JOSÉ PONTES JÚNIOR

Análise da expressão de moléculas de adesão no tumor primário e em metástases ósseas e linfonodais de pacientes com câncer de próstata

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Urologia

Orientadora: Dra. Kátia Ramos Moreira Leite

São Paulo

2009

“Aos meus amados pais, e exemplos de caráter, Thereza Luiza e José Pontes pelo apoio, motivação e presença constante em minha vida”

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Kátia Leite. O orientador padrão-ouro seria aquele capaz de incutir, e ou despertar, nos seus alunos o interesse pela ciência e com isto contribuir para a formação das novas gerações de cientistas em nosso país. O convívio com você no LIM 55 nos últimos quatro anos me faz ter a certeza de que você pertence a este grupo de orientadores. Agradeço pelo apoio fundamental na realização deste projeto, especialmente pela ampliação da linha de pesquisa. Seu senso crítico e objetividade, assim como o seu profissionalismo e valorização dos membros do grupo, contagiam e estimulam a todos da equipe. A considerável produção científica do LIM 55 nos últimos anos é fruto de seu trabalho e liderança.

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, Titular da Disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a quem ainda não consigo traduzir em palavras a minha gratidão; por ter acreditado em mim, pelas oportunidades que me proporcionou na Divisão de Clínica Urológica e no Instituto do Câncer, por ter me transmitido conceitos valiosos sobre a arte de ensinar, comunicar e operar, e pelo exemplo ímpar de comportamento ético e humano na medicina e na sociedade.

À pesquisadora Sabrina Reis, colega de todas as horas, seu incentivo e ajuda incondicional em todas as etapas, contribuiu em muito para a concretização deste projeto. Esta parceria foi uma das maiores conquistas que tive no LIM 55.

Ao Mestre José Cury e ao Dr. Luis Carlos, respectivamente “pai” e “irmão” de vida acadêmica, por terem me aceito na graduação da Disciplina de Urologia e pelos ensinamentos e apoio constante que me oferecem na vida intra e extra hospitalar.

Voces são uns dos maiores exemplos de caráter e solidariedade que conheci na urologia.

Aos colegas do LIM 55, Iran, Camila, Azoubel, Mabel, Leopoldo, Luciana, Toyama, Mário, Fabíola, Vanessa e Pedro e aos alunos de iniciação científica Paulo Afonso e Paulo Kayano pela ajuda, aprendizado e amizade compartilhadas.

Ao Prof. Homero Bruschini por acreditar de antemão que a qualidade da nossa pesquisa o qualificava como um projeto de tese de Doutorado.

Ao grupo de tumores da Disciplina de Urologia, chefiados pelo Prof. Marcos Dall'Oglio, pelo exemplo de profissionalismo e união nas atividades assistenciais, ensino e pesquisa no HCFMUSP e ICESP.

À estatística Adriana Sanudo pela amizade e pela ajuda na elaboração dos resultados; seu comportamento profissional e competência são únicos. À Sra. Elisa, secretária da pós-graduação, pelo auxílio na burocracia, prazos e nas documentações inerentes ao programa de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Fabio Jatene e Dra. Rosangela Monteiro, membros do Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica LIM/61, onde despertei o interesse em pesquisa e conclui a minha iniciação científica. Ao Prof. Dr. Roberto Camargo, chefe do Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Experimental - LIM 26, onde iniciei na prática, a minha pós-graduação e aprendi as realidades da vida acadêmica.

Aos colegas Alcides Mosconi, Ricardo Vita e Marcelo Zerati pelo excelente convívio durante a pós-graduação.

Aos urologistas do Hospital Brigadeiro Giuseppe, Barbella, Pitelli, Crochik, Jose Augusto, Andriolo, Denarte, Lenzi, Jacob e Nelson Forjaz (*in memoriam*), pela

minha formação urológica, por estimularem o meu retorno à vida acadêmica e por me mostrarem que às vezes infortúnios têm o seu lado positivo.

Aos membros do Laboratório de Investigação em Patologia Hepática - LIM 14, Dr. Ibere e Prof. Dr. Venâncio pela colaboração na realização dos microarranjos teciduais. Aos colegas da Divisão de Anatomia Patológica Dras. Sheila, Fabíola e Cláudia pelo auxílio no estabelecimento da casuística do estudo.

Aos técnicos do laboratório de Anatomia patológica do Hospital Sírio Libanês Srs. Isaque Santana e Laisaque, e do Hospital das Clínicas Sra. Neiva pela ajuda na realização dos testes imuno-histoquímicos.

Ao Prof. Álvaro Sarkis e Dr. Leopoldo, que iniciaram esta linha de pesquisa em nosso laboratório, pelo apoio no início do meu projeto.

À minha família Inês, Roberta, Marcelo, Renata, Franklin, Marcela e Silvia, pelo amor que têm por mim e por estarem sempre presentes, torcendo e compartilhando todos os momentos.

Aos meus pais, Thereza Luiza e José Pontes, pela dedicação, esforço, ensinamentos e carinho a mim dedicados, vocês foram e são fundamentais na minha vida. A realização desta Tese de Doutorado é uma conquista nossa. Muito obrigado. Eu amo vocês.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed, São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1 Câncer de próstata	2
1.2 Moléculas de Adesão	7
1.2.1 Integrinas	8
1.2.2 E-caderina	13
1.2.3 Cateninas	15
2. Objetivos	18
3. Materiais e Métodos	20
3.1 Tumor primário	21
3.1.1 Pacientes	21
3.1.2 Microarranjo tecidual	23
3.1.3 Imuno-histoquímica	27
3.1.4 Análise estatística	30
3.2 Tumor metastático	31
3.2.1 Metástases linfonodais	31
3.2.1.1 Pacientes	31
3.2.1.2 Microarranjo tecidual	32

3.2.1.3 Imuno-histoquímica	33
3.2.1.4 Análise estatística	34
3.2.2 Metástases ósseas	34
3.2.2.1 Pacientes	34
3.2.2.2 Microarranjo tecidual	35
3.2.2.3 Imuno-histoquímica	36
3.2.2.4 Análise estatística	37
3.3 Ética	37
4. Resultados	38
4.1 Tumor primário	39
4.2 Metástases linfonodais	47
4.3 Metástases ósseas	51
4.4 Expressão das MAC de acordo com estagio do tumor	57
5. Discussão	58
6. Conclusões	77
7. Perspectivas	79
8. Referências	81
9. Publicações	94
10. Apresentação em Congressos	97
11. Prêmios	104

Lista de Abreviaturas

CaP – Câncer de Próstata

MAC – Moléculas de Adesão Celular

MEC – Matriz Extracelular

PSA – Antígeno Prostático Específico

TMA – Microarranjo Tecidual

IH – Imuno-histoquímica

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação das moléculas de adesão celular _____	9
Figura 2 – Possíveis combinações das subunidades α e β e suas respectivas proteínas da matriz _____	10
Figura 3 - Amostragem e inclusão no bloco receptor _____	24
Figura 4 - Bloco receptor do TMA contendo os cilindros com as amostras do tecido a ser estudado _____	25
Figura 5 - Etapas da confecção do TMA _____	25
Figura 6 - TMA com amostras de 111 espécimes de câncer de próstata clinicamente localizado _____	27
Figura 7- Exemplo de expressão ausente (A), fraca (B), moderada (C) e forte (D) da integrina $\alpha 3 \beta 1$ _____	29
Figura 8 - TMA contendo duas amostras do tumor primário e uma da metástase linfonodal para cada caso _____	33
Figura 9 - TMA contendo duas amostras de metástase óssea para cada caso _____	36
Figura 10 - Porcentagem de pacientes com expressão forte para cada molécula de adesão em 111 espécimes de câncer de próstata _____	40
Figura 11 - Expressão forte da integrina $\alpha 3$ _____	44
Figura 12 - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de $\alpha 3$ (a) e $\alpha 3 \beta 1$ (b) em 111 pacientes com câncer localizado de próstata submetidos à prostatectomia radical _____	46

