela literatura em inúmeras publicações internacionais, uma vez que foi de grande valor prognóstico em nossa casuística, nos sugerem que nossos resultados estão em concordância com a literatura internacional. Além disso, pareceu-nos interessante poder avaliar se há associação entre as variáveis biomoleculares e esta classificação.

5.3 E-CADERINA

A EMT é um fenômeno fundamental durante a embriogênese e cicatrização de feridas (KALLURI 2009, THIERY 2002). Evidências recentes mostram que a carcinogênese é influenciada e controlada por interações celulares entre o estroma, epitélio e matriz extra celular (MEC) (TOMAS et al. 2011). Durante a EMT, as células epiteliais perdem a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, migrando para outros locais e contribuindo para a progressão do câncer. A EMT parece conferir às células cancerosas a capacidade de se infiltrarem no tecido e promover metástases em sítios distantes. Nessa fase de transição, uma célula epitelial polarizada passa por modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, adquirindo um fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão, e resistência a apoptose aumenta (KALLURI e WEINBERG 2009). Essas modificações podem ser observadas através de estudos anatomopatológicos e estudos de imuno-histoquímica.

Algumas moléculas com muita importância neste fenômeno são as moléculas de adesão celular, sendo a E-caderina uma das mais importantes. A expressão de E-caderina é necessária para a manutenção da integridade epitelial. Estudos indicam que a perda ou a expressão reduzida dessa molécula de adesão pode permitir ou aumentar o risco da progressão tumoral, o aumento da invasão e o desenvolvimento de metástases (ALBERTS et al. 2003; PEINADO et al. 2004; DERYCKE e BRACKE 2004; CAMPOS et al. 2006).

A associação entre a perda de expressão de E-caderina e um fenótipo celular mais agressivo já foi observada na literatura em estudos de outros tipos de carcinoma como cabeça e pescoço, mama, pulmão e próstata (MATTIJSEN et al. 1993; VAN AKEN et al. 2001; GOULD ROTHBERG e BRACKEN 2006; STRUMANE et al. 2004; NATSUGOE et al. 2007; LIU et al. 2009; LIN et al. 2009).

No presente estudo, foi demonstrada a associação significativa da perda de E-caderina com o escore de Gleason ($p < 0,001$) e a invasão perineural ($p = 0,003$). De acordo com NAUSEEF e HENRY (2011), o sistema de graduação de Gleason é considerado uma evidência de EMT, pois o aumento da graduação está associado com a perda progressiva da arquitetura glandular, da definição da membrana basal e polaridade celular, e aumento do padrão invasivo caracterizado pelas células que invadem o estroma tumoral. Dentro da próstata, estas células coexistem entre o tecido benigno e podem estar presentes em diferentes focos tumorais. Esta heterogeneidade sustenta a complexidade da doença e a dificuldade em

distinguir os pacientes com doença indolente daqueles com a doença agressiva.

Existem relatos contraditórios na literatura em relação ao papel da E-caderina como fator de recorrência após a cirurgia. UMBAS et al. (1992) notou correlação entre a perda de expressão por Imuno-histoquímica com maior estágio patológico e recidiva bioquímica em 89 pacientes, submetidos à prostatectomia radical. Resultados similares com a mesma metodologia foram obtidos por outros autores (DE MARZO et al. 1999; WU e SATO 2003).

Ao contrário, e concordante com nossos resultados, BRINGUIER et al. (1999) mostrou que a perda de expressão de E-caderina não foi preditor independente de recidiva tumoral ao avaliar 76 pacientes submetidos à cirurgia por CaP.

Embora associada ao maior escore de Gleason e ocorrência de invasão perineural, a E caderina não influenciou as taxas de sobrevida estudadas. Talvez pelo fato do CaP ser uma neoplasia de lenta “turnover” celular, o que talvez apresente reduzida perda de aderência de células epiteliais, ao contrário do que verificamos por exemplos em neoplasias de colo uterino ou nas neoplasia uroteliais, as quais frequentemente apresentam perda da adesividade celular e descamação na urina. Por não ter se apresentado como um fator prognóstico independente, e pelos resultados dispares na literatura, ao nosso ver, os resultados não permitem por enquanto a adoção da expressão de E-caderina como marcador de prognóstico no CaP localizado.

