



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico - Faculdade Ciências Médicas

Unidade de Pesquisa Urogenital

Antonio Henrique de Almeida Duarte

**Expressão do colágeno I, III e metaloproteinase
nos diferentes graus de Gleason e estadio
patológico do câncer prostático**

Rio de Janeiro

2010

Antonio Henrique de Almeida Duarte

**Expressão do colágeno I, III e metaloproteinase nos
diferentes graus de Gleason e estadio patológico do
câncer prostático**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Urogenital

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane da Fonte Ramos

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

Será entregue posteriormente pois está sendo confeccionada.

ÍNDICE

RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
4 RESULTADOS	21
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	43
AGRADECIMENTOS TÉCNICOS	44
CONFLITO DE INTERESSES	45

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a expressão do colágeno tipo I, III e metaloproteinase podem estar relacionadas com o grau de Gleason, estadió patológico e PSA pré-operatório, e se isto poderia servir como prognóstico de doença.

Material e métodos: o grupo de estudo incluiu espécimes de prostatectomia radical de 33 pacientes com adenocarcinoma submetidos à cirurgia no período de 2001 a 2009. Os pacientes foram divididos em 3 grupos: grau de Gleason = 6 (13 pacientes), escore de Gleason = 7 (10 pacientes), escore de Gleason \geq 8 (10 pacientes). O tecido prostático benigno adjacente à área de câncer nos graus de Gleason foi utilizado como grupo controle. As áreas de adenocarcinoma e de tecido benigno foram selecionados sob análise microscópica e processados para colágeno I e III sob análise do gene por PCR em Tempo Real. Dez seções desparafinadas de cada grupo foram utilizados para avaliar o colágeno I, III e a imunoexpressão de metaloproteinase. Os resultados foram relacionados com o grau de Gleason, PSA pré-operatório e estadió patológico.

Resultados: apesar da diferença significativa na expressão gênica de ambos colágeno I e III entre as áreas de tumor e tecido prostático benigno nas amostras de próstata Gleason = 6 (colágeno I = $0,4 \pm 0,2$ vs $5 \pm 2,4$ p, $p < 0,05$; colágeno III = $0,2 \pm 0,06$ vs $0,7 \pm 0,1$, $p < 0,05$) e grau de Gleason \geq 8 (colágeno I = $8 \pm 3,4$ vs $1,4 \pm 0,8$, $p < 0,07$; colágeno III = $1,8 \pm 0,5$ vs $0,6 \pm 0,1$, $p < 0,05$), não houve correlação com grau de Gleason, PSA pré-operatório ou estadió patológico. Houve uma correlação positiva entre a expressão de metaloproteínas e grau de Gleason ($r^2 = 0,47$).

Conclusão: A correlação positiva entre a expressão de metaloproteinase e o grau de Gleason sugere que a metaloproteinase pode ser um fator promissor para melhorar o grau de Gleason. Sua expressão e regulação não parecem estar relacionados com a degradação do colágeno. Não há correlação entre expressão de colágeno e grau de Gleason, nem a nível gênico nem protéico.

Palavras chaves: Câncer prostático. Colágeno. Metaloproteinase. Grau de Gleason.

ABSTRACT

Purpose: The aim of this paper was to evaluate if the expression of metalloproteinase, collagen I and III could be related with Gleason score, preoperative PSA and pathological stage. **Materials and Methods:** Our study group included radical prostatectomy specimens of 33 patients with prostatic adenocarcinoma who underwent surgery in the period from 2001 to 2009. Patients were divided into 3 groups: Gleason score=6 (13 patients), Gleason score=7 (10 patients), Gleason score ≥ 8 (10 patients). Benign prostatic tissues adjacent to the cancer area in the different Gleason grades were used as a control group. The adenocarcinoma and benign areas were selected from the tissues under microscope analysis and further processed for collagen I and III gene analysis by Real Time PCR. Ten deparaffined sections of each group were used to evaluate collagen I, III and metalloproteinase immunoexpression. The results were related with Gleason score, preoperative PSA and pathological stage. **Results:** Despite the significant difference in both collagen I and III gene expression between benign and tumor areas in the prostate samples from Gleason score=6 (collagen I=0.4 \pm 0.2 vs 5 \pm 2.4, p<0.05; collagen III= 0.2 \pm 0.06 vs 0.7 \pm 0.1, p<0.05) and Gleason score ≥ 8 (collagen I= 8 \pm 3.4 vs 1.4 \pm 0.8, p<0.07; collagen III= 1.8 \pm 0.5 vs 0.6 \pm 0.1, p<0.05), there was no correlation with Gleason score, preoperative PSA or pathological stage. There was a positive correlation between metalloproteinase expression and Gleason score ($r^2=0.47$). **Conclusions:** The positive correlation between metalloproteinase expression and Gleason score suggests that metalloproteinase could be a promising factor to improve Gleason score. Its expression and regulation do not seem to be related with collagen degradation.

Key words: prostate cancer, collagen, metalloproteinase, Gleason score.

LISTA DE ABREVIACÕES

PSA	Antígeno prostático específico
MEC	Matriz extracelular
PCR	Reação em cadeia de polimerase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico

INTRODUÇÃO

A taxa de incidência de câncer de próstata aumentou dramaticamente no final dos anos 80. Esse aumento reflete a melhoria na detecção e diagnóstico através do uso generalizado do teste de PSA [1]. O câncer de próstata é o mais comum dos tumores, excluindo o câncer de pele, e a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer em homens nos Estados Unidos [1]. Isto ocorre também no Brasil onde, sem considerar os tumores de pele, é o mais frequente em todas as regiões [2].

Anatomicamente a próstata normal pesa 18g e localiza-se diretamente abaixo da bexiga, circundando completamente a uretra. Sua função primária é produzir parte da secreção que constitui o sêmen [3].

A figura 1 mostra uma lâmina histológica da glândula prostática. A próstata é composta de elementos glandulares e de estroma. As glândulas prostáticas são constituídas de ácinos e ductos excretorios revestidos por células secretoras cúbicas ou cilíndricas altas. Abaixo destas células há uma fileira de células basais (que é a matrix extracelular - MEC - constituindo a interface entre o epitélio e o tecido conjuntivo), não sendo esta observada nos ácinos neoplásicos

[4]. A arquitetura do compartimento do estroma serve como suporte estrutural [5].

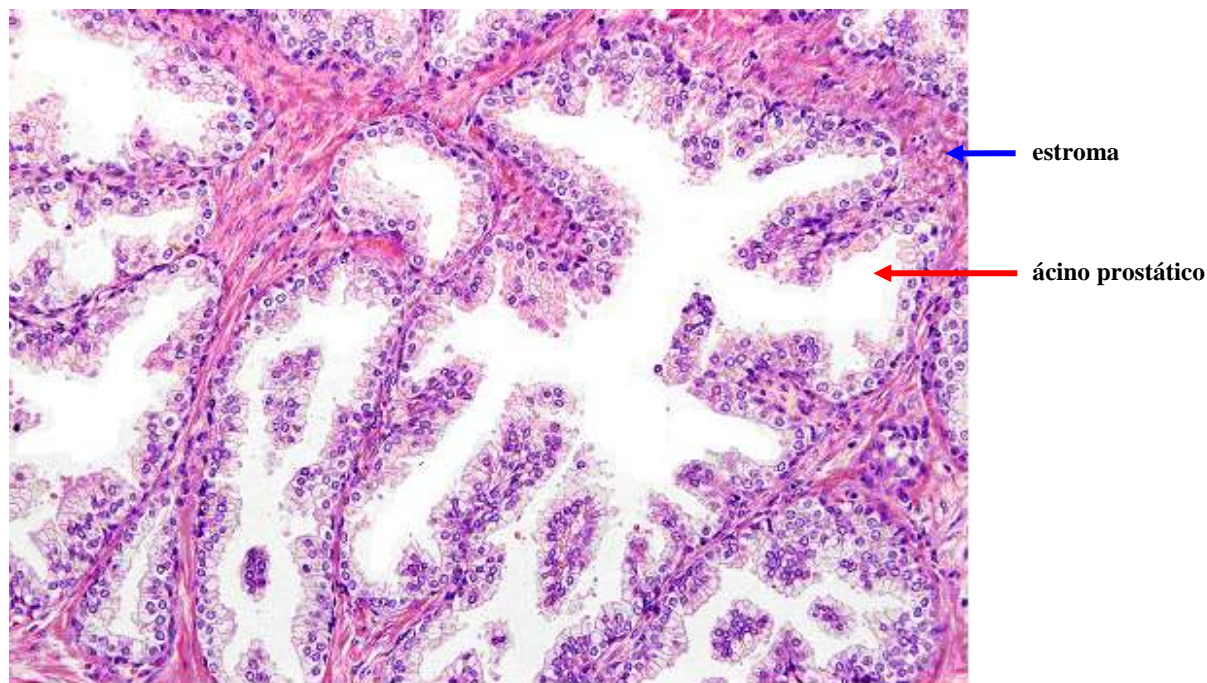


Figura 1 - Lâmina histológica de próstata normal. Coloração HE. Aumento 200X.

A figura 2 representa esquematicamente os tipos celulares que compõem o epitélio e o estroma prostático. O epitélio é formado por células basais, epiteliais, secretoras e neuroendócrinas. Já o estroma é composto por uma compilação de células, incluindo fibroblastos/miofibroblastos, células gliais, epiteliais, vascular, adipócito, músculo liso e células do sistema imunológico, juntamente com a MEC e moléculas extracelulares. No tecido normal, os fibroblastos são o tipo predominante de células do estroma do tecido conjuntivo e são os produtores primários da matriz não

celular da MEC. Os fibroblastos são responsáveis pela deposição da MEC fibrilar – tipo I, III e V do colágeno e fibronectina – e contribuem para a formação da membrana basal pela secreção de colágeno tipo IV e laminina. O meio não é estático; o tecido conjuntivo e a MEC são continuamente remodelados por meio de um processo dinâmico, bem regulado e contido [6].

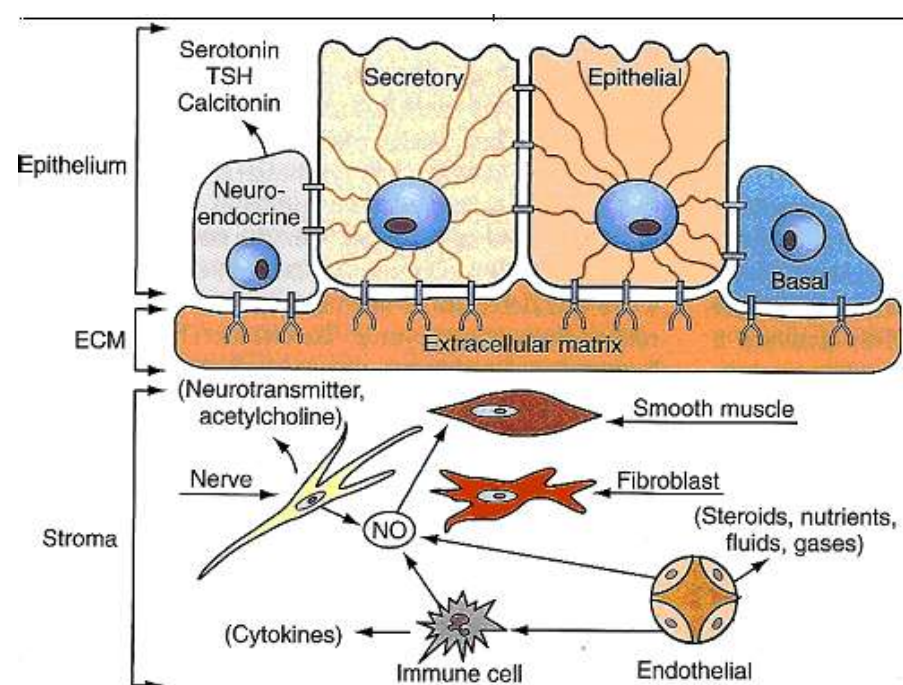


Figura 2 - Campbell-Walsh Urology [7].

O estroma é essencial para a manutenção dos tecidos epiteliais. Quando o epitélio muda, o estroma inevitavelmente também muda. Este é o caso durante o desenvolvimento do câncer [8]. Parece que os componentes do estroma desempenham um papel muito importante no reforço da progressão do tumor por estimulação da angiogênese e

promovendo a sobrevivência, proliferação e invasão da célula cancerosa [9]. É claro que o microambiente do tumor de próstata inclui o “estroma reativo”, composto por vários tipos de células que foram alteradas a partir do seu estado original (normal) para tornar-se permissivo da progressão do câncer de próstata [10]. O estroma normal da próstata é predominantemente muscular liso, enquanto que o estroma reativo do câncer de próstata é composto de um misto de miofibroblasto/fibroblasto, com uma redução significativa ou completa perda de todo músculo liso diferenciado [11]. Miofibroblastos no estroma reativo sintetizam os componentes da MEC, como colágeno tipo I e III, isoformas de fibronectina, tenascina e versican [12].