Figura 13 - Tumor primário e metastático de mesmo paciente mostrando perda de expressão da integrina $\beta 4$ no linfonodo quando comparado à metástase _____50

Figura 14 - Tumor primário e metastático de mesmo paciente mostrando manutenção da expressão da β -catenina no linfonodo quando comparado à metástase _____51

Figura 15 - Metástase óssea de câncer de próstata mostrando expressão positiva para citoqueratina 18 _____52

Figura 16 - Número de pacientes com expressão forte para E-caderina e β -catenina no tumor primário e metástase óssea _____55

Figura 17 - Perda de expressão de E-caderina na progressão do tumor primário (a) para a metástase óssea (b) _____56

Figura 18: Perda de expressão de β -catenina na progressão do tumor primário (a) para a metástase óssea (b) _____56

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos do estudo caso controle de acordo com recorrência ou não do tumor após a cirurgia _____	22
Tabela 2 - Anticorpos empregados no estudo imunohistoquímico _____	28
Tabela 3 - Distribuição das expressões de acordo com recidiva _____	41
Tabela 4 - Análise bivariada da distribuição das expressões de acordo com a recidiva _____	43
Tabela 5 - Análise Multivariada _____	45
Tabela 6 – Imuno-expressão de E-caderina, cateninas e integrinas em 19 tumores primários e 17 metástases linfonodais de CaP _____	47
Tabela 7 - Análise pareada da expressão de MAC na metástase linfonodal comparado com o tumor primário em 17 pacientes _____	49
Tabela 8 - Imuno expressão de E-caderina, cateninas e integrinas em 28 metástases ósseas de câncer de próstata _____	53
Tabela 9 - Análise pareada da expressão por IH de E-caderina e β -catenina no tumor primário e na metástase óssea de câncer de próstata _____	55
Tabela 10: Porcentagem de pacientes com expressão forte para cada MAC de acordo com o sítio do tumor _____	57

Resumo

Pontes JR, J. Estudo de moléculas de adesão no tumor primário e em metástases ósseas e linfonodais de pacientes com câncer de próstata. 2009.106p.Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Objetivo: As moléculas de adesão celular (MAC) são essenciais para a manutenção do fenótipo epitelial. Alguns estudos têm relatado associação entre as alterações de sua expressão e a carcinogênese, mas o seu papel no câncer de próstata não é claro. Nosso objetivo foi estudar o perfil de expressão de E-caderina, cateninas e integrinas em espécimes cirúrgicos de câncer de próstata e associar as suas expressões com a evolução do tumor. Avaliamos também o perfil de expressão em metástases ósseas e linfonodais, a fim de compreender a influência destes marcadores na progressão do câncer de próstata.

Materiais e Métodos: Foram selecionados 111 pacientes com câncer de próstata localizado tratados com prostatectomia radical pelo mesmo cirurgião. Sessenta pacientes não apresentaram recidiva tumoral após acompanhamento médio de 123 meses. A expressão das MAC foi avaliada por imuno-histoquímica (IH) em microarranjo tecidual (TMA), contendo duas amostras de cada tumor. Empregamos análise semiquantitativa para avaliação da expressão e determinamos a associação entre a expressão de cada MAC com a recorrência do tumor após a cirurgia. Avaliamos também a expressão das MAC por IH em TMA contendo espécimes de 28 metástases ósseas e em outro TMA contendo 19 metástases linfonodais com seus 19 tumores primários correspondentes.

Resultados: Nos tumores primários a análise multivariada mostrou que a expressão das integrinas $\alpha 3$ e $\alpha 3\beta 1$ relaciona-se com recidiva da doença. Quando a expressão de $\alpha 3$ foi forte e a expressão de $\alpha 3\beta 1$ foi positiva, as chances de recorrência foram de 3,0 e 2,5 vezes maior. Apenas 19% e 28% dos pacientes estavam livres de recidiva após seguimento médio de 123 meses, quando os tumores apresentavam forte imunoexpressão de $\alpha 3$ ou positiva para $\alpha 3\beta 1$ respectivamente. Outras integrinas apresentaram expressão reduzida, exceto $\alpha 6$ que foi expressa pela maioria dos tumores primário e metástases. A E-Caderina e as cateninas não mostraram associação com o prognóstico no tumor de próstata localizado. No sítio metastático, houve perda global de expressão das MAC. Encontramos ganho de expressão com a progressão do câncer de próstata somente para a integrina $\alpha 3$ que mostrou forte expressão em metade das metástases ósseas e linfonodais. Encontramos forte expressão de β e γ -catenina foi em 94% dos linfonodos e 45% das metástases ósseas.

Conclusões: Nossos experimentos demonstram que a expressão das integrinas $\alpha 3$ e $\alpha 3\beta 1$ está independentemente associada à recidiva de câncer de próstata após prostatectomia radical, e que a perda das moléculas de adesão celular pode ser considerada uma característica da progressão desta neoplasia.

Descritores: moléculas de adesão celular, câncer de próstata, integrinas, caderinas, cateninas

Abstract

Pontes JR, J. Adhesion molecules in localized prostate cancer and in bone and lymph node metastases. 2009.106p.Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Purpose: Cell adhesion molecules (CAM) are essential for the maintenance of epithelial phenotype. Some studies have reported correlations between abnormalities in their expression and carcinogenesis, but their role in prostate cancer is unclear. Our aim was to study the expression profile of E-cadherin, catenins and integrins in surgical specimens of prostate cancer and associate their expression with outcome. We also assessed these expressions in bone and lymph node metastases in order to understand their influence in the progression of prostate cancer.

Materials and Methods: We selected 111 patients with localized prostate cancer who underwent radical prostatectomy performed by the same surgeon. Sixty patients had no tumor recurrence after a median follow-up of 123 months. The CAM expression was evaluated by immunohistochemistry in a tissue microarray (TMA) containing two samples of each tumor. A semiquantitative analysis was employed and we measured the association between the expression of CAM and tumor recurrence. We also evaluated CAM expression by immunohistochemistry in a TMA containing 28 bone metastases and in other TMA containing 19 lymph node metastases with their corresponding 19 primary tumors.

Results: In primary tumors, multivariate analysis showed that expression of $\alpha 3$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins was related to worse outcome. When $\alpha 3$ expression was strong and $\alpha 3\beta 1$ expression was positive, the odds of recurrence were 3.0 and 2.5 fold higher.

Only 19% and 28% of patients were recurrence-free in a mean follow up period of 123 months, when tumors showed strong $\alpha 3$ or positive $\alpha 3\beta 1$ immuno-expression respectively. Other integrins have shown reduced expression, except $\alpha 6$, which was expressed in most primary and metastatic cases. E-cadherin and catenins expressions were not associated with primary tumor outcome. At the metastatic setting, there was a global loss of CAM expression. We observed reliable gain of expression with prostate cancer progression only for integrin $\alpha 3$ that showed strong expression in half of bone and lymph node metastases. Interestingly, strong expression of β and γ -catenin was observed in 94% of lymph node and 45% of bone metastases.

Conclusions: We have demonstrated that the expression of integrins $\alpha 3$ and $\alpha 3\beta 1$ was independently associated with recurrence after radical prostatectomy. In addition, we have shown that the loss of cell adhesion molecules can be considered a characteristic of prostate cancer progression.