5.4 VIMENTINA

A Vimentina é considerada a maior constituinte da família de filamentos intermediários das proteínas do citoesqueleto, cuja expressão ocorre nas células mesenquimais. É conhecida por manter a integridade celular e fornecer resistência ao stress.

É considerada como um marcador canônico da EMT, considerado um processo de reprogramação celular, em que as células epiteliais (normalmente expressam apenas filamentos intermediários de queratina) adquirem um fenótipo mesenquimal alterando as suas formas exibindo aumento de motilidade. Durante o processo reverso, a MET (Mesenquimal Epitelial Transição) as células voltam a exibir um fenótipo epitelial e diminuem a expressão de Vimentina com baixa taxa de motilidade.

A superexpressão de Vimentina no câncer está relacionada com o crescimento tumoral acelerado, invasão, metástases e prognóstico ruim, e já foi estudada em vários cânceres epiteliais como CaP, tumores gastrointestinais, do sistema nervoso central, câncer de mama, melanoma e câncer de pulmão, embora o seu papel na progressão tumoral ainda continua obscuro (SATELLI e LI 2011, GILLES et al. 2003; EVANS 1989; FUYUHIRO et al. 2010; KAWAHARA et al. 1988; UPTON et al. 1986).

No presente estudo, a presença de expressão de Vimentina no epitélio tumoral em relação às variáveis clínicas mostrou associação apenas com a área de maior Gleason ($p < 0,001$).

Estudos envolvendo as técnicas de proteoma e microarray tem demonstrado que a Vimentina é altamente expressa em células tumorais invasivas. ZHAO et al. (2008) demonstrou que a Vimentina desempenha um papel importante no processo de invasão causado pelas células tumorais epiteliais da próstata através de uma série de cortes de tecidos tumorais prostáticos corados que apresentaram positividade para Vimentina no epitélio tumoral. Foi constatado que nenhum dos tumores altamente ou moderadamente diferenciados possuíam células tumorais coradas pela Vimentina enquanto que 45,5% dos tumores fracamente diferenciados sem a presença de metástases ósseas apresentaram positividade para a Vimentina no epitélio assim como 78,6% dos tumores fracamente diferenciados com a presença de metástases ósseas.

Embora o número de pacientes diagnosticados com doença extraprostática esteja diminuindo, uma proporção significativa daqueles que foram tratados com intenção curativa sobrevivem longamente e tem evolução da doença. Para estes pacientes, a ablação hormonal é a opção de tratamento visto que, a maioria dos pacientes evoluem para uma recaída bioquímica ou clínica em 18 meses (SINGH et al. 2004).

A superexpressão de Vimentina no presente estudo está associada com a SG ($p=0,021$), SLRB ($p=0,02$) e SLRC ($p=0,047$) em 10 anos. Estes achados corroboram estudos com outros tumores epiteliais. Por exemplo, em CEC oral, LIU et al. (2009) demonstraram associação entre a positividade de Vimentina e maior risco de óbito e de recorrência. Em CEC de esôfago, casos com ganho de expressão de Vimentina apresentam risco

aumentado para a presença de metástases nos linfonodos (JIN et al. 2010b).

Esta expressão altamente significativa sugere, mais uma vez, que o ganho de marcadores mesenquimais em células epiteliais deve estar associado a um fenótipo mais agressivo que capacita estas células a invadirem de forma mais eficiente os tecidos adjacentes, o que causa a formação de metástases, impactando de forma direta a sobrevida dos pacientes.

Se estes achados forem validados em maiores séries, até mesmo em grande casuísticas em nossa Instituição, que poderiam funcionar como uma população de validação externa, poderíamos recomendar a adoção da análise deste marcador nas espécimens cirúrgicas oriundas da prostatectomia radical na determinação do prognóstico do CaP, na prática clínica, com indicação de tratamento de resgate pós-cirúrgico. Eventualmente estudos empregando sua análise em fragmentos de biópsia poderiam ser desenhados.