Em relação ao câncer, é importante comentar sobre as metaloproteinases que são enzimas que formam uma família de pelo menos 23 proteinases zinco dependentes conhecidas em degradar componentes da matriz extracelular tais como colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas [13]. Com isto acredita-se que tenham um papel importante na metástase da célula tumoral. Além disso, tem sido mostrado estarem envolvidas na liberação de fatores de crescimento que aumentam o tumor e sua agressividade [14-17].

A agressividade do tumor pode ser determinada pelo exame patológico do padrão microscópico das células com câncer. O método de classificação tumoral mais comumente

utilizado é o Gleason. Este sistema atribui um grau para cada câncer de próstata a partir de 1 (menos agressivo) à 5 (mais agressivo) com base no grau de diferenciação arquitetural do tumor. O escore de Gleason é obtido através da atribuição de um grau primário para o grau presente predominante e o grau secundário para o segundo grau predominante [18].

O sistema de classificação de Gleason tem sido mostrado para prever o resultado em pacientes com câncer de próstata [19]. Devido às numerosas análises multivariadas apoiando a afirmação de que a soma do Gleason é um forte preditor de extensão de doença, alguns pesquisadores têm defendido que todos os novos indicadores preditivos sejam comparados com o grau de Gleason [20].

Na conferência de consenso da Sociedade Internacional de Patologia Urológica em 2005, o sistema de classificação de Gleason para o carcinoma de próstata passou pela sua primeira grande revisão. A aplicação do sistema de Gleason varia consideravelmente na prática contemporânea da patologia cirúrgica e levou às várias tentativas recentes de alcançar um consenso sobre a classificação de Gleason [21].

Em pacientes submetidos à prostatectomia radical, as características do tumor incluindo o nível do PSA e as suas alterações, tais como velocidade e tempo de duplicação [22], o grau de Gleason e estadio do tumor são preditivos de

prognóstico tumoral.

Na tentativa de melhorar ainda mais a capacidade de prever a sobrevida livre de recorrência bioquímica, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão do colágeno tipo I - III e metaloproteinase no câncer prostático e correlacionar esta expressão com o grau de Gleason, estadiopatológico e PSA do pré e pós-operatório.

OBJETIVOS

Neste trabalho objetivamos avaliar se a expressão do colágeno tipo I - III e metaloproteinase está alterada no câncer prostático e se isto poderia servir como prognóstico de doença.

MATERIAL E MÉTODOS

O grupo de estudo incluiu os blocos e as lâminas histológicas de 33 pacientes com adenocarcinoma prostático e de 6 pacientes submetidos à cistoprostatectomia radical. Os grupos são descritos a seguir:

Os pacientes com adenocarcinoma prostático foram submetidos à prostatectomia radical retropúbica pelo mesmo grupo de cirurgiões entre 2001 a 2009. Na ocasião do diagnóstico todos eles tinham doença localizada e não houve terapia neoadjuvante. A idade variou entre 45 e 75 anos (média de 63,3 anos). Foram então divididos em 3 grupos de acordo com o grau de Gleason:

- Grau de Gleason = 6 (13 pacientes)
- Grau de Gleason = 7 (10 pacientes)
- Grau de Gleason \geq 8 (10 pacientes)

O acompanhamento pós-operatório variou de 1 à 62 meses. O acompanhamento médio foi de 20,55 meses e a mediana de 18 meses. O critério de recidiva tumoral foi definido como o PSA \geq 0,2ng de acordo com a recomendação da Associação Americana de Urologia.

O grupo de patologistas do Laboratório Microimagem com experiência em câncer prostático realizou a classificação

do grau de Gleason e do estadio patológico.

Nos pacientes submetidos à cistoprostatectomia radical foram utilizados como grupo controle, o tecido prostático benigno. Neste grupo não havia evidência de câncer prostático. Os pacientes foram submetidos à cirurgia entre 2001 à 2007 por tumor de bexiga invasivo com idade variando entre 58 à 75 anos (média de 67,67 anos). Para evitar as diferenças na expressão gênica que existe entre os indivíduos foi criado um segundo grupo controle formado por tecido prostático benigno adjacente a área de câncer nos diferentes graus de Gleason. Em ambos os grupos o tecido prostático benigno constituiu o controle.

Os blocos de parafina dos diferentes grupos foram utilizados para analisar a expressão gênica de colágeno I e III por PCR em tempo real, e imuno-histoquímica. As áreas de adenocarcinoma e de tecido prostático benigno foram selecionados a partir da análise microscópica dos tecidos (figura 3). Resumidamente, as áreas de adenocarcinoma e tecido prostático benigno selecionados sob análise microscópica foram transcritos para um papel vegetal. Em seguida, o papel vegetal foi sobreposto sobre o bloco de parafina e a área específica foi removida com um bisturi e transferida para um tubo eppendorf (figura 4) para posterior extração de RNA e análise da expressão gênica de colágeno por PCR em tempo real.

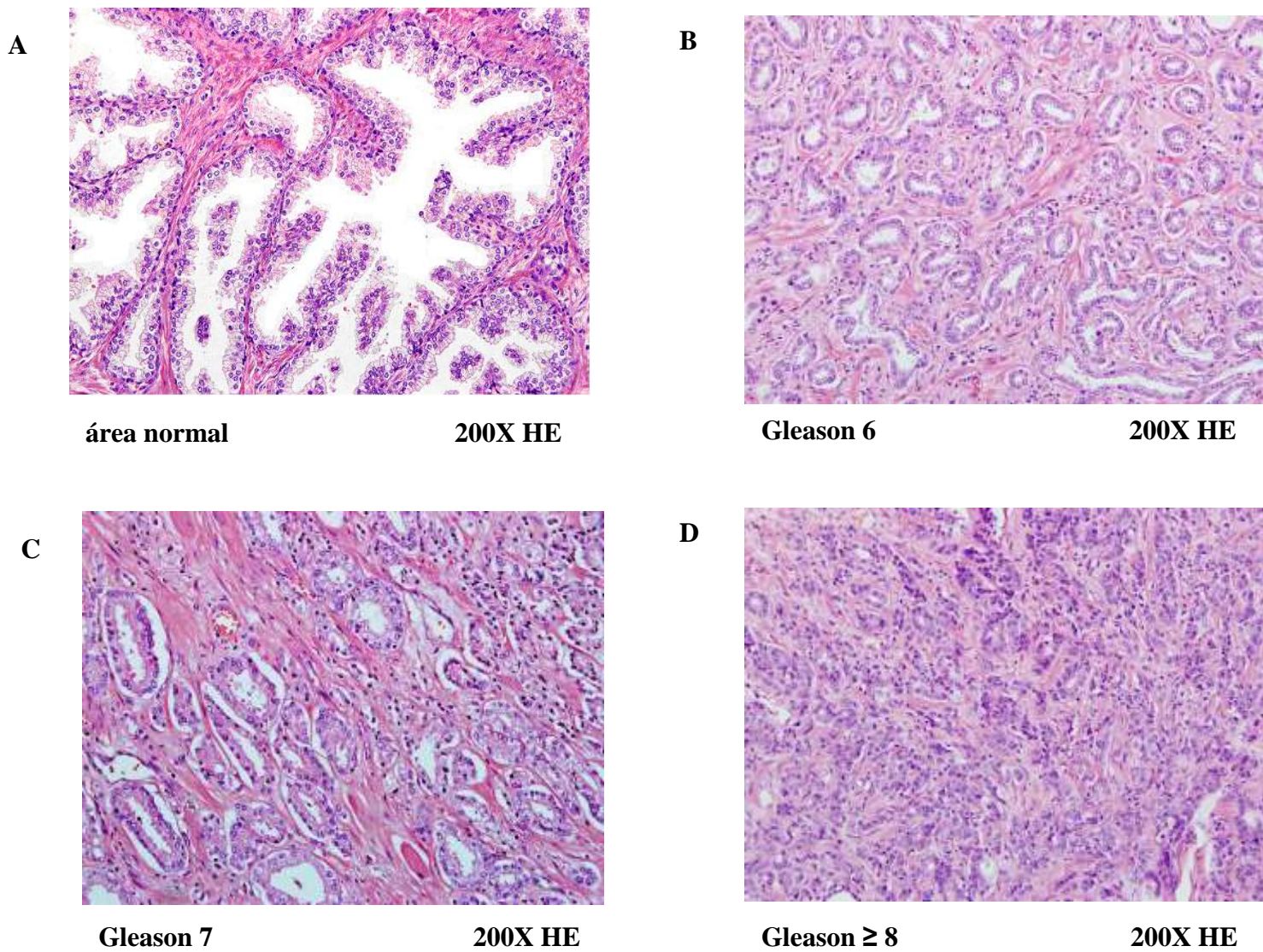


Figura 3 – Lâminas de HE mostrando as áreas selecionadas de tecido prostático benigno como grupo controle (A) e os diferentes graus de Gleason (B, C, D).

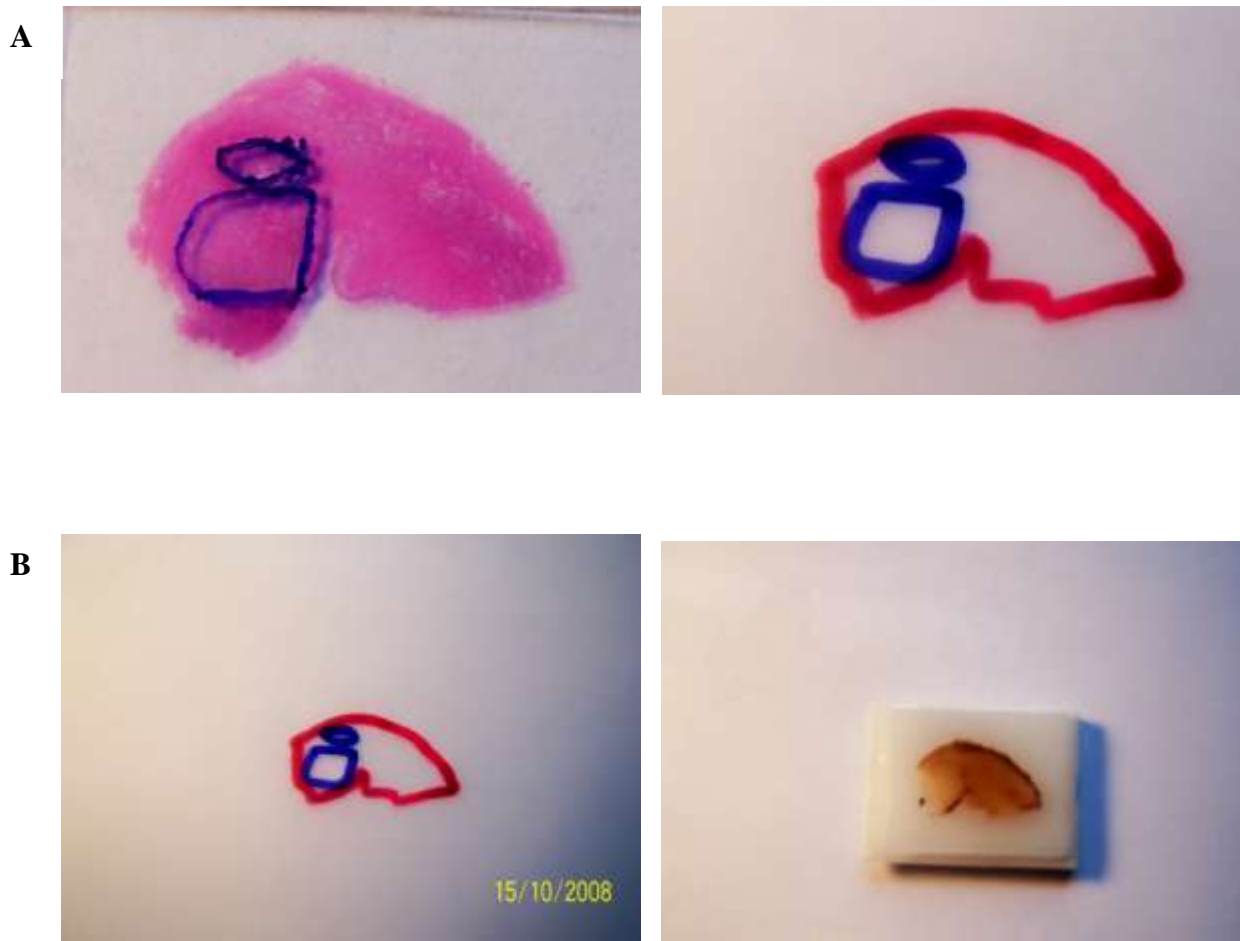


Figura 4 – Transcrição das áreas marcadas para o papel vegetal (A). Sobreposição do desenho sobre o bloco, remoção da parafina do tecido com um bisturi e transferência para um tubo eppendorf.