Descriptors: cell adhesion molecules, prostate cancer, integrins, cadherins, catenins

1. Introdução

1. Introdução

1.1 Câncer de Próstata (CaP)

O CaP é a neoplasia não cutânea mais freqüente na população masculina brasileira. Para 2010, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 52.350 novos casos da doença, correspondendo estes valores a um risco estimado de 54 casos novos a cada 100 mil homens sendo a segunda causa de óbito por câncer em homens perdendo apenas para o câncer de pulmão em número de óbitos (www.inca.gov.br). A incidência do CaP é maior nos países ocidentais que nos asiáticos provavelmente devido a condições genéticas e ambientais, principalmente alimentares, distintas entre os indivíduos (Parkin et al., 2001). A idade, o estilo de vida e a hereditariedade são os principais fatores de risco para esta neoplasia. Estudos mostram que a existência do tumor em indivíduos com menos de 40 anos é exceção; ocorrendo aumento de incidência após os 50 anos de idade (Giovannucci et al., 2007). O consumo energético elevado e a maior ingestão de carne vermelha e gordura animal tem sido também relacionado à maior chance de desenvolvimento do CaP.

A presença de antecedente familiar é fator de risco para o CaP; pai ou irmão com tumor aumenta o risco individual em 3 a 10 vezes, quando comparado à população geral (Crawford et al., 2003). No entanto, apenas cerca de 10-15% dos tumores de próstata diagnosticados são hereditários, os quais se caracterizam por diagnóstico em idade mais precoce quando comparados aos tumores esporádicos (Roehl et al., 2006).

Com o advento do antígeno específico prostático (PSA) e dos programas de rastreamento para diagnóstico precoce, houve uma mudança no estágio em que estes tumores eram diagnosticados, sendo atualmente mais frequentes os casos de tumor órgão confinado, passíveis de cura com o tratamento cirúrgico ou radioterápico, em contraposição à preponderância, no passado, de tumores localmente avançados.

Apesar da evolução dos métodos diagnósticos e, conseqüentemente, do aumento da detecção precoce, ainda resta para o urologista o desafio da definição exata do comportamento biológico do CaP, que é amplamente variável.

O comportamento heterogêneo do CaP é exemplificado pela história natural incerta, enquanto alguns têm evolução indolente e não necessitam de tratamento, outros apresentam doença agressiva, com progressão independente da forma de tratamento adotado. Infelizmente, na atualidade não existem testes que permitam distinção entre esses dois tipos diferentes de tumor.

As opções terapêuticas para o CaP localizado são a prostatectomia radical e a radioterapia, que na maioria dos casos curam o tumor órgão confinado. Entretanto, mesmo nesses casos localizados a recidiva da doença ocorre em cerca de 30 a 54% dos casos em 10 anos de seguimento (Potters et al., 2004, D'Amico et al., 1998). A recorrência tumoral pode decorrer de excisão local incompleta, do sub-estádio clínico, do crescimento de micrometástases pré-existentes ou mesmo da maior agressividade tumoral.

Assim sendo, qualquer parâmetro que possa refletir o potencial de malignidade é de decisiva importância no tratamento individualizado do CaP. A

identificação prévia dos pacientes com alto risco de recidiva possibilitaria o emprego precoce de tratamento adjuvante e com isso talvez melhorasse as taxas de cura do tumor, por isto a previsão acurada da probabilidade individual de recidiva e de sobrevida têm sido um dos maiores objetivos da pesquisa atual em CaP.

Parâmetros como estágio clínico e patológico, o escore de Gleason e os níveis séricos de PSA são, convencionalmente, utilizados como marcadores de prognóstico em pacientes com CaP (Partin et al., 1997, Partin et al., 2001). Apesar de valiosos, estes parâmetros são imperfeitos, especialmente em tumores de grau intermediário, onde estes fatores isoladamente têm menor poder preditivo.

O PSA é uma protease produzida no ácino prostático cuja função é a liquefação do sêmen, atuando assim no processo de fecundação. O CaP cursa com níveis elevados de PSA, e estes níveis correlacionam-se com maior estágio tumoral, escore de Gleason e pior prognóstico. Maior probabilidade de cura com a prostatectomia radical é observada em pacientes com níveis baixos de PSA, porém, o emprego isolado do PSA pré-operatório para estágio e, conseqüentemente, para definição da estratégia terapêutica, ainda é controverso, visto não ser um marcador específico do CaP. Outras patologias prostáticas como prostatite e hiperplasia benigna também podem causar elevação do PSA.

O estágio clínico é fator de prognóstico no CaP, porém a predição pré-operatória do estágio é limitada, pois os exames de imagem como ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética, comumente subestimam a extensão extracapsular do tumor (Moul et al., 2002), não sendo possível prever

com acurácia o estágio com o emprego dos métodos de imagem atualmente disponíveis. Quando consideramos o estágio anátomo patológico, observamos que este é forte preditor de progressão após cirurgia, sendo que 90% dos pacientes com doença órgão confinada (pT2) estão livres de recidiva bioquímica em um período de cinco anos(Scardino et al., 2002).

O grau de diferenciação histológica tumoral é estabelecido pela determinação do escore de Gleason que tem habilidade preditiva de agressividade da neoplasia. Resultados recentes de meta análise mostram que, a cada ano, 13% dos tumores de alto grau desenvolvem metástase óssea após tratamento local, enquanto somente 2% dos de baixo grau o fazem (Stamey et al., 1999).

A classificação de Gleason considera a arquitetura glandular do tumor e a sua relação com o estroma prostático caracterizando cinco padrões distintos, que variam do bem diferenciado 1 ao indiferenciado 5.

O escore de Gleason é dado pela soma dos dois padrões tumorais mais representativos da neoplasia. Os tumores com escore de Gleason entre 2 e 6 são considerados bem diferenciados e têm comportamento menos agressivo quando comparado aos tumores com escore de 7 a 10 que são considerados menos diferenciados (Gleason et al., 1992).

Entretanto, o emprego isolado do escore de Gleason para a tomada de decisão é insuficiente devido à subjetividade da avaliação do Gleason pelo patologista, aos inerentes erros de amostragem da biópsia pré-operatória e ao grande número de tumores de grau intermediário, o que, em conjunto, diminuem o poder preditivo isolado do escore de Gleason (Partin et al., 2001).

O volume tumoral é outro fator de prognóstico estabelecido no CaP, porém foi demonstrado que tumores com escore de Gleason maior do que 7, independente do volume, apresentam maior chance de progressão metastática, refletindo a incapacidade do volume tumoral na determinação prognóstica (Leite et al., 2005). Além disto, o emprego disseminado do PSA na prática clínica resultou em redução do volume tumoral médio dos tumores hoje em dia, reduzindo o poder desta variável quando comparado aos outros fatores de prognóstico.

É aceito que o valor prognóstico de qualquer critério isolado na previsão da progressão tumoral do CaP é limitado e, por isto, acredita-se que a análise combinada de variáveis clássicas pode significativamente melhorar a acurácia da avaliação prognóstica. Tabelas de probabilidade e nomogramas, baseados nos parâmetros clássicos como estágio, escore de Gleason e PSA foram construídos, e observou-se, com isto, melhora na predição do resultado após cirurgia ou radioterapia (Partin et al., 1997, Stephenson et al., 2006).

Ainda assim, a maior parte dos tumores localiza-se na zona intermediária (Gleason entre 5 e 7 e PSA menor que 20) de história natural imprevisível, onde a definição prognóstica é limitada mesmo com o uso de tabelas e nomogramas.

Pelas deficiências expostas, torna-se claro a necessidade de identificação de características morfológicas ou biológicas que identifiquem o potencial de progressão do CaP e que possibilitem a seleção individualizada do tratamento.