5.5 FATORES DE TRANSCRIÇÃO: TWIST1 E SNAIL1

A carcinogênese é influenciada e controlada por interações celulares derivadas da relação entre o estroma, epitélio e componentes da matriz extra celular (MEC). O microambiente estromal tumoral é diferente do estroma do tecido normal e é caracterizado por modificações na composição da MEC, manutenção de fatores de crescimento por difusão parácrina,

aumento da densidade de microvasos, células inflamatórias e fibroblastos modificados. Os fibroblastos modificados, também chamados de miofibroblastos ou fibroblastos associados ao câncer (CAFs), desempenham um papel importante no processo de interação tumor-estroma e consequentemente no crescimento do tumor, espalhamento e metástases, e representam um alvo importante para terapias (MAHADEVAN e VON HOFF 2007).

As células do estroma modulam o desenvolvimento, crescimento e diferenciação normal da próstata através de interações estroma- epitélio. Na próstata, as células musculares lisas sofrem a influência de sinais androgênicos do epitélio prostático, controla a diferenciação epitelial e reprimem a proliferação epitelial. Por outro lado, o epitélio prostático envia sinais para as células musculares lisas manterem a diferenciação. TOMAS et al. (2011) demonstrou que a quantidade de estroma reativo pode prever a SLRB em espécimes de prostatectomia e na indicação de biópsia sendo que tumores com pouco estroma reativo e tumores com estroma reativo abundante tem pior prognóstico do que tumores com moderada quantidade de estroma. Isso pode ser explicado por duas teorias: tumores com pouca quantidade de estroma tem pior prognóstico porque nestes tumores as células epiteliais começam a expressar genes que são normalmente restritos às células estromais e tornam-se estroma – independente com diminuição da quantidade de estroma e por outro lado, tumores com estroma abundante tem pior prognóstico porque o estroma produz grande quantidade de fatores de crescimento atuando como protetor local da resposta inflamatória.

O microambiente tumoral é composto de células imunes e inflamatórias, hipóxia, estroma, componentes da matriz extra celular (MEC) e desempenha um papel importante promovendo a progressão tumoral e metástases.

Twist é um fator de transcrição hélice-volta-hélice que demonstra uma importante ação no processo de metástase de células tumorais, conhecido também por induzir a EMT. Esta, recentemente foi implicada como um evento chave nos processos de invasão e metástases tumorais, sendo estas indispensáveis na etapa da progressão neoplásica (YUEN et al. 2007a).

A participação do Twist na progressão e metástase tumoral foi descrita numa variedade de neoplasias, incluindo os cânceres de mama (CHENG et al. 2008), próstata (YUEN et al. 2007b), pâncreas (HOTZ et al. 2007), gástricos (LUO et al. 2008), colo de útero (SHIBATA et al. 2008), bexiga (ZHANG et al. 2007; FONDREVELLE et al. 2009) e de cabeça e pescoço (OU et al. 2008; HONG et al. 2009).

Em relação às variáveis clínicas analisadas em nosso trabalho, a expressão de Twist corrobora a literatura, uma vez que está relacionada com a presença de comprometimento de margem cirúrgica proveniente da prostatectomia radical ($p=0,046$), indicando maior agressividade tumoral e proliferação celular.

A localização subcelular dos fatores de transcrição tem se mostrado como um mecanismo regulatório na modulação do crescimento e diferenciação celular. YUEN et al. (2007b) demonstraram em CaP que a localização diferencial do Twist em CaP de alto grau tem diferentes efeitos

sendo que, quando está expresso no citoplasma atua como regulador negativo bloqueando a atividade de fatores relacionados à diferenciação celular e quando apresenta expressão nuclear atua como fator de transcrição que modula diretamente a expressão de outros genes, como por exemplo o Snail, na agressividade local e desencadeamento do processo metastático.

No presente estudo, a superexpressão de Twist 1 e Snail 1 não demonstraram associação com as análises de sobrevida realizadas em um seguimento 10 anos. Tal fato pode ser explicado devido ao tempo de seguimento destes pacientes que estão ligados ao processo metastático.