A extração do RNA dos tecidos em parafina foi feita usando um kit de recuperação de RNA total de tecidos (cat number#AM1975, Applied biosystems, Carlsbad, CA, USA) de acordo com o protocolo do fabricante e está esquematizado na figura 5. Resumidamente, os blocos de parafina foram incubados em xilol a temperatura elevada para solubilizar e remover a parafina do tecido, e posteriormente foram lavados em álcool para remoção do xilol. Os tecidos livres de parafina foram então submetidos ao processo de digestão com a enzima

protease, que digere as proteínas covalentemente ligadas ao RNA, DNA e outras proteínas. Finalmente, o RNA foi purificado em coluna, lavado e eluído. Todas as amostras foram então tratadas com DNAase seguindo recomendação do fabricante para eliminação de DNA residual (Invitrogen, CA, USA).

Desparafinização



- Selecionar cortes de parafina equivalente a 80 μ m ou \leq 35mg não seccionados
- Adicionar 1ml de xilol 100%, misturar e incubar a 3 min a 50 °C
- Centrifugar por 2 minutos na velocidade máxima, e descartar o xilol
- Lavar o sedimento duas vezes com 1 ml de etanol 100%
- Para remover o etanol residual, secar o sedimento a vácuo ou ar

Digestão da protease



- Adicionar tampão de digestão e protease
- Incubar a 50 °C / 80 °C

Isolamento do ácido nucléico



- Preparar mistura de etanol / aditivo
- Adicionar etanol / aditivo e misturar
- Passar a mistura através do filtro (ependorf)
- Lavar com 700 μ l de tampão de lavagem 1
- Lavar com 500 μ l de tampão de lavagem 2 e 3 e, em seguida centrifugar para remover o líquido residual

Digestão da nuclease e purificação final



- Adicionar DNase para cada filtro (ependorf) e incubar durante 30min
- Lavar com 700 μ l de tampão de lavagem 1
- Lavar duas vezes com 500 μ l de tampão de lavagem 2 e 3, em seguida centrifugar para remover o líquido residual

Figura 5 – Protocolo de extração e purificação de RNA total de bloco de parafina (cat number#AM1975, Applied biosystems, Carlsbad, CA, USA).

PCR em tempo real: Cem nanogramas de RNA foram utilizados para avaliar a expressão gênica de colágeno I e III por PCR em tempo real utilizando o kit de expressão em uma etapa o qual permite a realização da transcrição reversa com formação de cDNA e a etapa de amplificação de DNA numa única reação (cat#11780-200, Invitrogen, CA, USA). As reações foram feitas em triplicatas e normalizadas pela expressão do gene da β -actina. Os reagentes e o programa de amplificação estão descritos nas tabelas 1 e 2. A sequência dos primers está descrita na tabela 3.

Tabela 1: Reagentes utilizados na reação de PCR em tempo real

Reagente	Volume (μ l)
EXPRESS SYBRR GreenER™ qPCR SuperMix Universal	10 μ l
10 μ M primer sense (200 nM final)	0.4 μ l
10 μ M primer antisense (200 nM final)	0.4 μ l
EXPRESS SuperScriptR Mix para reação em uma etapa SYBRR GreenER™	0.5 μ l
RNA (100ng RNA total)	5 μ l
DEPC- água tratada	to 20 μ l

Tabela 2: Programa de amplificação de PCR em tempo real

Programa de amplificação
50°C por 5 minutos (síntese de cDNA)
95°C por 2 minutos
40 ciclos de:
95°C por 15 segundos
60°C por 1 minuto

Tabela 3: Sequência dos genes utilizados na reação de PCR em tempo real.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
<i>Colágeno I</i>	sense: gtgctaaaggtgccaatggt antisense: accagggtcaccgctgttac
<i>Colágeno III</i>	sense: ctggacctcaggacc antisense: gttccccaggtttccat
<i>B actina</i>	sense: ccagtcaccatggatga antisense: acgatggagggaagac

Immuno-histoquímica: Dez cortes livres de parafina de cada grupo foram hidratados, tratados com tampão TRIS-EDTA (pH 9.0) *overnight* a 37°C (colágeno I e III) ou tampão citrato, pH 6.0, por 20 min a 60°C (metaloproteinase) para recuperação antigênica, e posteriormente tratados com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 10 min para bloquear atividade da peroxidase endógena. Essas etapas foram seguidas por lavagens com tampão PBS e subsequente incubação por 10 min em temperatura ambiente com soro de cabra a 10% para bloqueio de ligação inespecífica. Os cortes foram então incubados por 2h em temperatura ambiente com anticorpos específicos anti colágeno I e III (Abcam, Cambridge, MA, EUA) ou *overnight* a 4°C com anticorpo específico anti metaloproteinase 13 (Millipore, Billerica, MA, EUA) diluídos em PBS 1% BSA. Os cortes foram então lavados com PBS e incubados em temperatura ambiente por 20 min com anticorpo secundário biotilado seguido de incubação por 10 min em temperatura ambiente com streptavidin-peroxidase conjugado (Histostain-Plus Kit, Invitrogen, CA, USA). Os cortes foram posteriormente lavados com PBS, revelados pelo tratamento com DAB, diaminobenzidine (DAB, Histostain-Plus Kit, Invitrogen, CA, USA), e então contracorado com hematoxilina. Os

controles negativos foram processados substituindo o anticorpo primário por PBS e não foi visualizada qualquer marcação (figura 6).

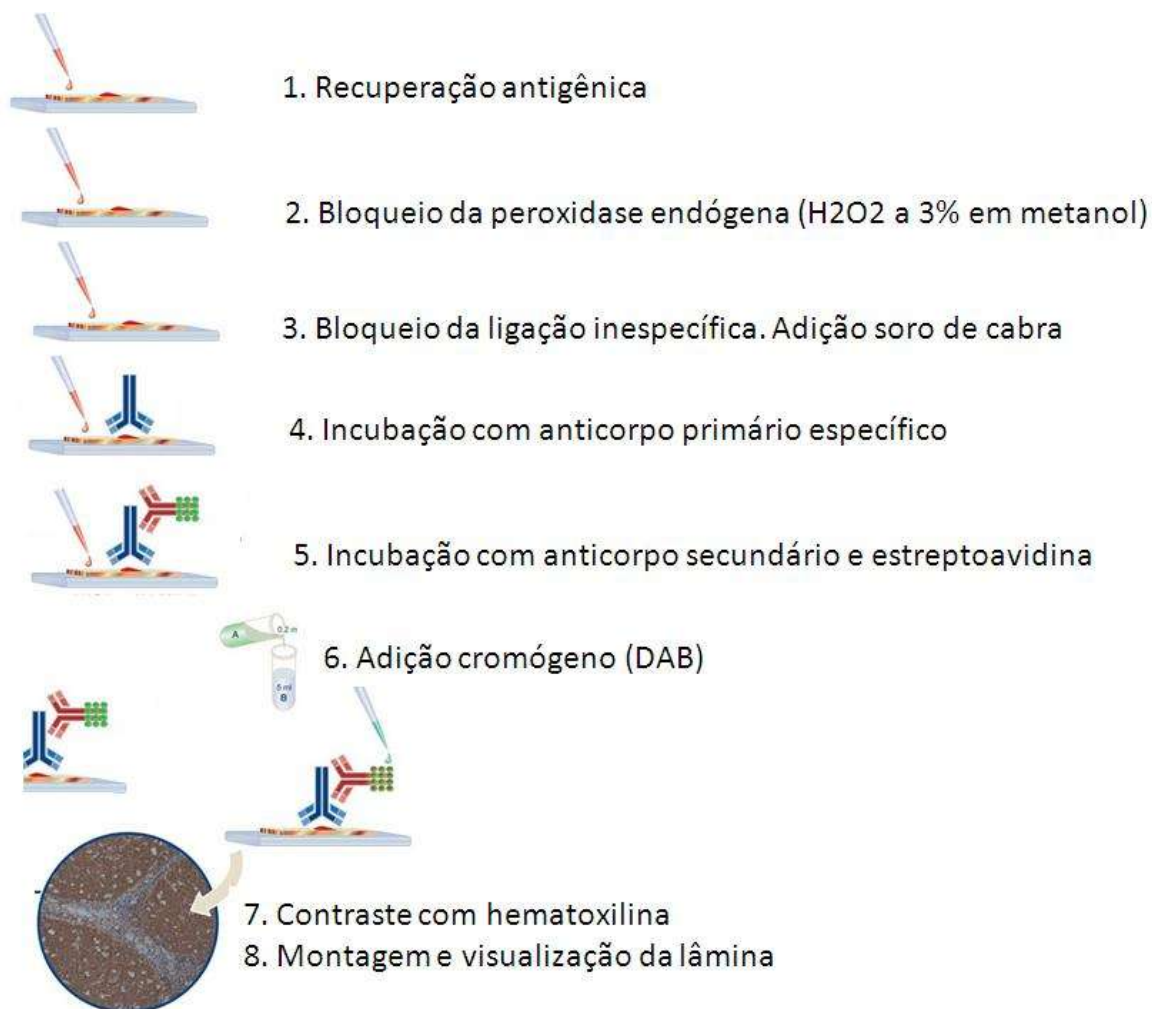


Figura 6 – Protocolo da imuno-histoquímica.

As imagens da imuno-histoquímica foram digitalizadas usando uma câmera de vídeo Olympus DP70 (12.5 megapixels, Tokyo, Japan) acoplada ao microscópio de luz Olympus BX51 (Tokyo, Japan), sendo todas as imagens capturadas transferidas para um microcomputador. A análise quantitativa foi feita em aumento final de 200x usando uma técnica baseada em segmentação

de cores com auxílio do software Image-Pro Plus (4.5.0.29, Media Cybernetics, Inc, Bethesda, MD, USA) (figuras 7-10).

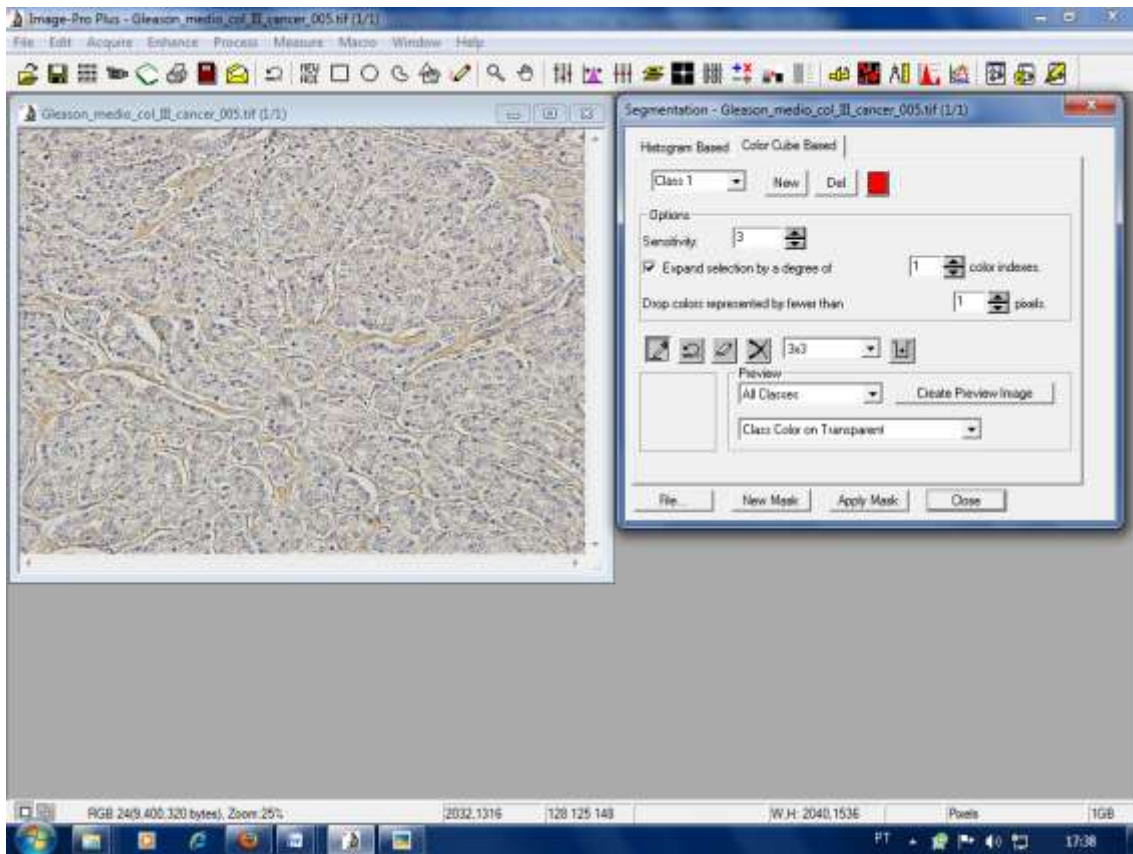


Figura 7 - Com o software Image-Pro Plus a fotomicrografia a ser analisada era aberta, para ser feita a avaliação da porcentagem que a marcação ocupava na fotomicrografia.