A pesquisa continua no sentido de estabelecer novos fatores prognósticos, e o enfoque principal tem sido dado ao estudo dos marcadores moleculares (Jonathan et al., 2007). O marcador de prognóstico ideal seria aquele com padrão

de expressão único nos tumores recorrentes ou metastáticos e que permitiria de antemão a identificação dos pacientes com pior prognóstico. Porém, até o momento, apesar da vasta pesquisa realizada, nenhum marcador mostrou-se capaz de prever adequadamente o comportamento biológico do adenocarcinoma de próstata (Lee et al., 1988, Mehta et al., 2001, Moul et al., 1996).

1.2 Moléculas de Adesão

A interação entre o epitélio e a matriz extracelular (MEC) é de fundamental importância no desenvolvimento normal da próstata, e influencia o crescimento, sobrevivência e diferenciação da célula epitelial prostática. As moléculas de adesão celular (MAC) participam desta interação e são responsáveis pela manutenção do fenótipo epitelial normal.

Supõe-se que alterações da adesão celular também têm papel importante no processo de oncogênese. Muitos aspectos da carcinogênese, como a invasão e disseminação à distância, que são assinaturas da malignidade, envolvem mudanças na adesão entre as células e na interação destas com a MEC, e esta tem sido uma das áreas mais estudadas em oncologia (Albelda et al., 1993).

O processo de oncogênese é caracterizado por uma sequência de eventos; na primeira fase, a neoangiogênese deve ser induzida pela célula neoplásica no sítio primário para que a nutrição do tumor seja garantida. A seguir, essas células devem degradar e remodelar a membrana basal, desconectar-se do tumor

primário, alcançar os vasos sanguíneos, sobreviver na circulação e por fim aderir ao sítio a distância.

Alterações na adesão e na motilidade da célula tumoral são necessárias para que ocorra o conjunto de eventos da carcinogênese, a perda de adesão seguida pela aquisição de receptores com propriedades migratórias e invasivas são mecanismos comuns no desenvolvimento do câncer. Essencialmente, células com maior adesividade têm menor potencial metastático, enquanto que uma menor adesão torna possível a disseminação das células neoplásicas. A maior motilidade e menor adesão são acompanhadas por mudanças na expressão das MAC, especialmente das integrinas e do complexo caderina-cateninas (Stewart et al., 2004).

De fato, as integrinas têm sido implicadas como um dos principais participantes destes eventos por mediar, além da adesão intercelular, a interação célula-matriz extracelular. Atualmente são conhecidas cerca de 50 moléculas de adesão que estão divididas em quatro famílias: integrinas, caderinas, selectinas e Imunoglobulinas.

1.2.1 Integrinas

A expressão das MAC é um processo dinâmico, onde as alterações da adesão e motilidade celular são acompanhadas por mudanças de expressão de receptores de adesão, em especial ao da família das integrinas.

As integrinas são glicoproteínas transmembrana que atuam como receptores que regulam as interações célula-célula e célula-matriz, funcionando como sensores do ambiente. Elas são formadas por heterodímeros compostos por uma subunidade α e uma β (Figura 1).

Figura 1. Representação das moléculas de adesão celular e das proteínas da MEC

mudanças de expressão resultam em alterações na adesão e motilidade celular, porém os mecanismos que levam a essas alterações ainda são desconhecidos.

As integrinas possuem várias funções na homeostase celular, atuam como moléculas de adesão ao promover a ligação entre células adjacentes e destas com as proteínas da MEC. Sua importância na adesão celular pode ser exemplificada pela participação da integrina $\alpha 6 \beta 4$ no hemidesmossomo, uma estrutura que bloqueia a migração celular por promover a adesão firme entre as células.

Como receptores, as integrinas medeiam a ancoragem e a migração das células através de reconhecimento de diferentes moléculas da MEC (Holly et al., 2000). Além disso, sinais intracelulares gerados pelas integrinas influenciam a expressão gênica e, portanto, regulam o crescimento, a proliferação e sobrevivência celular (Slack-Davis et al., 2004, Aplin et al., 1998).

No tecido normal, as células epiteliais da glândula prostática apresentam expressão forte e homogênea de várias integrinas, incluindo $\alpha 2$ a $\alpha 6$, αv , $\beta 1$ e $\beta 4$.

A habilidade da célula tumoral prostática em crescer e invadir depende de interações com outras células e com a MEC, e estas interações são parcialmente mediadas pelas integrinas, cuja ação influencia a adesão, motilidade, sinalização e expressão gênica da célula neoplásica (Plantelhaber et al., 1989). Para que ocorra a migração e invasão é necessário o desligamento da adesão, mediada pela integrina, com a matriz, sendo observado que as células neoplásicas frequentemente apresentam alterações na expressão destas MAC. De fato, alterações na expressão de algumas integrinas têm sido implicadas em muitos

aspectos da tumorigênese no CaP (Slack-davis et al., 2004), fazendo delas potenciais marcadores de prognóstico neste tumor.

Estudo em linhagens celulares de tumores de próstata sugeriu, por exemplo, que $\alpha v\beta 3$ está associada a maior potencial metastático (Witkowski et al, 1993). Acredita-se que integrina $\alpha v\beta 3$ direciona a metástase para o osso por mediar a adesão da célula tumoral à vitronectina e osteopontina, duas proteínas predominantes do microambiente da matriz óssea.

As células da linhagem PC3 aderem fortemente ao colágeno tipo I, um dos maiores componentes da matriz óssea, na presença de TGF- β , um fator de crescimento presente em altos níveis na matriz. Essa interação é mediada pelas integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$, sugerindo talvez que essas combinações, junto com $\alpha v\beta 3$, também favoreçam o direcionamento preferencial da metástase para o osso (Kostenuik et al., 1997).

Apesar da existência de investigações prévias sobre a expressão de integrinas no CaP (Cress et al., 1995, Knox et al., 1994, Goel et al., 2008), até o presente momento não existem estudos focados no estabelecimento de uma associação entre a expressão das integrinas e o prognóstico do CaP localizado.

Além disto, a maior parte das observações sobre a expressão das integrinas no CaP avançado provém na sua maioria de estudos *in vitro*, provavelmente devido a pouca disponibilidade de tumores metastáticos. Portanto, são necessários estudos *in vivo* para confirmar ou não os resultados *in vitro* previamente descritos, e para que o padrão de expressão das integrinas em metástases de CaP seja estabelecido.

1.2.2 E-Caderina

A E-caderina é uma glicoproteína transmembrana dependente de cálcio com papel importante na adesão intercelular. Sua terminação intracelular é ancorada ao citoesqueleto pelo complexo α , β , e γ catenina, enquanto sua porção extracelular se conecta com a E-caderina da célula adjacente. Sua presença é de vital importância para a manutenção da adesão celular e do fenótipo epitelial normal, estando expressa na maioria dos epitélios normais.

A invasão dos tecidos e o desenvolvimento de metástases requerem a perda de adesão intercelular, por isto o estudo da disfunção do complexo E-caderina - catenina tem sido de especial interesse em oncologia (Kemler et al., 1993). A perda de expressão da E-caderina interfere na adesão intercelular e na integridade do epitélio, facilita a invasão do estroma e da microvasculatura pelas células tumorais e possibilita a disseminação do tumor à distância e o estabelecimento de metástases.

A diminuição ou completa perda da expressão de E-caderina têm sido descrita em vários tumores sólidos como mama, pâncreas, rim, fígado, tireóide, cólon, estômago e ovário, existindo uma relação direta entre a redução de expressão e perda de diferenciação, maior potencial invasivo e metastático, maior estágio clínico e menor sobrevida dos pacientes o que a qualifica como potencial marcador de prognóstico nestes tumores.