A inibição da expressão de E-caderina em relação à superexpressão do Twist e Snail, é considerada um processo importante na EMT na progressão tumoral e metástases. Analisamos no presente estudo esta relação e não apresentou significância estatística, provavelmente pelos mesmos motivos citados acima em relação às análises de sobrevida.

Em contrapartida, a superexpressão de Snail 1 demonstrou associação em relação à expressão de Vimentina ($p=0,027$). Uma vez que ocorre a ativação da via Wnt, o microambiente tumoral induz a ocorrência de EMT nas células tumorais, mantendo o estado mesenquimal.

O fator de transcrição Snail regula negativamente a expressão de E-caderina, claudina 1 e citoqueratina 18 e regula positivamente a Vimentina, desta forma contribuindo para a EMT. Além de sua relação com a invasão tumoral, desempenha uma função importante no desenvolvimento embrionário que tem influência nos processos de apoptose, angiogênese e

expressão de metaloproteinase 9 (MMP9), sendo estes fatores importantes para promoverem o crescimento tumoral.

Em relação às variáveis clínicas estudadas, o Snail 1 apenas se correlacionou com a presença de invasão capsular ($p= 0,018$). De acordo com DOMÍNGUEZ et al. (2003), a fosforilação do Snail, distribuição intracelular e sua atividade, é controlada pela ligação celular à MEC. Há um crescimento rápido indicando que o meio ambiente extracelular afeta as características fenotípicas das células epiteliais e estes efeitos são atribuídos à progressão tumoral, em particular à aquisição de propriedades invasivas das células situadas no limite do tumor.

Já em CaP foi descrita por HEEBØLL et al. (2009), uma diferença na expressão do Snail 1 em cânceres não metastáticos e não recorrentes no momento do diagnóstico. Estes resultados sugerem que o aumento da expressão do Snail 1 é relativamente anterior à progressão da doença e significativamente se associou com o escore de Gleason, sugerindo que a sua alta expressão desencadeia um fenótipo tumoral indiferenciado.

A expressão dos fatores de transcrição Snail 1 e Twist 1, apenas por Imuno-histoquímica não pode contribuir para a predição do tumor ou seu potencial metastático de forma que mais estudos venham a elucidar tornando-os fatores independentes de mau prognóstico e viabilizando sua adoção na determinação do prognóstico do CaP na prática clínica.

Este estudo apresenta limitações, como a dimensão da casuística, a análise retrospectiva, o emprego de Imuno-histoquímica, que embora tenha sido realizada dentre preceitos técnicos rigorosos e por pessoa

experimentada, é um método sujeito a inúmeras influências externas como tempo e condições de armazenamento, espessura de cortes, condições de realização das reações, experiência e motivação de quem as interpreta subjetivamente entre outras.

Os dados aqui encontrados devem ser entendidos como apenas dados relacionados ao CaP localizado ou localmente, que em sua maioria são submetidos a prostatectomia radical. À medida que o CaP progride e se torna consecutivamente localmente avançado, metastático, e refratário a castração, acumula diferentes eventos biomoleculares, como respectivamente inativação do PTEN, P53, ativação do gene bcl-2, entre inúmeros outros. Não sabemos se frente a essas situações, os marcadores avaliados se expressariam do mesmo modo. Portanto, são necessários estudos envolvendo um número maior de pacientes e técnicas moleculares mais refinadas como por exemplo, nas áreas de proteoma, transcriptoma, ou a avaliação da expressão gênica, para um melhor entendimento comportamental da doença e adoção de uma ferramenta eficiente na determinação do prognóstico na prática clínica, visto que se trata de uma doença complexa e de comportamento heterogêneo.