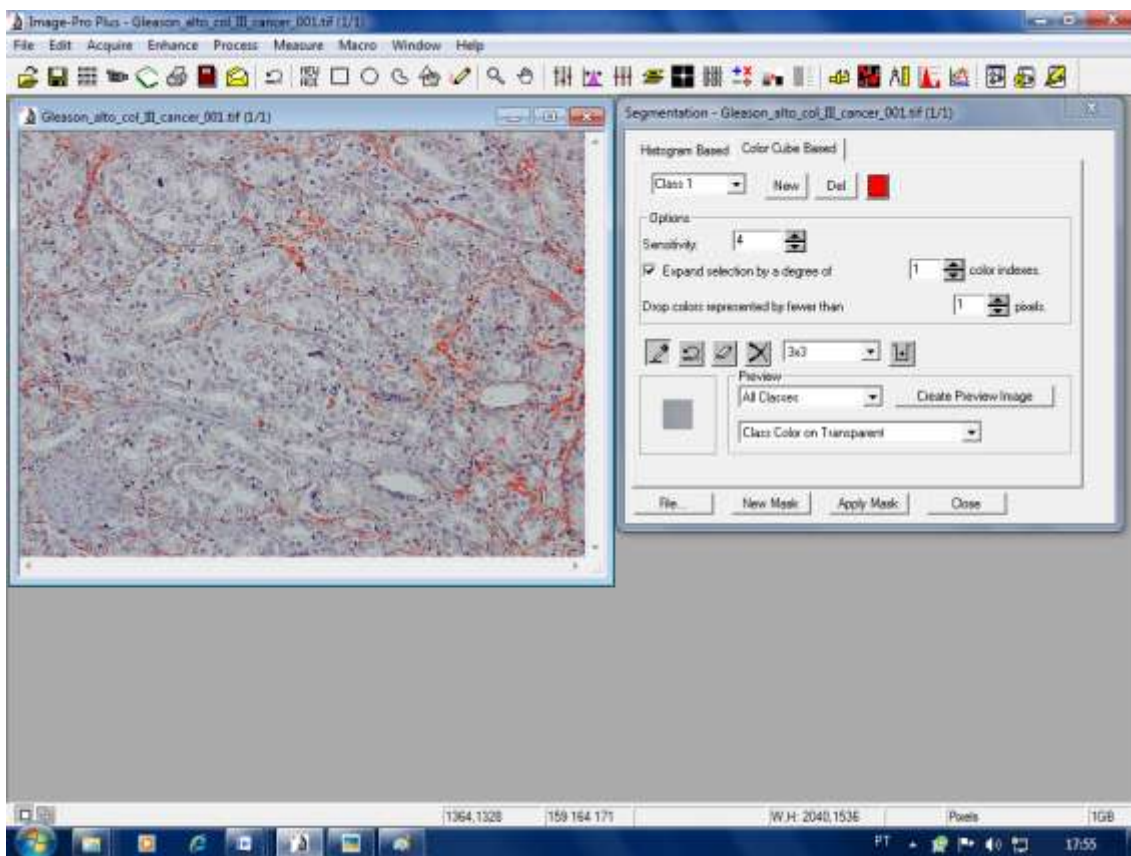


Figura 8 - Com a marcação feita em vermelho, era criada uma máscara através do botão New Mask, visando a quantificação da área marcada.

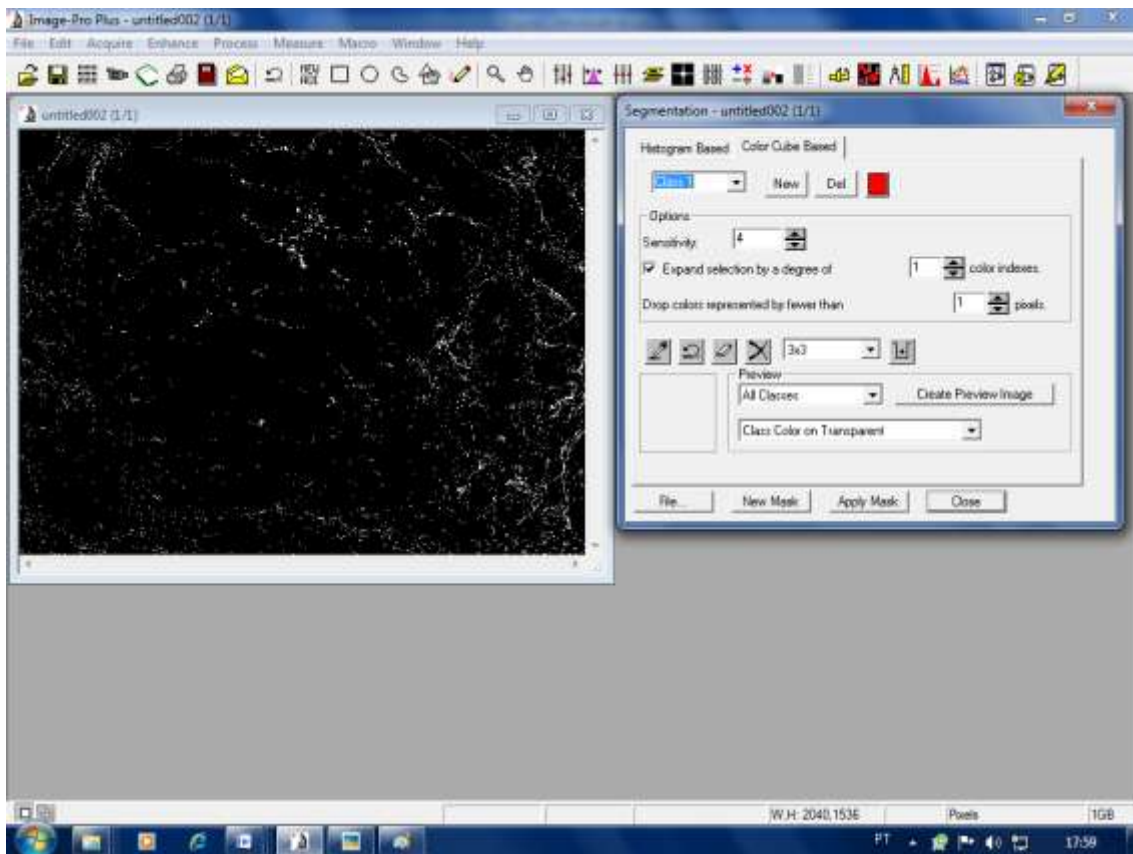


Figura 9 - Em branco a máscara, a parte correspondente a marcação.

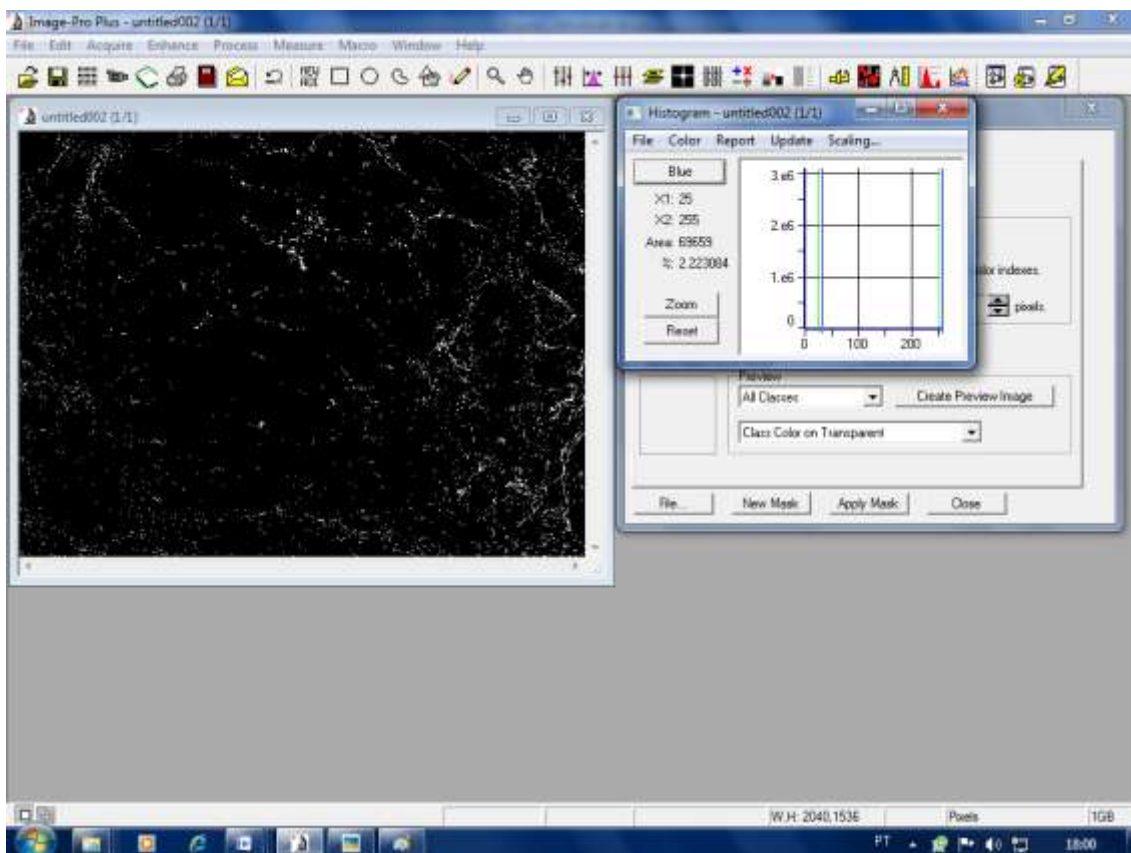


Figura 10 - Com a ferramenta “Histogram” era realizada a mensuração da área.

Análise estatística: O tempo de sobrevida tumoral livre de recidiva foi determinado pela análise de Kaplan-Meier. A razão de risco e seu intervalo de confiança de 95% foram analisados para cada marcador. A significância estatística da expressão gênica e da imunohistoquímica foi determinada pelo teste t Student. A significância estatística entre ambos os controles de tecido prostático benigno foi avaliada por análise de variância univariada seguida de teste de Newman-Keuls. Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo nestas análises.

RESULTADOS

A figura 11 mostra que há diferença estatística significativa nos resultados de sobrevida livre de recidiva de PSA nos pacientes avaliados conforme os diferentes estadios patológicos (Figura 11A), PSA pré-operatório (Figura 11B) e graus de Gleason (Figura 11C) ao longo de 5 anos. Na figura 11B, nota-se que o traçado dos pacientes com $PSA \leq 4$, tem-se abrupta queda após 44 meses, e isto se deve pois neste subgrupo, o único paciente acompanhado após este período teve recidiva tumoral nesta ocasião.