No CaP a diminuição da expressão de E-caderina tem sido descrita em até 50% dos tumores primários, e parece estar associada a estágio avançado e pior

evolução (Brussel et al., 1999, Girolodi et al., 1993). Cheng (1996) estudou a expressão da E-caderina através de IH em 53 pacientes com CaP e observou que a expressão estava diminuída ou ausente em 77% dos tumores de Gleason 8 a 10 e presente em 85% dos tumores bem diferenciados confirmando a hipótese de que a perda de E-caderina seja importante na oncogênese.

O mecanismo responsável pela diminuição da expressão do gene da E-caderina na carcinogênese ainda não foi completamente esclarecido. Dentre as possibilidades, destacam-se a perda de heterozigose, mutação, polimorfismos, deleção ou metilação da região promotora. A hipermetilação das ilhas CpG da região promotora do gene com a conseqüente inibição da sua transcrição vem sendo proposta como um dos principais mecanismos responsáveis pela perda desta MAC (Li et al., 2001, Woodson et al., 2003, Graff et al., 1995).

Apesar da perda de E-caderina ser aceita como evento comum no CaP ainda há controvérsia sobre o seu papel como fator preditor de recorrência após tratamento local, porque poucos estudos abordaram este aspecto e estes apresentaram resultados conflitantes (Umbas et al., 1994 Wu et al., 2003), não sendo possível classificar a E-caderina como marcador de prognóstico no CaP localizado.

O desenvolvimento de metástases no CaP constitui um passo crítico da doença e uma causa importante de morbidade, sendo observado na história natural deste tumor que a maioria dos pacientes que morrem pelo câncer apresentam metástase (Whitmore et al., 1984).

Se a perda de expressão da E-caderina no tumor primário é marcador de potencial metastático, é de se esperar que as metástases apresentem também menor expressão do marcador, e isto foi demonstrado em dois estudos que avaliaram metástases linfonodais e ósseas por CaP (Cheng et al., 1996, Bryden et al., 2002).

Em contradição a estes achados, outros autores evidenciaram maior expressão de E-caderina nas metástases (DeMarzo et al., 1999, Saha et al., 2008), concluindo que embora a perda de expressão da E-caderina no tumor primário esteja associada à maior agressividade, no sítio metastático ocorreria a re-expressão da proteína. A existência de resultados contrários faz permanecer a controvérsia sobre a existência, ou não, da re-expressão da E-caderina com a progressão do CaP.

Em resumo, os estudos que avaliaram o comportamento da E-caderina no CaP contam com pequena casuística, poucos avaliaram a expressão no tumor primário como preditor de recorrência e raramente compararam a expressão na doença primária com a metastática.

1.2.3 Cateninas

As cateninas alfa, beta e gama consistem em grupo de proteínas intracelulares que intermedeiam o contato entre o citoesqueleto e as caderinas na membrana celular. No epitélio normal a E-caderina liga-se diretamente às

cateninas β e γ , enquanto que a α -catenina é o elo de ligação entre a E-caderina e a actina do citoesqueleto (Figura 2).

Conforme exposto, a β -Catenina normalmente localiza-se junto à membrana citoplasmática e atua na adesão celular formando complexo com a E-caderina, porém ao se translocar para o núcleo ela age também como transdutor de sinal promovendo a transcrição de genes associados à proliferação celular, tendo um papel mais complexo na oncogênese (Barker et al., 2000). Perda de expressão na membrana e aumento de expressão no núcleo e citoplasma tem-se correlacionado a maior escore de Gleason, havendo nesses casos comumente co-redução de expressão de E-Caderina e β -catenina na membrana (Jaggi et al., 2005, Kallakury et al., 2001a, Wang et al., 2000).

A perda das cateninas, do mesmo modo que para a E-caderina, altera a adesão intercelular e interfere na manutenção do fenótipo epitelial, sendo também estudadas como marcadores de prognóstico em oncologia. Alguns estudos mostraram correlação entre a perda de expressão das cateninas e fenótipo agressivo no CaP (Jaggi et al., 2005, Morita et al., 1999, Kallakury et al., 2001a) e apenas um mostrou correlação entre a expressão das cateninas com pior evolução do CaP após cirurgia (van Oort et al., 2007).

Embora seja aceito que a as cateninas tenham papel na oncogênese do CaP, ainda está para ser determinado o papel das cateninas como marcadores de prognóstico no tumor localizado submetido a tratamento curativo, devido à pequena quantidade de estudos que tenham abordado o assunto.

Em relação ao papel das cateninas com a progressão do CaP para doença metastática, os estudos realizados limitaram-se a avaliar a expressão da β -catenina e os resultados encontrados foram conflitantes. Alguns mostraram perda (Bryden et al., 2002)., enquanto outros evidenciaram maior expressão de β -catenina com a progressão do tumor para a metástase (Saha et al., 2008), criando-se uma controvérsia semelhante à postulada para E-caderina, ou seja, a existência ou não da re-expressão da proteína com a progressão do tumor.

Baseado nos dados acima, conclui-se que o papel das cateninas, especialmente da α e γ -cateninas, na progressão do CaP ainda não é claro, sendo necessários estudos *in vivo* para que seja determinado o papel destas MAC nesta neoplasia.

2. Objetivos

2 Objetivos

Objetivo primário

Analisar a expressão da E-caderina, cateninas e integrinas por imunohistoquímica em tumores de próstata clinicamente localizados submetidos à prostatectomia radical e correlacionar a expressão com a presença de recidiva bioquímica em seguimento de dez anos.

Objetivo secundário

Analisar o perfil de expressão dessas moléculas de adesão por imunohistoquímica em série de pacientes com metástases ósseas e linfonodais de CaP, comparando a expressão da metástase com o respectivo tumor primário.

Analisar a alteração de expressão das moléculas de adesão de acordo com a progressão do CaP, do tumor primário, para a metástase linfonodal e para a metástase óssea.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Tumores primários

Para a análise do papel das MAC como fator de prognóstico, realizamos um estudo caso-controle onde associamos a expressão destas moléculas com recidiva bioquímica pós cirurgia.

3.1.1 Pacientes

Avaliamos retrospectivamente 954 pacientes com CaP localizado tratados com prostatectomia radical com intenção curativa entre janeiro de 1994 e abril de 2000, todas realizadas pelo Prof. Miguel Srougi (MS).

Os critérios de inclusão foram: i. seguimento pós operatório de pelo menos 10 anos nos casos que não apresentaram recorrência bioquímica, ii. disponibilidade e adequação dos blocos de parafina, iii. assinatura do termo de consentimento.

Após respeitados os critérios de inclusão, restaram 111 casos que formam a casuística de nosso estudo, que consistiu de 51 casos com recorrência do tumor após a cirurgia e 60 controles sem recidiva da neoplasia após seguimento médio de 123 meses. A recorrência tumoral foi definida pela presença de nível sérico de PSA acima de 0,4 ng/mL no seguimento. O estadiamento empregado foi o sistema tumor-linfonodo-metástase de acordo com a classificação TNM 2002.

Os pacientes e controles foram pareados de acordo com os critérios de estratificação de risco D'Amico (D'Amico et al., 1998), a qual divide os pacientes

em grupos de risco de recidiva alto, intermediário e baixo, através da avaliação conjunta do escore de Gleason, PSA e estágio clínico. O grupo de baixo risco compreende aqueles pacientes com PSA < 10ng/ml, escore de Gleason < 7 e estágio clínico até T2a; o grupo intermediário engloba os pacientes com PSA entre 10 e 20ng/ml, escore de Gleason 7 e estágio clínico T2b enquanto o grupo de alto risco é representado pelos pacientes que apresentam níveis séricos de PSA > 20ng/ml ou escore de Gleason > 7 ou ainda estágio clínico > T2b.