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que o fenômeno de transição epitélio mesênquima, neste trabalho representado pela avaliação dos marcadores: E-caderina, Vimentina, Twist 1 e Snail 1 tem as seguintes implicações:

1. As análises de SG, SLRC e SLRB, uni e multivariadas, corroboram a literatura em relação aos fatores prognósticos mais tradicionais para o CaP (escore de Gleason, invasão vasculo linfática e alto risco de D'Amico) em relação ao risco de óbito em 10 anos.
2. Foi demonstrada a associação significativa da perda de expressão de E-caderina em relação ao maior escore de Gleason e invasão perineural, o que indica uma perda progressiva da arquitetura glandular e padrão invasivo, considerados como evidências da ocorrência de EMT.
3. A superexpressão de Vimentina no epitélio tumoral deve estar associada a um fenótipo mais agressivo com capacidade infiltrativa eficiente nos órgãos adjacentes, podendo levar à formação de metástases e impactando de forma direta na sobrevida dos pacientes.
4. Embora foi demonstrado no presente estudo, que a Vimentina pode ser considerada um marcador potencial para adoção nas espécimens curúrgicas para a determinação do prognóstico do CaP na prática clínica, há a necessidade de validação destes achados em maiores séries.

5. A associação do marcador Snail 1 com a Vimentina indica uma relação com fatores da MEC que promovem o crescimento tumoral e estes efeitos são atribuídos a progressão de propriedades invasivas das células situadas ao limite do tumor.
6. A expressão dos fatores de transcrição Twist q e Snail 1 apenas pela técnica de Imuno-histoquímica não pode contribuir para a predição do comportamento tumoral ou potencial metastático de forma que mais estudos envolvendo técnicas experimentais mais refinadas de forma a elucidar tornando-os fatores independentes de prognóstico ruim e viabilizando a sua adoção na prática clínica.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts P, Rudge R, Hinnens I, et al. Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion. **Mol Biol Cell** 2003; 14:4207-20.

Alenda O, Ploussard G, Mouracade P, et al. Impact of the primary Gleason pattern on biochemical recurrence-free survival after radical prostatectomy: a single-center cohort of 1,248 patients with Gleason 7 tumors. **World J Urol** 2011; 29:671-6.

Berney D, Cheng L. Prostate cancer: towards the standardization and synthesis of morphology, genetics, and prognosis. **Histopathology** 2012; 60:1-3.

Bostwick DG, Pacelli A, Lopez-Beltran A. Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. **Prostate** 1996; 29:117-34.

Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. **J Urol** 2002; 168:906-13.

Brewster SF, Oxley JD, Trivella M, Abbott CD, Gillatt DA. Preoperative p53, bcl-2, CD44 and E-cadherin immunohistochemistry as predictors of biochemical relapse after radical prostatectomy. **J Urol** 1999; 161:1238-43.

Bringuier PP, Girolidi LA, Umbas R, Shimazui T, Schalken JA. Mechanisms associated with abnormal E-cadherin immunoreactivity in human bladder tumors. **Int J Cancer** 1999; 83:591-5.

Campos RS, Lopes A, Guimarães GC, Carvalho AL, Soares FA. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. **Urology** 2006; 67:797-802.

Chu Q, Ling MT, Feng H, et al. A novel anticancer effect of garlic derivatives: inhibition of cancer cell invasion through restoration of E-cadherin expression. **Carcinogenesis** 2006; 27:2180-9.

Colomiere M, Ward AC, Riley C, et al. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. **Br J Cancer** 2009; 100:134-44.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, da Fonseca FP, Soares FA. Claudin expression is dysregulated in prostate adenocarcinomas but does not correlate with main clinicopathological parameters. **Pathology** 2011; 43:143-8.

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. **JAMA** 1998; 280:969-74.

Damber JE, Aus G. Prostate cancer. **Lancet** 2008; 371:1710-21.

De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. **Am J Pathol** 1999; 155:1985-92.

Derycke LD, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. **Int J Dev Biol** 2004; 48:463-76.

Domínguez D, Montserrat-Sentís B, Virgós-Soler A, et al. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. **Mol Cell Biol** 2003; 23:5078-89.

Evans RM. Phosphorylation of vimentin in mitotically selected cells. In vitro cyclic AMP-independent kinase and calcium-stimulated phosphatase activities. **J Cell Biol** 1989; 108:67-78.

Fondrevelle ME, Kantelip B, Reiter RE, et al. The expression of Twist has an impact on survival in human bladder cancer and is influenced by the smoking status. **Urol Oncol** 2009; 27:268-76.