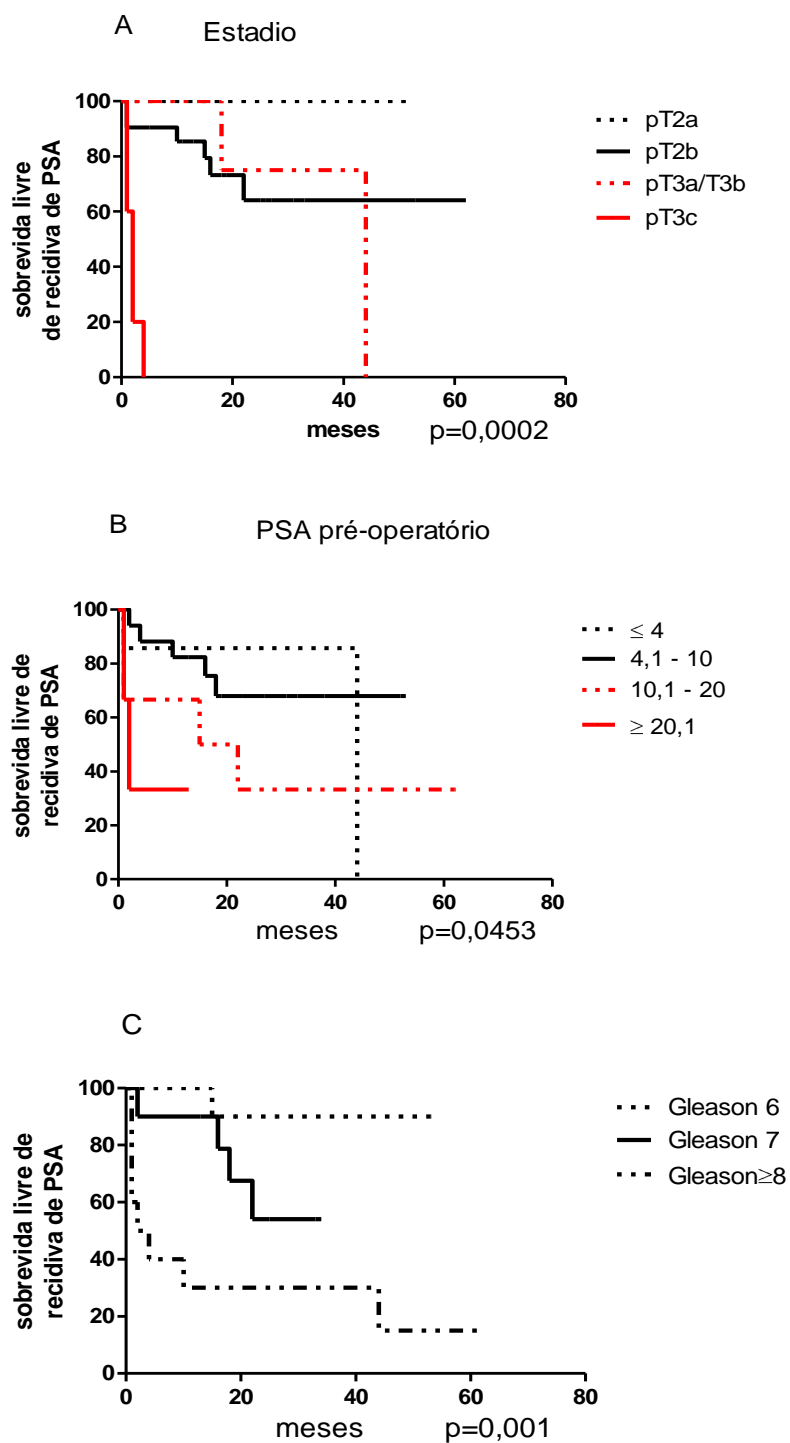


Figura 11 – Sobrevida livre de recorrência do PSA após a prostatectomia radical retropúbica estratificada pelo estadio patológico (A), PSA pré-operatório (B) e Gleason (C).

A figura 12 mostra que a expressão do gene de colágeno I e III avaliada por PCR em tempo real apresenta diferença significativa em relação ao grau de Gleason quando comparado a área de tecido prostático benigno. Há um aumento na expressão de ambos os tipos de colágeno na área tumoral nos casos de Gleason=6, redução nos casos de Gleason ≥ 8 e nenhuma alteração nos casos de Gleason=7.

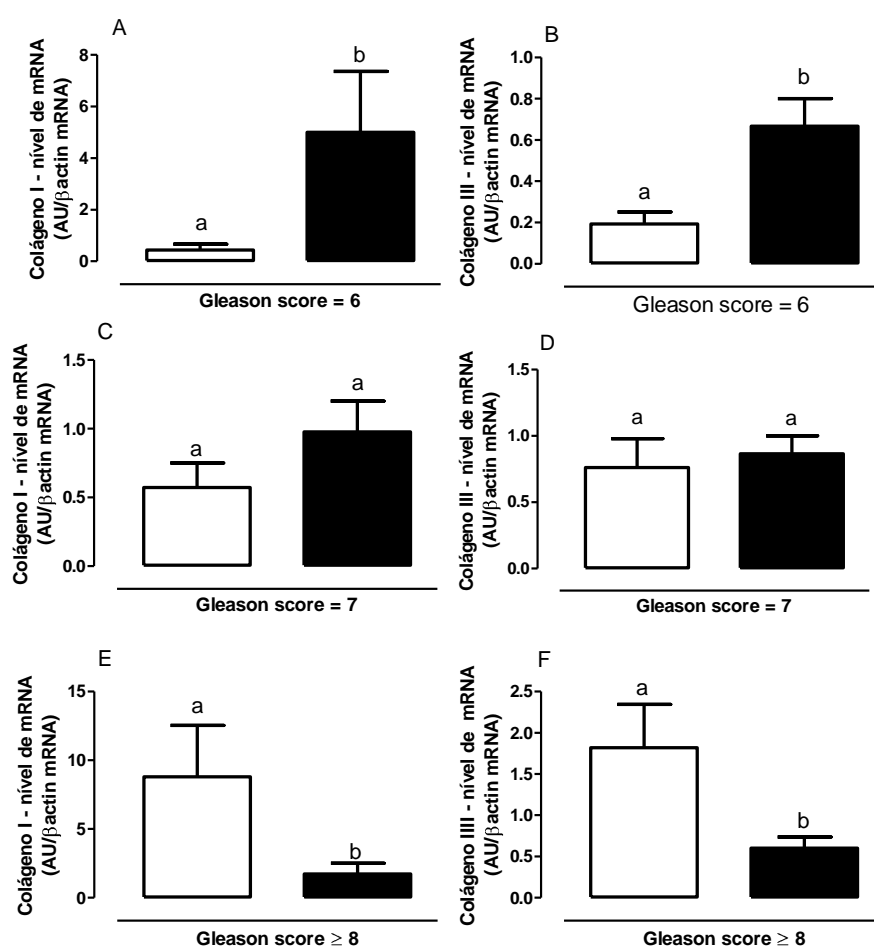


Figura 12 – Expressão gênica de colágeno I e III por PCR em tempo real nos diferentes graus de Gleason. A barra branca representa o tecido prostático benigno. A área tumoral é representada pela barra preta. B-actina foi usada como controle interno. Os dados são expressos como média \pm erro padrão de 13 pacientes (Gleason=6), 10 pacientes (Gleason=7) e 10 pacientes (Gleason ≥ 8). Diferentes letras significam diferença estatística.

A análise de correlação mostra que a expressão de colágeno I e III não apresenta correlação com os diferentes graus de Gleason na área tumoral (figura 13).

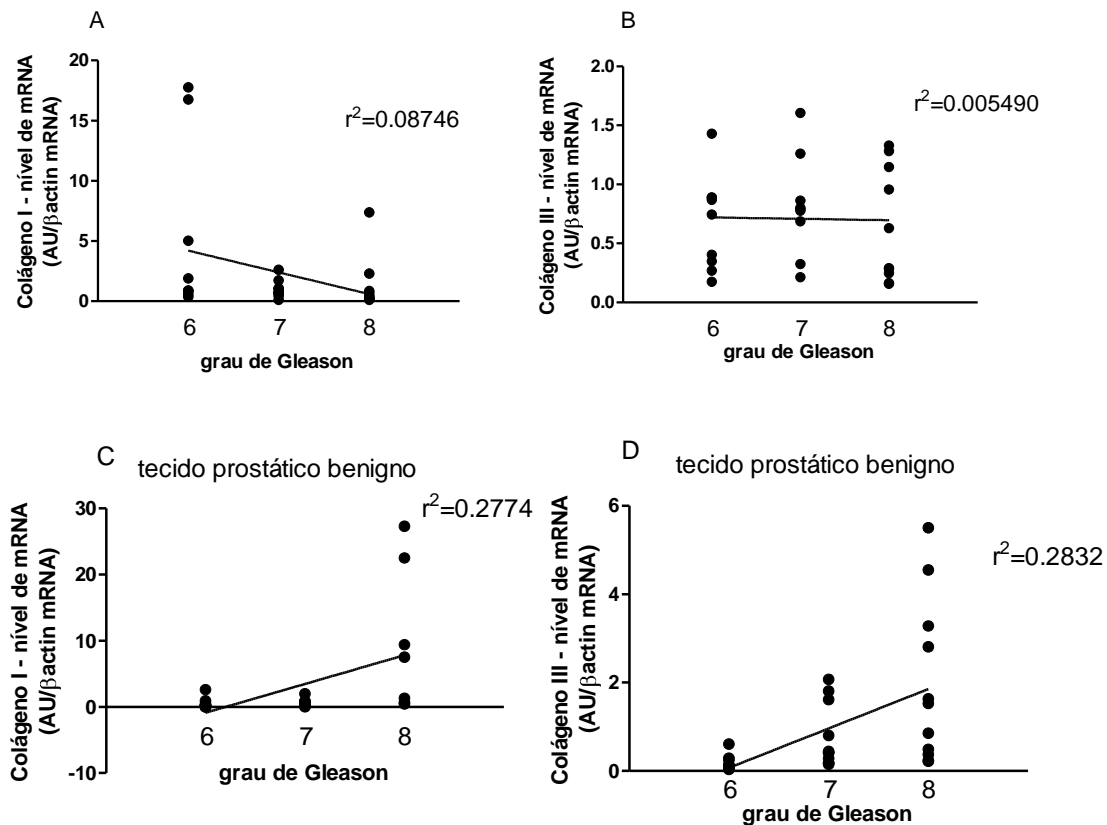


Figura 13 – Correlação entre a expressão de colágeno e grau de Gleason por PCR nos diferentes graus de Gleason da área tumoral (A,B) e no tecido prostático benigno adjacente (C,D).

A análise por imuno-histoquímica mostra que a expressão de colágeno I e III foi significativamente reduzida em todos os graus de Gleason, enquanto a expressão de metaloproteinase foi significativamente aumentada (figura 14). As fotomicrografias relativas às imuno-histoquímicas estão apresentadas nas figuras 15 à 17.

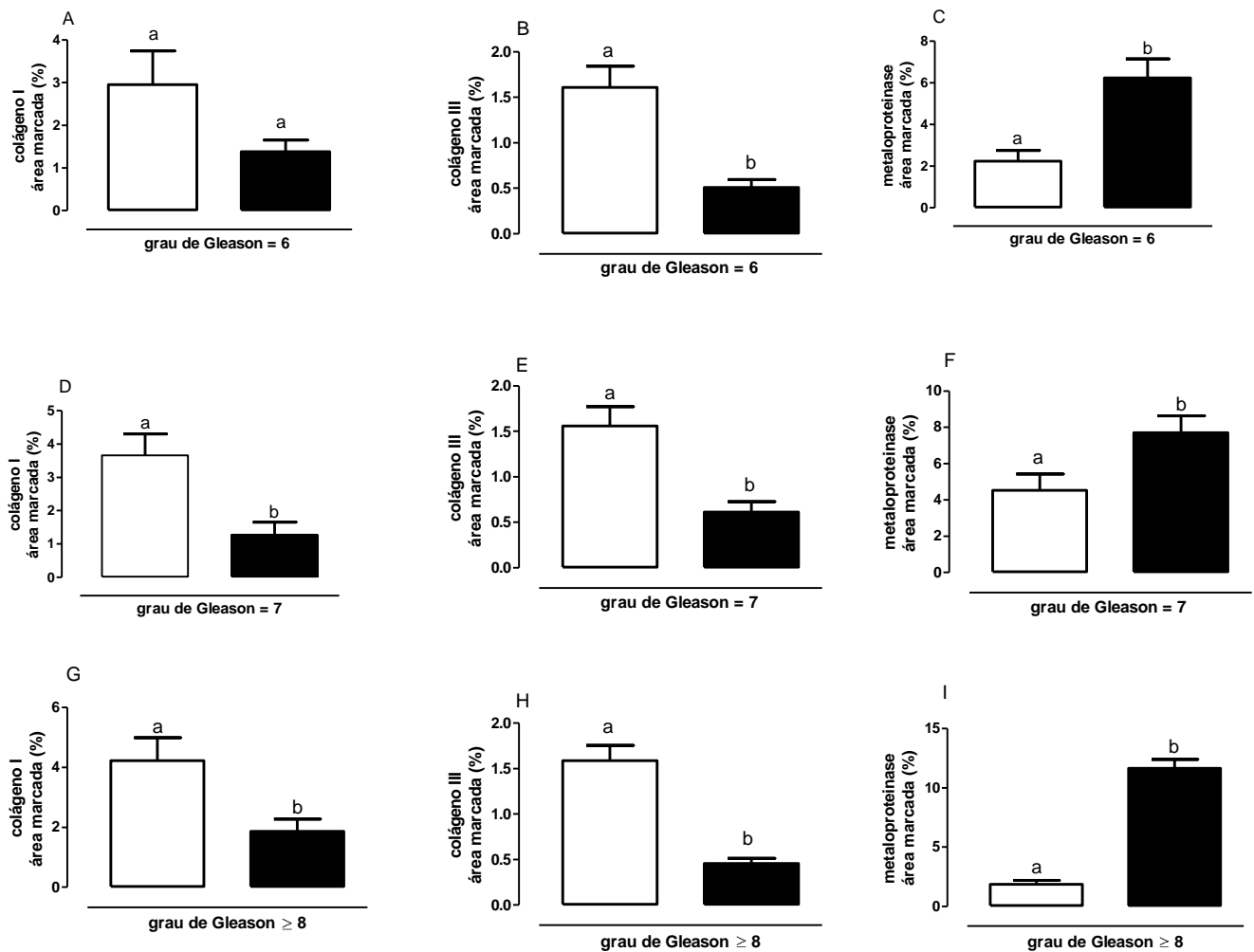


Figura 14: Expressão de colágeno I (A,D,G), III (B,E,H) e metaloproteinase (C,F,I) por imuno-histoquímica. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes significam diferença estatística.