Os dados clínicos e demográficos foram obtidos através de análise de prontuários e estão representados na Tabela 1. Observa-se que os grupos são similares em termos de estratificação do risco ($p=0.266$), confirmando a homogeneidade do nosso estudo caso-controle.

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos do estudo caso controle de acordo com recorrência ou não do tumor após a cirurgia

	Recorrência (n=51)	Não recorrência (n=60)	valor p
Idade (anos)			0.687
Mediana (Q1 – Q3)	65 (60 – 68)	65 (60 – 69)	
Mínimo - Máximo	45 – 74	41 – 79	
PSA_{pre} (ng/mL)			0.004
Mediana (Q1 – Q3)	9.3 (7.6 – 14.2)	7.6 (4.9 – 10.1)	
Mínimo - Máximo	4.2 – 45.0	1.2 – 38.0	
Estadio patológico			0.521
T2	41 (80.4%)	51 (85.0%)	
T3	10 (19.6%)	9 (15.0%)	
Gleason			0.061
≤6	9 (17.6%)	20 (33.3%)	
≥7	42 (82.4%)	40 (66.7%)	
Risco			0.266
Baixo	6 (11.8%)	10 (16.7%)	
Intermediário	15 (29.4%)	24 (40.0%)	
Alto	30 (58.8%)	26 (43.3%)	

3.1.2 Microarranjo tecidual

A expressão das MAC foi avaliada através de IH pela técnica de microarranjo tecidual ou “tissue microarray” (TMA). O TMA é uma coleção organizada de amostras teciduais dispostas sob a forma de uma matriz, onde cada amostra é suficientemente grande para ser representativa, e convenientemente pequena para permitir o uso não predatório do bloco doador, permitindo utilização racional dos reagentes a serem aplicados na amostra em condições experimentais homogêneas. A principal vantagem do TMA reside na análise simultânea de vários cortes histológicos arranjados em apenas uma lâmina.

O primeiro passo da confecção do TMA é a separação dos blocos de parafina contendo o CaP e sua respectiva lâmina corada em hematoxilina-eosina. A lâmina é analisada em microscópio óptico para localização e marcação da área representativa do tumor a ser amostrada. Por justaposição da lâmina com o respectivo bloco, marca-se neste último a área de interesse (bloco doador).

A seguir, emprega-se aparelho específico que através de agulha coleta pequena amostra de tecido da área marcada do bloco de parafina doador e o insere no bloco receptor. Em nosso estudo empregamos um sistema mecanizado de precisão da marca Beecher que coleta cilindros de 1mm de diâmetro e os insere no bloco receptor em intervalos de 0,3mm (Figura 3).

Figura 3. Amostragem e inclusão no bloco receptor

O procedimento é repetido para cada paciente até que no final do procedimento centenas de espécimes estarão representados no bloco receptor (Figura 4). Cada cilindro amostral é alocado numa posição do bloco receptor definida em um sistema cartesiano de coordenadas, e o conjunto das amostras constitui o que se denomina de TMA (Moch et al., 1999).

Figura 4. Bloco receptor do TMA contendo os cilindros com as amostras do tecido a ser estudado

Uma vez pronto, o bloco do TMA é cortado em secções histológicas numeradas e consecutivas de 3 μm . Na sequência as lâminas são preparadas de acordo com a técnica a ser adotada, seja coloração hematoxilina-eosina, imunohistoquímica ou testes de hibridização. Na figura 5 mostramos as etapas de construção do TMA.

Figura 5. Etapas da confecção do TMA

A realização de reações de IH em lâminas com TMA permite a avaliação da expressão de uma proteína em inúmeros casos em uma única reação, o que confere homogeneidade a avaliação, uma vez que todos os espécimes foram preparados e avaliados em condição idêntica. Outras vantagens do método são a rapidez na análise de múltiplos casos, economia de reagentes, praticidade e uso não predatório do material evitando o desgaste e com isso permitindo o uso em outras pesquisas.

As desvantagens são a representação ausente ou inadequada, especialmente quando se trata de neoplasia heterogênea. Importante lembrar que a avaliação é limitada em relação a um caso específico, já que o método é voltado ao estudo de populações. Embora não haja consenso sobre o número ideal de fragmentos amostrados, recomenda-se comumente a coleta de mais de um fragmento por caso, no intuito de menor perda de casos e maior representatividade (Hoos et al., 2001). Optamos por duas amostras por paciente, pois é comprovado que a análise IH de duas amostras em TMA é comparável ao observado na secção tecidual em 95% das vezes (Camp et al., 2000).

Em nosso estudo, as lâminas e os blocos de parafina respectivos contendo o tumor primário de cada um dos 111 pacientes foram selecionados, considerando-se as áreas que melhor representavam a totalidade do tumor. Amostramos dois fragmentos de 1mm de diâmetro por caso, e para isto duas áreas de cada tumor foram selecionadas e os blocos doadores marcados com tinta permanente, e estas áreas foram incluídas no TMA (Figura 6).

Figura 6. TMA com amostras de 111 espécimes de câncer de próstata clinicamente localizado.

No final, o TMA construído apresentava 13 linhas, 18 colunas e continha 224 posições (222 amostras de 111 casos, sendo representadas 02 amostras por caso). Nos casos onde houve perda das duas amostras no TMA, confeccionamos lâmina convencional a partir de cortes do mesmo bloco doador marcado previamente para o TMA.

3.1.3 Imuno-histoquímica

As amostras foram submetidas à recuperação antigênica pelo calor utilizando tampão citrato (1 mM, pH 6,0) e aquecidas por 30 minutos em panela de pressão elétrica. As lâminas foram incubadas por uma noite a 4º C, com os anticorpos monoclonais especificados na Tabela 2. O sistema LSAB foi utilizado para a imunocoloração (LSAB; Dako Cytomation, CA, E.U.A.). A coloração foi

desenvolvida por uma solução substrato-cromógena 3,3'-diaminobenzidina, seguida por contracoloração com hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas, montadas com lamínulas e observadas em microscópio óptico.

Tabela 2. Anticorpos empregados no estudo imuno-histoquímico

Anticorpo	Fabricante	Diluição
$\alpha 2\beta 3a$	Calbiochem (San Diego CA, EUA)	1:100
αv	Calbiochem (San Diego CA, EUA)	1:2000
$\alpha 3\beta 1$	Chemicon (Temecula CA, EUA)	1:100
$\alpha 3$	Chemicon (Temecula CA, EUA)	1:100
$\beta 4$	Chemicon (Temecula CA, EUA)	1:100
$\alpha 6$	Abcam (Cambridge, MA, EUA)	1:200
$\alpha v\beta 3$	Abcam (Cambridge, MA, EUA)	1:50
$\alpha 2\beta 1$	Chemicon (Temecula CA, EUA)	1:100
E-cadherin	Dako Cytomation, CA, EUA	1:50
β -catenin	BD (San Jose, CA, EUA)	1:50
γ -catenin	Zymed (San Francisco, CA, EUA)	1:100
α -catenin	Santa Cruz (CA, EUA)	1:100

A expressão de cada anticorpo foi avaliada pela mesma patologista Dra. Katia R. M. Leite. Realizamos análise semiquantitativa para todos os anticorpos, sendo que a expressão das MAC foi dividida em quatro grupos, de acordo com a maior intensidade da coloração das duas amostras: ausente, fraca: +, moderado: ++ e forte: +++ (Figura 7), conforme descrito por outros autores (Lourenço et. al, 2004, Saha et. al, 2008).