Fuyuhiko Y, Yashiro M, Noda S, et al. Clinical significance of vimentin-positive gastric cancer cells. **Anticancer Res** 2010; 30:5239-43.

Gilles C, Polette M, Mestdagt M, et al. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. **Cancer Res** 2003; 63:2658-64.

Gould Rothberg BE, Bracken MB. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat** 2006; 100:139-48.

Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2007; 13:7003-11.

Heebøll S, Borre M, Ottosen PD, Dyrskjøt L, Orntoft TF, Tørring N. Snail1 is over-expressed in prostate cancer. **APMIS** 2009; 117:196-204.

Hong KO, Kim JH, Hong JS, et al. Inhibition of Akt activity induces the mesenchymal-to-epithelial reverting transition with restoring E-cadherin expression in KB and KOSCC-25B oral squamous cell carcinoma cells. **J Exp Clin Cancer Res** 2009; 28:28.

Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, Hotz HG. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. **Clin Cancer Res** 2007; 13:4769-76.

Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J. Molecular pathology of prostate cancer. **J Clin Pathol** 2005a; 58:673-84.

Hughes PJ, Steinmeyer A, Chandraratna RA, Brown G. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates steroid sulphatase activity in HL60 and NB4 acute myeloid leukaemia cell lines by different receptor-mediated mechanisms. **J Cell Biochem** 2005b; 94:1175-89.

Hugo H, Ackland ML, Blick T, et al. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. **J Cell Physiol** 2007; 213:374-83.

Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. **Mod Pathol** 2004; 17:292-306.

Jin H, Yu Y, Zhang T, et al. Snail is critical for tumor growth and metastasis of ovarian carcinoma. **Int J Cancer** 2010a; 126:2102-11.

Jin H, Morohashi S, Sato F, et al. Vimentin expression of esophageal squamous cell carcinoma and its aggressive potential for lymph node metastasis. **Biomed Res** 2010b; 31:105-12.

Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. **J Clin Invest** 2009; 119:1417-9.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest** 2009; 119:1420-8.

Kawahara E, Oda Y, Ooi A, Katsuda S, Nakanishi I, Umeda S. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in peripheral nerve sheath tumors: a comparative study of immunoreactivity of GFAP, vimentin, S-100 protein, and neurofilament in 38 schwannomas and 18 neurofibromas. **Am J Surg Pathol** 1988; 12:115-20.

Khamis ZI, Iczkowski KA, Sang QX. Metastasis suppressors in human benign prostate, intraepithelial neoplasia, and invasive cancer: their prospects as therapeutic agents. **Med Res Rev** 2011 Jan 16. [Epub ahead of print]

Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. **Cells Tissues Organs** 2007; 185:191-203.

Lawrence MG, Veveris-Lowe TL, Whitbread AK, Nicol DL, Clements JA. Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer and the potential role of kallikrein serine proteases. **Cells Tissues Organs** 2007; 185:111-5.

Leite KR, Camara-Lopes LH, Cury J, Dall'oglio MF, Sañudo A, Srougi M. Prostate cancer detection at rebiopsy after an initial benign diagnosis: results using sextant extended prostate biopsy. **Clinics (Sao Paulo)** 2008; 63:339-42.

Lin JC, Liao SK, Lee EH, et al. Molecular events associated with epithelial to mesenchymal transition of nasopharyngeal carcinoma cells in the absence of Epstein-Barr virus genome. **J Biomed Sci** 2009; 16:105.

Liu L, Guo X, Rao JN, et al. Polyamines regulate E-cadherin transcription through c-Myc modulating intestinal epithelial barrier function. **Am J Physiol Cell Physiol** 2009; 296:C801-10.

Luo GQ, Li JH, Wen JF, Zhou YH, Hu YB, Zhou JH. Effect and mechanism of the Twist gene on invasion and metastasis of gastric carcinoma cells. **World J Gastroenterol** 2008; 14:2487-93.

Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Mol Cancer Ther** 2007; 6:1186-97.

Manzo A, Caporali R, Montecucco C, Pitzalis C. Role of chemokines and chemokine receptors in regulating specific leukocyte trafficking in the immune/inflammatory response. **Clin Exp Rheumatol** 2003; 21:501-8.

Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, et al. E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. **Int J Cancer** 1993; 55:580-5.

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2010; 15:117-34.

Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. **Oncogene** 2008; 27:6958-69.

Natsugoe S, Uchikado Y, Okumura H, et al. Snail plays a key role in E-cadherin-preserved esophageal squamous cell carcinoma. **Oncol Rep** 2007; 17:517-23.

Nauseef JT, Henry MD. Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? **Nat Rev Urol** 2011; 8:428-39.

Ou DL, Chien HF, Chen CL, Lin TC, Lin LI. Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. **Anticancer Res** 2008; 28:1355-9.

Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. **Int J Dev Biol** 2004; 48:365-75.

Qian J, Wollan P, Bostwick DG. The extent and multicentricity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in clinically localized prostatic adenocarcinoma. **Hum Pathol** 1997; 28:143-8.

Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cell Mol Life Sci** 2011; 68:3033-46.

Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. **Ann Oncol** 2010; 21 Suppl 7:vii89-92.

Shibata K, Kajiyama H, Ino K, et al. Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. **Ann Oncol** 2008; 19:81-5.

Singh H, Canto EI, Shariat SF, et al. Predictors of prostate cancer after initial negative systematic 12 core biopsy. **J Urol** 2004; 171:1850-4.

Strumane K, Berx G, Van Roy F. Cadherins in cancer. **Handb Exp Pharmacol** 2004; (165):69-103.

Sun Y, Niu J, Huang J. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. **Am J Transl Res** 2009; 1:148-62.

Thiery JP. [Role of growth factor signaling in epithelial cell plasticity during development and in carcinogenesis]. **Bull Acad Natl Med** 2001; 185:1279-92; discussion 1293-4.

Tomas D, Spajić B, Milošević M, Demirović A, Marušić Z, Krušlin B. Extensive retraction artefact predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. **Histopathology** 2011; 58:447-54.

Tomas D, Spajić B, Milosević M, Demirović A, Marusić Z, Krušlin B. Intensity of stromal changes predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. **Scand J Urol Nephrol** 2010; 44:284-90.

Tomkins SA, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Integrative biology of prostate cancer progression. **Annu Rev Pathol** 2006;1:243-71.

Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, et al. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. **Cancer Res** 1992; 52:5104-9.

Upton MP, Hirohashi S, Tome Y, Miyazawa N, Suemasu K, Shimosato Y. Expression of vimentin in surgically resected adenocarcinomas and large cell carcinomas of lung. **Am J Surg Pathol** 1986; 10(8):560-7.

Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. **Virchows Arch** 2001; 439:725-51.

Wei J, Xu G, Wu M, et al. Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation. **Anticancer Res** 2008; 28:327-34.

Wu L, Sato M. Integrated, molecular engineering approaches to develop prostate cancer gene therapy. **Curr Gene Ther** 2003; 3:452-67.

Ye L, Kynaston HG, Jiang WG. Bone metastasis in prostate cancer: molecular and cellular mechanisms (Review). **Int J Mol Med** 2007; 20:103-11.

Yoshimoto M, Cunha IW, Coudry RA, Fonseca FP, Torres CH, Soares FA, Squire JA. FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. **Br J Cancer** 2007; 97:678-85.

Yuen HF, Chan YP, Wong ML, et al. Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis. **J Clin Pathol** 2007a; 60:510-4.

Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW. Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. **Histopathology** 2007b; 50:648-58.

Yuen HF, Kwok WK, Chan KK, et al. TWIST modulates prostate cancer cell-mediated bone cell activity and is upregulated by osteogenic induction. **Carcinogenesis** 2008; 29:1509-18.

Zhang Z, Xie D, Li X, et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. **Hum Pathol** 2007; 38:598-606.

Zhao Y, Yan Q, Long X, Chen X, Wang Y. Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. **Cell Biochem Funct** 2008; 26:571-7.

Zhau HE, Odero-Marah V, Lue HW, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer: lessons learned from ARCaP model. **Clin Exp Metastasis** 2008; 25:601-10.