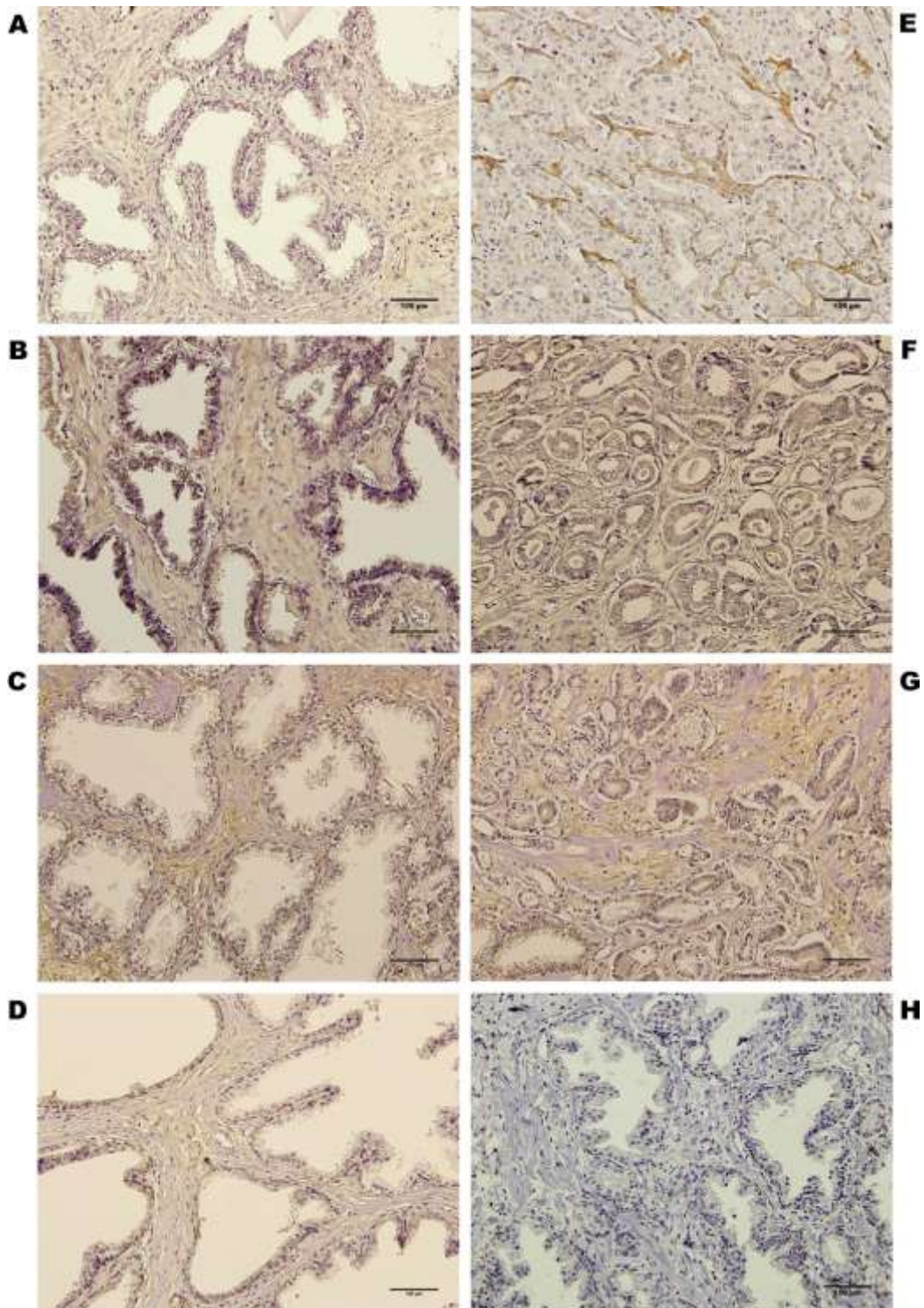


Figura 15: Fotomicrografia mostrando imuno-histoquímica das áreas de tecido prostático benigno e tumoral para colágeno I no grau de Gleason ≥ 8 (A,E), Gleason=7 (B,F), Gleason=6 (C,G). Próstata dos pacientes com câncer de bexiga submetido à cistoprostatectomia (D). Controle negativo (H). Aumento de 200X.

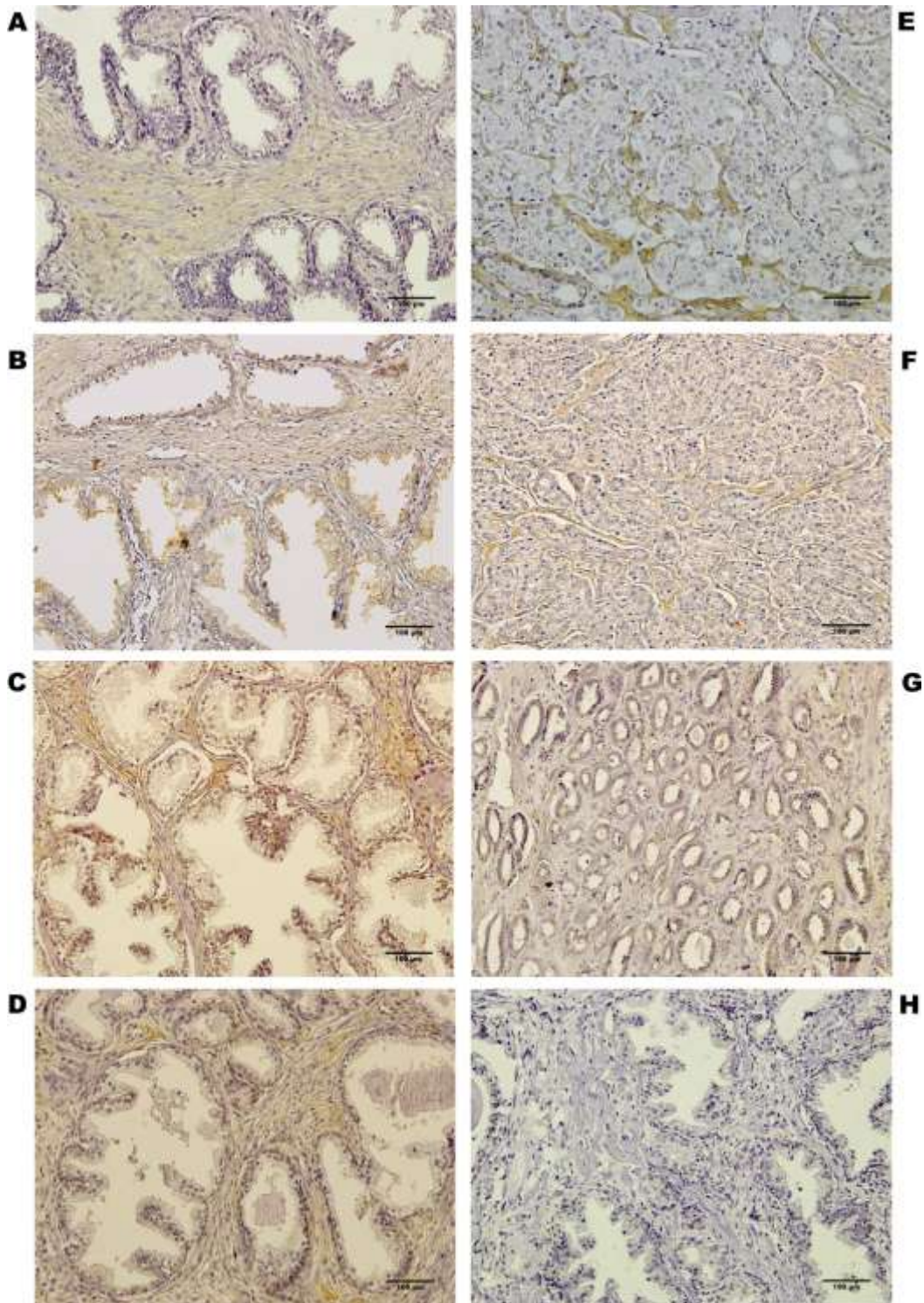


Figura 16: Fotomicrografia mostrando imuno-histoquímica das áreas de tecido prostático benigno e tumoral para colágeno III no grau de Gleason ≥ 8 (A,E), Gleason=7 (B,F), Gleason=6 (C,G). Próstata dos pacientes com câncer de bexiga submetido à cistoprostatectomia (D). Controle negativo (H). Aumento de 200X.

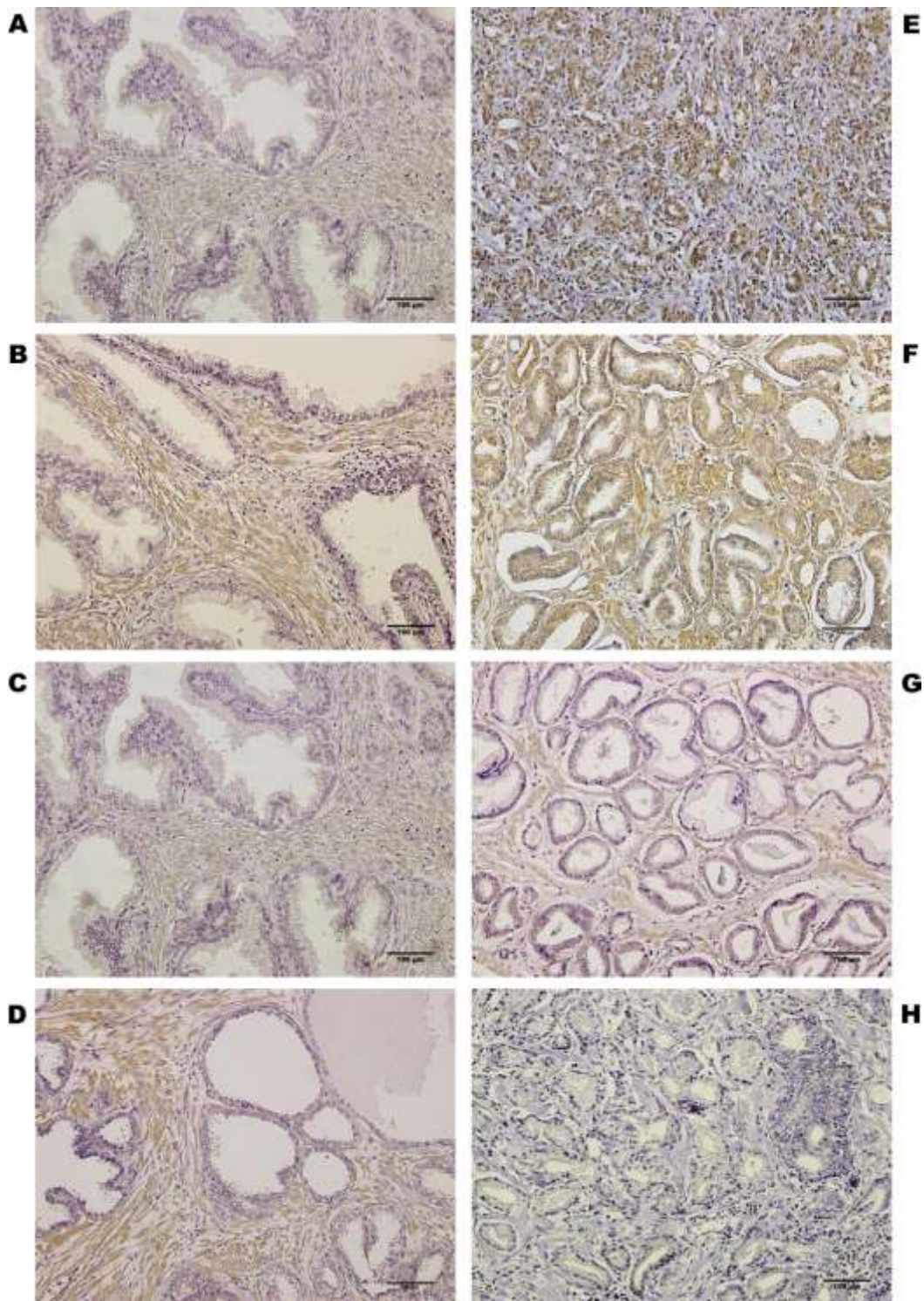


Figura 17: Fotomicrografia mostrando imuno-histoquímica das áreas de tecido prostático benigno e tumoral para metaloproteínase no grau de Gleason ≥ 8 (A,E), Gleason=7 (B,F), Gleason=6 (C,G). Próstata dos pacientes com câncer de bexiga submetido à cistoprostatectomia (D). Controle negativo (H). Aumento de 200X.