Figura 7. Exemplo de expressão ausente (A), fraca (B), moderada (C) e forte (D) da integrina $\alpha 3\beta 1$.

Avaliamos a associação entre a recidiva e a expressão de cada MAC por análise univariada e multivariada, para desta forma definir se a expressão de determinado marcador estava associada a maior risco de recorrência bioquímica após tratamento cirúrgico do CaP clinicamente localizado.

3.1.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa 16,0 SPSS para Windows (versão 16/02). Os testes de Mann-Whitney, qui-quadrado de Pearson e Exato de Fisher foram utilizados para explorar as associações bivariadas entre a recorrência tumoral e outras co-variáveis contínuas e categóricas.

A aproximação do risco de associação entre a expressão de uma integrina e a recidiva tumoral foi estimada pelo odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) utilizando análise de regressão logística incondicional. As variáveis com $p < 0,20$ na análise bivariada ou em risco de associação foram ajustadas na análise de regressão logística multivariada incondicional.

Para as MAC com perfil de expressão com resultados significativos no risco de associação, curvas de Kaplan-Meier foram realizadas para ilustrar a sobrevida livre de doença e o teste log-rank para mostrar as diferenças entre as curvas.

3.2 Tumor metastático

Para melhor compreensão do papel das MAC no processo de carcinogênese do CaP, analisamos a expressão destas moléculas em série de casos de metástases ósseas e linfonodais, e comparamos, quando possível, a expressão da MAC do tumor primário com a sua respectiva metástase.

3.2.1 Metástases linfonodais

3.2.1.1 Pacientes

Entre março de 1997 e julho de 2006, 1619 pacientes com CaP clinicamente localizado foram submetidos à prostatectomia radical e linfadenectomia ilíaca pelo mesmo cirurgião (MS). Em 19 casos foi incidentalmente encontrado metástase nos linfonodos obturatórios ressecados e todos foram selecionados para este estudo.

A idade média dos pacientes foi de 66 anos e o seguimento médio de 3,4 anos. Em seis casos, não havia nenhuma informação sobre tratamento prévio à cirurgia ou dados sobre o seguimento pós operatório. Entre os treze casos restantes, nenhum recebeu radioterapia ou quimioterapia e um foi submetido à hormonioterapia previamente à prostatectomia.

O nível sérico do PSA estava disponível em todos os casos, o valor médio do PSA foi de 11,9 ng/mL e a mediana de 8,8 ng/mL, variando de 4,6 a 44,0 ng/mL. O escore de Gleason dos espécimes cirúrgicos era 10 em três casos, 9 em

dez casos, 8 em cinco casos e 7 em um caso. O estágio patológico foi T3b em 16 casos e T2c em um caso. O volume tumoral médio foi de 45cm^3 e a mediana do volume tumoral de 36cm^3 , variando de 7 a 100cm^3 . Estes achados em conjunto classificam o paciente como portador de CaP com alto risco de recorrência com o tratamento local.

Após a cirurgia, 12 de 13 pacientes iniciaram hormonioterapia adjuvante por causa da metástase linfonodal, e apenas um evoluiu para estado hormônio-refratário. O único paciente que não recebeu hormonioterapia não apresentou recidiva bioquímica após seguimento de 3,5anos. Nenhum paciente evoluiu para óbito durante provavelmente devido ao tempo de seguimento curto, o que associado ao fato da recidiva só ter sido observada em um caso, torna inexequível análise das sobrevidas livre de recorrência bioquímica, câncer específica ou geral.

3.2.1.2 Microarranjo tecidual

Para a construção do TMA selecionamos as lâminas e os blocos de parafina contendo a metástase e o tumor primário para cada um dos 19 pacientes, considerando se a área mais representativa do tumor. Uma área da metástase e duas do tumor primário foram selecionadas e marcadas com tinta permanente, e estas regiões correspondem àquelas que foram incluídas no TMA (Figura 8), que foi confeccionado da forma descrita no item 3.1.2. O TMA resultante apresentava 7 linhas, 9 colunas e continha 57 posições (57 amostras de 19 casos, com 3 amostras por caso).

Figura 8. TMA contendo duas amostras do tumor primário e uma da metástase linfonodal para cada caso.

3.2.1.3 Imuno-histoquímica

A reação imuno-histoquímica foi realizada conforme descrito no item 3.1.3. Os anticorpos monoclonais empregados e suas respectivas diluições estão representados na Tabela 2. A expressão de cada marcador no tumor primário e na metástase foi avaliada conforme 3.1.3. Classificamos a expressão como forte se a positividade para o marcador era +++ na maioria das células ou reduzida para as demais intensidades de coloração, conforme descrito por outros autores (DeMarzo et al., 1999, Rubin et al., 2001, Davis et al., Morita et al., 1999, Saha et al., 2008).

Comparamos a expressão das MAC na metástase com o respectivo tumor primário, no intuito de avaliarmos maior ou menor expressão das MAC com a progressão da neoplasia. Para esta análise consideramos qualquer grau de perda e ganho da expressão.

3.2.1.4 Análise estatística

Para analisar as diferenças de expressão das MAC no sítio primário e metastático foi empregado o Teste Exato de Fisher.

3.2.2 Metástases ósseas

3.2.1.1 Pacientes

Avaliamos retrospectivamente todos os laudos de anátomo patológico realizados no Instituto de Ortopedia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP cujo resultado evidenciava metástase óssea por adenocarcinoma de próstata entre 1968 e 2007. Encontramos vinte e oito pacientes com metástases ósseas submetidos à cirurgia para tratamento de eventos ósseos secundários às metástases e todos foram incluídos neste estudo.

Os dados clínicos foram coletados retrospectivamente. A idade média dos pacientes foi de 67,3 anos, com mediana de 70 anos, variando de 43 a 87 anos. As metástases ósseas estavam localizadas no fêmur (16), íliaco (2), vértebra (6), escápula (2), úmero (1) e osso púbis (1) .

Dos 28 casos, onze pacientes tiveram o evento ósseo como o primeiro sinal do CaP e não receberam nenhuma terapia até o evento ósseo, oito casos estavam em tratamento hormonioterápico e para os nove pacientes restantes não havia informação disponível sobre tratamento prévio.

O nível sérico do PSA foi recuperado do prontuário em sete pacientes, e como esperado o valor médio foi de 553 ng/mL, e a mediana de 100 ng/mL, variando de 32 a 2140 ng/mL. Análise de sobrevida foi impossível, pois a maioria dos pacientes não fez seguimento no Hospital das Clínicas após o diagnóstico da metástase óssea,

Em seis dos 28 casos, obtivemos os blocos de parafina contendo o tumor primário que consistia em espécime de prostatectomia radical em um caso e produtos de biópsia de próstata nos cinco casos restantes. O escore de Gleason dos seis pacientes era 6 em um caso, 7 em dois casos, 8 em um caso e 9 nos dois casos restantes.

3.2.2.2 Microarranjo tecidual

Para a construção da TMA selecionamos as lâminas e os respectivos blocos de parafina contendo a metástase óssea dos 28 pacientes, considerando-se a área mais representativa do tumor. Duas áreas de cada metástase óssea foram selecionadas e marcadas com tinta permanente, e estas regiões correspondem àquelas que foram incluídas no TMA (figura 9), que foi confeccionado da forma descrita no item 3.1.2. No final, o TMA construído apresentava 7 linhas, 8 colunas e continha 56 posições (56 amostras de 28 casos, com 02 amostras por caso).