Não houve correlação nos resultados de imuno-histoquímica de colágeno I e III em relação ao escore de Gleason, em ambas as áreas benignas e tumorais. Entretanto houve uma correlação positiva na expressão de metaloproteínase em relação ao escore de Gleason na área tumoral (figura 18).

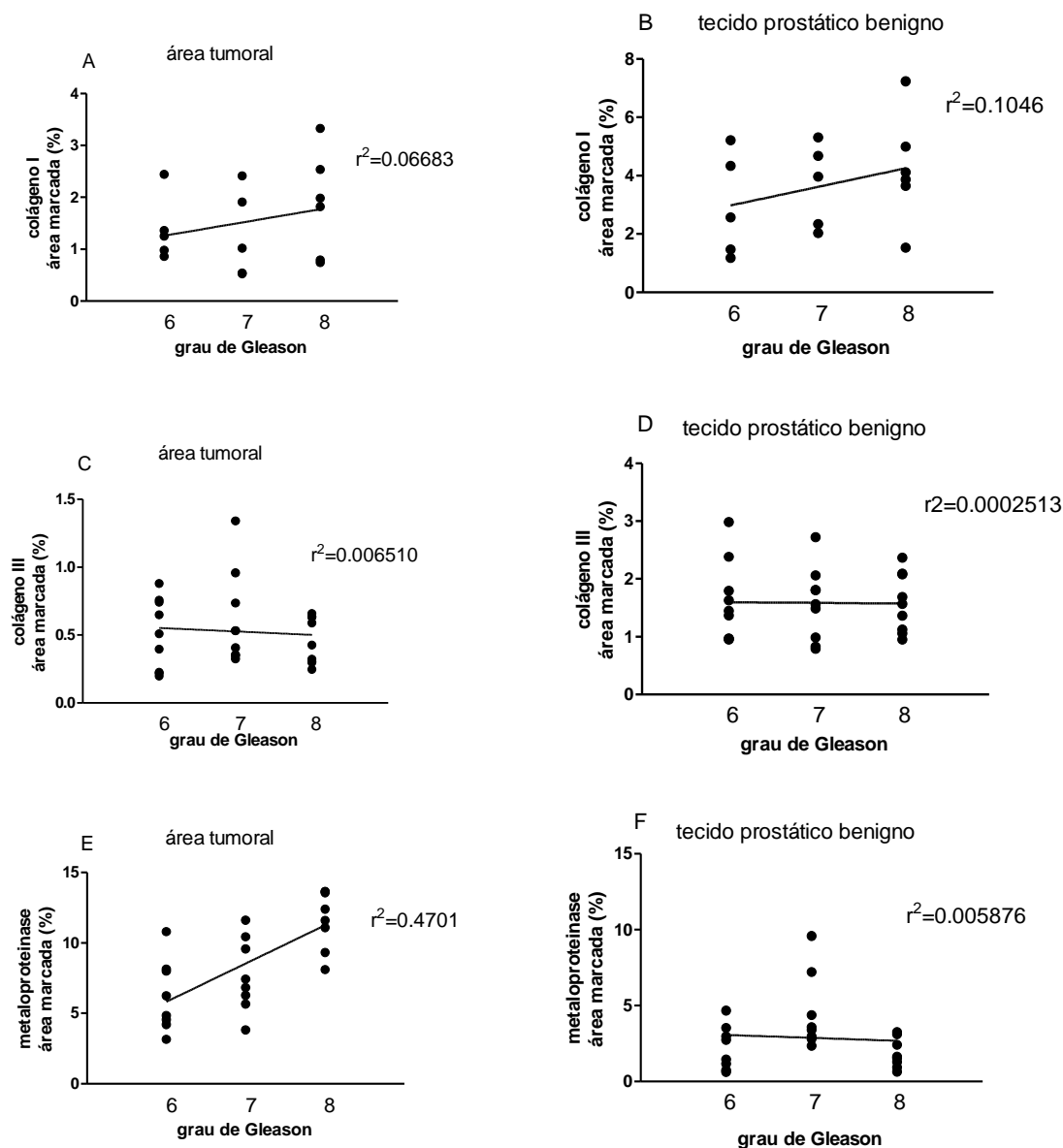


Figura 18: Correlação entre colágeno I, III e metaloproteínase e grau de Gleason na área tumoral (A,C,E) e no tecido prostático benigno adjacente (B,D,F).

Comparando a área normal de pacientes submetidos à cistoprostatectomia com áreas normais dos diferentes graus de Gleason, não há diferença significativa na expressão tanto dos genes quanto das proteínas (figura 19).

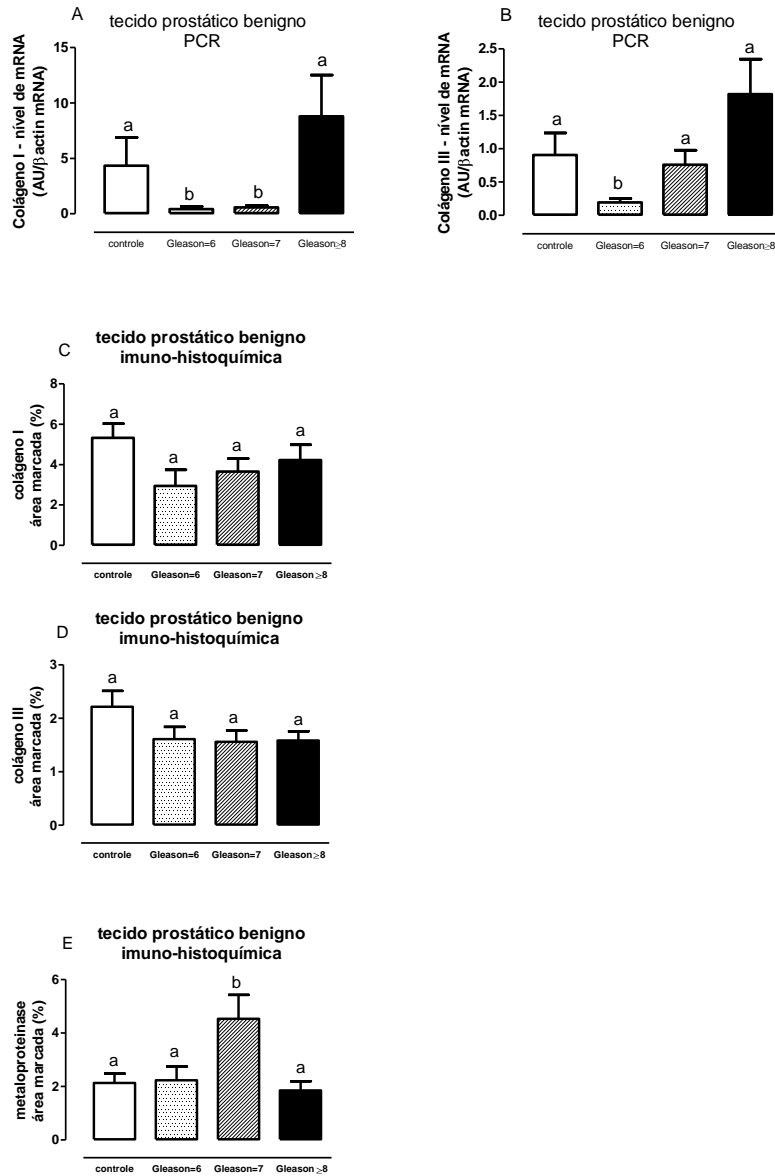


Figura 19: Comparação entre grupo controle e áreas de tecido prostático benigno, tanto por expressão de PCR (A,B) quanto por imuno-histoquímica (C,D,E). Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes significam diferença estatística.

Na figura 20 mostrou-se que não houve diferença estatística significativa na expressão das áreas de colágeno entre os estadios pT2 e pT3 e PSA pré operatório.

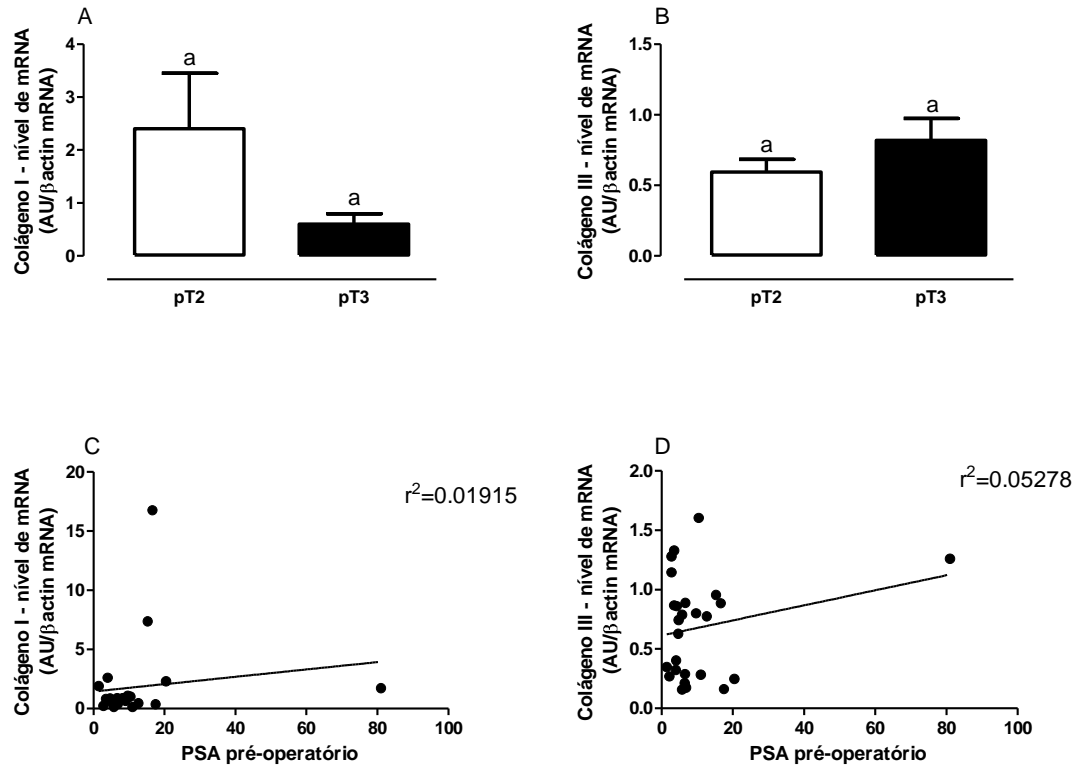


Figura 20 - expressão das áreas de colágeno entre os estadios pT2 e pT3 (A,B) e correlação de PSA pré operatório (C,D). Letras diferentes significam diferença estatística.

DISCUSSÃO

O fato da classificação de Gleason permanecer desde a sua descrição em 1966 até os dias de hoje como o maior fator prognóstico isolado do câncer prostático gera expectativas para a identificação de outros fatores que possam ser usados isoladamente ou em conjunto ao grau de Gleason como fator prognóstico. A classificação de Gleason foi atualizada em 2005 durante o encontro de especialistas da Sociedade Internacional de Patologia Urológica. Após a conferência consenso, diversos estudos confirmaram a superioridade do sistema modificado de Gleason assim como o impacto na prática urológica [23].

A maior limitação desta classificação é a fraca concordância entre o escore da biópsia e da prostatectomia [24-26]. Apenas em cerca de 1/3 dos casos tais concordâncias tipicamente existem, com outro 1/3 tendo um escore de prostatectomia que é ± 1 do escore da biópsia por agulha. Para o 1/3 restante, a diferença é de 2 ou mais. Fatores que contribuem para tais discrepâncias incluem a heterogeneidade do tumor, erros de amostragem, intervariabilidade e intravariabilidade, e erros interpretativos [27]. Isto serve para mostrar a importância de se pesquisar outros métodos de avaliação para auxiliar ao grau de Gleason, que é um sistema baseado na avaliação do padrão glandular do tumor prostático maligno. Devemos recordar que ao redor das glândulas prostáticas tem-se o estroma que forma uma arquitetura que dá

proteção a este tecido. A medida em que o adenocarcinoma prostático se desenvolve tem-se a substituição progressiva no estroma das fibras musculares lisas em miofibroblastos. Os miofibroblastos no estroma reativo sintetizam componentes da matriz extracelular como o colágeno I, colágeno III, isoformas de fibronectina, tenascina e versican [12]. Um dos principais papéis propostos dos miofibroblastos na progressão e crescimento do câncer é a transição do tumor não invasivo para invasivo, sugerindo que o aparecimento dos miofibroblastos precede a fase de câncer invasivo [28]. Esta mudança do estroma provavelmente está relacionada com o grau de agressividade do tumor seja no que se refere à invasão local, seja em relação ao potencial metastático. Logo é coerente imaginar que a agressividade do tumor não estaria somente relacionado ao padrão glandular, mas sim ao conjunto elemento glandular e estroma ao redor. Peguemos o exemplo do Gleason 5 + 5, que representa um tumor bem indiferenciado e assim de comportamento agressivo, e que segundo Yanagisawa e autores, geralmente não tem estroma [29]. Na literatura encontram-se diversos trabalhos estudando esta correlação, muitos ao nível protéico (por imuno-histoquímica). Acreditando que há muito a descobrir neste ponto, procuramos avaliar através da pesquisa gênica, se há expressão do colágeno tipo I e III no câncer de próstata, de uma forma que acreditamos não ter sido avaliada antes. Dentre os componentes do estroma, o colágeno foi o escolhido, por se tratar da proteína mais abundante nos mamíferos e um dos principais constituintes da matriz extracelular e membrana basal [30].

A sobrevida livre de recidiva de PSA dos pacientes selecionados neste trabalho foram avaliadas em relação ao

estadio patológico, PSA pré-operatório e diferentes graus de Gleason ao longo de até 5 anos. Nossos resultados estão de acordo com os primeiros 5 anos daqueles demonstrados para uma amostra de 2409 pacientes, da Universidade de Johns Hopkins, submetidos à prostatectomia radical retropúbica por adenocarcinoma de próstata localizado, entre 1982 e 1999 [31]. Isto mostra que apesar do número pequeno da amostra utilizada neste trabalho, este grupo foi bem selecionado dando confiabilidade aos resultados.

A expressão do gene de colágeno I e III foi maior na área tumoral das amostras de Gleason=6 em comparação a área de tecido prostático benigno adjacente, ocorrendo o inverso nas amostras de Gleason \geq 8. As amostras de Gleason=7 não apresentaram alteração significativa. Por outro lado, a análise da expressão protéica por imunohistoquímica mostrou resultados diferentes. A expressão de ambas as proteínas colágeno I e III foram significativamente reduzidas na área tumoral em todos os graus de Gleason quando comparado a área adjacente de tecido benigno. Os resultados aparentemente contraditórios, na verdade, podem ser resultados dos diferentes mecanismos que regulam a expressão gênica [32].

A fim de tentar esclarecer alguns mecanismos da regulação gênica, analisamos a expressão da proteína metaloproteinase 13, responsável pela degradação da matriz

extracelular [13]. Sua expressão se mostrou aumentada na área tumoral em todos os graus de Gleason quando comparado a área de tecido prostático benigno adjacente, sugerindo que a redução na expressão da proteína colágeno seria consequente a ação desta enzima. Não podemos esquecer que a meia vida de uma proteína é maior que a meia vida do RNA, o qual é traduzido em proteína imediatamente após a sua síntese. Desta forma, podemos hipotetizar que a expressão do gene é resultado de uma ação mais recente ocorrida dentro da célula que pode não se refletir imediatamente na quantidade de proteína, que por ter uma meia vida longa, pode permanecer mais tempo no tecido. Experimentos utilizando culturas de células e/ou tecidos poderiam ajudar a elucidar os mecanismos de regulação da expressão gênica que ocorrem no tecido tumoral.

Apesar de nossos resultados não explicarem a razão para essa contradição, não temos conhecimentos de estudos prévios que tenham analisado a expressão do gene de colágeno em casos de câncer de próstata, o que torna este trabalho inédito e interessante. Podemos supor que a diferença na expressão gênica de colágeno entre as áreas tumorais e tecidos prostáticos benignos adjacentes exerça alguma importância funcional na glândula de modo que esse resultado pode ser explorado futuramente para um melhor entendimento sobre o surgimento e progressão da doença.

Burns-Cox e colegas [30] mostram que a menor quantidade de colágeno em tumores de grau de Gleason ≥ 8 pode levar à diminuição do sustento nutricional celular e, portanto, explicar o aumento do número de focos de necrose em tumores de alto grau. Além disto, o câncer de próstata de alto grau está associado à perda de resistência estrutural, aumento da celularidade, diminuição da matriz extracelular e aumento da friabilidade, o qual confirma a conclusão de depleção de colágeno. Podemos hipotetizar que a alta expressão do gene de colágeno nos casos de Gleason=6 teria o efeito oposto justificando assim os diferentes fenótipos dos tumores de diferentes graus. Entretanto as diferenças entre expressão do gene e da proteína nos tumores de grau de Gleason=6 torna difícil a aceitação desta hipótese, tornando essencial a realização de novos experimentos a fim de esclarecer essa hipótese.

A análise de correlação mostra que apesar da diferença na expressão do gene de colágeno entre a área tumoral e o tecido prostático benigno adjacente nos casos de Gleason=6 e Gleason ≥ 8 , não há correlação entre expressão de colágeno I ou III e grau de Gleason. Ao nível protéico os resultados são semelhantes. Podemos assumir então que o colágeno não pode ser utilizado como um fator de prognóstico junto ao grau de Gleason nem a nível gênico nem protéico. A falta de correlação entre o grau de estroma e os parâmetros clínico-patológicos, ao nível protéico, foi demonstrada previamente

no trabalho de Ayala e colegas [33].

No entanto, a expressão da metaloproteinase mostrou uma correlação positiva com grau de Gleason. Apesar de ser uma correlação ainda fraca ($r^2=0,47$), acreditamos que com um número maior de amostras essa correlação poderia chegar a valores próximos de 1. Esse dado corrobora a literatura que mostra que a expressão de outras metaloproteinases apresenta correlação com grau de Gleason [34]. Mais uma vez não encontramos dados sobre a expressão da metaloproteinase 13 no câncer de próstata.

A ausência de correlação entre colágeno e PSA pré-operatório poderia ser explicada pelo fato de que as elevações do PSA não são específicas para câncer prostático.

Sabendo da relação existente entre grau de Gleason e estadió, era de se esperar a não correlação entre a expressão de colágeno e estadió, tendo em vista a falta de associação entre a expressão de colágeno e grau de Gleason.

A comparação entre as áreas de tecido prostático benigno adjacentes ao tumor e a próstata normal de pacientes submetidos a cistectomia sugere que não há um padrão na expressão do gene colágeno nessas áreas. Entretanto, ao nível protéico os resultados são mais homogêneos não havendo diferença significativa entre as diferentes áreas. Acreditamos

que mais uma vez, essa discrepância deva-se a meia vida mais longa da proteína em comparação ao RNA. De qualquer forma, esses resultados sugerem que pelo menos para este tipo de análise ambos os tipos de controle parecem ser satisfatórios.

CONCLUSÃO

Não há correlação entre expressão de colágeno e grau de Gleason, nem a nível gênico nem protéico.

A expressão de metaloproteinase apresenta correlação positiva com grau de Gleason, o que sugere ser um fator promissor para melhorá-lo.

REFERÊNCIAS

1. National Cancer Institute [Internet]. Incidence and mortality rate trends [cited 2005]. Available from: www.cancer.gov/aboutnci/servingpeople/snapshots/prostate.pdf
2. Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Incidência de câncer no Brasil [citado em 2010]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabela_estados.asp&UF=BR
3. Campbell-Walsh Urology. Philadelphia, Saunders. 2007; vol. 1, p. 61.
4. Billis A: Patologia Cirúrgica da Próstata. Campinas. 2003; p. 20, 96.
5. De Marzo AM, Nelson WG, Meeker AK, Coffey DS: Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol.* 1998; 160:2381-92.
6. Li H, Fan X, Houghton JM: Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem.* 2006; 9999:1-12.
7. Campbell-Walsh Urology. Philadelphia, Saunders. 2007; vol. 3, p. 2707.
8. Wever OD, Mareel M: Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 2003; 200:429-47.
9. Tomas D, Krušlin B: The potencial value of (myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *The Prostate* 2004; 61:324-31.
10. Condon MS: The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Seminars in cancer biology* 2005; 15:132-37.
11. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR: Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res.* 2002, 8: 2912-292.
12. Hanamura N, Yoshida T, Matsumoto E, Kawarada Y, Sakakura T: Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells, and epithelial cells in

- human colon adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1997; 73:10-15.
13. Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:161-74.
 14. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.*, 18:1135–1149, 2000.
 15. Chambers AF, Matrisian LM: Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 1260–1270, 1997.
 16. DeClerck YA, Imren S, Montgomery AM, Mueller BM, Reisfeld RA, Laug WE: Proteases and protease inhibitors in tumor progression. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 425: 89–97, 1997.
 17. Noel A, Albert V, Bajou K, Bisson C, Devy L, Franken F, Maquoi E, Masson V, Sounni NE, Foidart JM: New functions of stromal proteases and their inhibitors in tumor progression. *Surg. Oncol. Clin. North Am.*, 10: 417–432, 2001.
 18. Thompson I, Thrasher JB e colegas. Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. *J Urol.* 2007; 177: 2106-31.
 19. Boorjian SA, Karnes RJ, Crispen PL, Rangel LJ, Bergstralh EJ, Sebo TJ, Blute ML: The impact of discordance between biopsy and pathological Gleason scores on survival after radical prostatectomy. *J Urol.* 2009; 181: 95-104.
 20. Epstein J.I., Pizov G., Walsh P.C.: Correlation of pathologic findings with progression following radical retropubic prostatectomy. *Cancer* 1993b; 71: 3582-83.
 21. Billis A, Guimarães MS, Freitas LLL, Meirelles L, Magna LA, Ferreira U: The impact of the 2005 International Society of Urological Pathology Consensus Conference on standard Gleason grading of prostatic carcinoma in needle biopsies. *J Urol.* 2008; 180: 548-53.
 22. D'Amico AV, Chen MH, Roehl KA, Catalona WJ: Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. *N Engl J Med.* 2004; 351:125-35.
 23. Epstein JI: An update of the Gleason grading system. *J Urol.* 2010; 183(2):433-40.

24. Bostwick DG: Gleason grading of prostatic needle biopsies: correlation with grade in 316 matched prostatectomies. *Am J Surg Pathol.* 1994; 188:796-803.
25. Cookson MS, Fleshner NE, Soloway SM: Correlation between Gleason score of needle biopsy and radical prostatectomy specimen: accuracy and clinical implications. *J Urol.* 1997; 157:559-562.
26. Steinberg DM, Sauvageot J, Piantadosi S: Correlation of prostate needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings. *Am J Surg Pathol.* 1997; 215:566-576.
27. Shah RB: Current perspectives on the Gleason grading of prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133(11):1810-6.
28. Gabbiani G: The myofibroblasts in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003;200:500-503.
29. Yanagisawa N, Li R, Rowley D, Liu H, Kadmon D, Miles BJ, Wheeler TM, Ayala GE: Stromogenic prostatic carcinoma pattern (carcinomas with reactive stromal grade 3) in needle biopsies predicts biochemical recurrence-free survival in patients after radical prostatectomy. *Hum Pathol.* 2007; 38(11):1611-20.
30. Burns-Cox N, Avery NC, Gingell JC, Bailey AJ: Changes in collagen metabolism in prostate cancer: a host response that may alter progression. *J Urol.* 2001; 166(5):1698-701.
31. Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI, Walsh PC: Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy: The 15- year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am.* 2001; 28(3): 555-65.
32. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition.
33. Ayala G, Tuxhorn JA, Wheeler TM, Frolov A, Scardino PT, Ohori M, Wheeler M, Spitler J, Rowley DR: Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(13):4792-801.
34. Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Têtu B: Matrix metalloproteinase 9 is associated with Gleason score in prostate cancer but not with prognosis. *Hum Pathol.* 2010.

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Rio de Janeiro, 01 de outubro de 2010

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Ronaldo Damiano
Para: Aut. Antonio Henrique de Almeida Duarte
Orient. Prof. Francisco Sampaio

Registro CEP/HUPE: 2361/2010 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)
CAAE: 0047.0.228.000-09

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "EXPRESSÃO DO COLÁGENO NOS DIFERENTES GRAUS DE GLEASON, PREDIZENDO RESULTADOS NOS PACIENTES COM CÂNCER PROSTÁTICO" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^ª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


Prof. Ronaldo Damiano
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa

AGRADECIMENTOS TÉCNICOS

À Professora Cristiane Ramos pela grande orientação dada durante a realização deste trabalho.

Aos Professores Francisco José Barcellos Sampaio e Luciano Favorito pela revisão do trabalho.

À Sicilia, Max e Jorge pela importante ajuda prática na realização do material e métodos.

À colega Carla Gallo pela ajuda na melhoria das imagens para a tese e o artigo.

Ao Dr. Paulo Martins Rodrigues e os colegas da Uroclínica Botafogo por terem permitido que diversos pacientes que fizeram parte do estudo fossem da clínica privada deles.

Ao Dr. Sérgio Romano e colegas médicos, técnicos e secretárias do Laboratório Micro Imagem que permitiram a coleta dos blocos dos pacientes do estudo, além de auxiliarem na elucidação do diagnóstico.

CONFLITO DE INTERESSES

Nada a declarar.