Não foi possível a inclusão das amostras dos seis tumores primários no mesmo TMA, pois cinco eram produtos de biópsia por agulha o que dificultou a

amostragem do cilindro do bloco doador e também porque os fragmentos com o tumor eram de pequena dimensão. Foi então optado por confecção de lâminas convencionais para a realização de análise IH para E-caderina e β -catenina, visto a controvérsia sobre a maior expressão das MAC na progressão do CaP recair principalmente sobre estes dois marcadores.

Figure 9. TMA contendo duas amostras de metástase óssea para cada caso.

3.2.2.3 Imuno-histoquímica

O tecido ósseo com a metástase foi fixado em formalina a 10% por 24 horas e submetido à descalcificação com ácido nítrico a 7% por tempo que variou de 12 a 24 horas. A seguir, as amostras foram lavadas em solução de sulfato de sódio, processadas e incluídas na parafina de forma rotineira, e a reação IH realizada conforme descrito no item 3.1.3.

Os anticorpos monoclonais e suas respectivas diluições estão na Tabela 2. A expressão de cada marcador no tumor primário e na metástase óssea foi avaliada semiquantitativamente pelo mesmo patologista e classificada da mesma forma que o empregado para as metástases linfonodais (vide item 3.2.1.3).

Para confirmar a preservação antigênica após a descalcificação do espécime ósseo, realizamos também a análise IH da expressão da citoqueratina 18 e de PSA nas vinte e oito metástases.

Além de avaliarmos a expressão das MAC nas 28 metástases ósseas, comparamos a expressão da E-caderina e β -catenina em 6 metástases ósseas pareadas com os respectivos 6 tumores primários, no intuito de avaliarmos maior ou menor expressão das MAC com a progressão do CaP. O nosso intuito com esta análise é especialmente comprovar, ou não, a maior expressão da E-caderina e β -catenina na metástase óssea quando comparado com o tumor primário.

3.2.2.4 Análise estatística

Para analisar as diferenças de expressão das MAC no sítio primário e metastático foi empregado o Teste Exato de Fisher.

3.3 Ética

Todas as amostras deste estudo foram codificadas para a garantia da confidencialidade. Este projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisas do Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da USP, sendo aprovado sob o processo nº 1074/04.

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Tumores primários

A perda de amostras nos diversos cortes do TMA avaliados variou de 7 a 12%, e nos casos onde o material restante era suficiente foram confeccionadas lâminas isoladas para recuperação dos dados.

De acordo com a tabela 3 nota-se que o número final de casos sem resultado por marcador variou de 0 a 7 casos, o que denota perda final aceitável em nossa análise.

Observamos diminuição global na intensidade de expressão das integrinas para a maioria dos pacientes. A exceção foi $\alpha 6$, que mostrou forte expressão em 99% dos tumores (Figura 10).

Em relação ao complexo E-caderina-cateninas, encontramos expressão forte para E-caderina na maioria dos tumores primários (77%)

Na análise de expressão das cateninas, nota-se expressão intermediária da α -catenina e redução importante da γ e β -cateninas, que apresentaram expressão forte em apenas 18 e 8% dos tumores primários, respectivamente.

Figura 10. Porcentagem de pacientes com expressão forte para cada molécula de adesão em 111 espécimes de câncer de próstata.

Associamos a expressão de cada MAC com a recorrência bioquímica após a cirurgia e os resultados são apresentados na Tabela 3, onde observa-se que a maior expressão da integrina $\alpha 3$ foi relacionada a maior chance de recidiva do tumor ($p=0,004$). Também encontramos significância estatística marginal para as integrinas $\alpha 3 \beta 1$ e $\alpha 2 \beta 3 a$, que foram mais fortemente expressas em tumores recorrentes ($p=0,063$ e $p=0,088$, respectivamente).

Tabela 3. Distribuição das expressões de acordo com recidiva.

	Com Recidiva (n=51)	Sem Recidiva (n=60)	p-valor
E-caderina^a			0,395 [#]
Ausente	1 (2,0%)	-	
+	4 (8,2%)	4 (7,0%)	
++	9 (18,4%)	6 (10,5%)	
+++	35 (71,4%)	47 (82,5%)	
B-catenina^b			0,623 [#]
Ausente	30 (61,2%)	40 (71,4%)	
+	8 (16,4%)	6 (10,7%)	
++	6 (12,2%)	7 (12,5%)	
+++	5 (10,2%)	3 (5,4%)	
α-catenina^c			0,749 [#]
Ausente	4 (8,0%)	3 (5,2%)	
+	4 (8,0%)	8 (13,8%)	
++	20 (40,0%)	24 (41,4%)	
+++	22 (44,0%)	23 (39,6%)	
α-v^d			0,632 ^{##}
Ausente	14 (28,0%)	14 (24,5%)	
+	11 (22,0%)	19 (33,3%)	
++	12 (24,0%)	12 (21,1%)	
+++	13 (26,0%)	12 (21,1%)	
α3β1^e			0,063 ^{##}
Ausente	18 (36,7%)	35 (60,4%)	
+	17 (34,7%)	13 (22,4%)	
++	9 (18,4%)	4 (6,9%)	
+++	5 (10,2%)	6 (10,3%)	
α3^f			0,004 [#]
Ausente	-	7 (11,9%)	
+	7 (14,3%)	12 (20,3%)	
++	19 (38,8%)	28 (47,5%)	
+++	23 (46,9%)	12 (20,3%)	

a. 2 pacientes Com Recidiva e 3 pacientes Sem Recidiva sem informação.

b. 2 pacientes Com Recidiva e 4 pacientes Sem Recidiva sem informação.

c. 1 paciente Com Recidiva e 2 pacientes Sem Recidiva sem informação.

d. 1 paciente Com Recidiva e 3 pacientes Sem Recidiva sem informação.

e. 2 pacientes Com Recidiva e 2 pacientes Sem Recidiva sem informação.

f. 2 pacientes Com Recidiva e 1 paciente Sem Recidiva sem informação.

g. 1 paciente Com Recidiva e 1 paciente Sem Recidiva sem informação.

h. 3 pacientes Com Recidiva e 4 pacientes Sem Recidiva sem informação.

i. 4 pacientes Com Recidiva e 1 paciente Sem Recidiva sem informação.

Generalização do Teste Exato de Fisher / ## Qui-Quadrado / ### Teste Exato de Fisher

Tabela 3 (cont.). Distribuição das expressões de acordo com recidiva.

	Com Recidiva (n=51)	Sem Recidiva (n=60)	p-valor
$\beta 4^b$			0,383 ^{##}
Ausente	13 (26,5%)	24 (42,8%)	
+	17 (34,7%)	15 (26,8%)	
++	8 (16,3%)	7 (12,5%)	
+++	11 (22,5%)	10 (17,9%)	
$\alpha 6^g$			0,459 ^{###}
Ausente	1 (2,0%)	-	
+	-	-	
++	-	-	
+++	49 (98,0%)	59 (100,0%)	
$\alpha v \beta 3^h$			0,478 [#]
Ausente	12 (25,0%)	14 (25,0%)	
+	5 (10,4%)	12 (21,4%)	
++	11 (22,9%)	10 (17,9%)	
+++	20 (41,7%)	20 (35,7%)	
$\alpha 2 \beta 1^c$			0,354 [#]
Ausente	12 (24,0%)	23 (39,6%)	
+	18 (36,0%)	15 (25,9%)	
++	8 (16,0%)	9 (15,5%)	
+++	12 (24,0%)	11 (19,0%)	
$\alpha 2 \beta 3a^c$			0,088 [#]
Ausente	4 (8,5%)	3 (5,1%)	
+	9 (19,2%)	14 (23,7%)	
++	15 (31,9%)	30 (50,9%)	
+++	19 (40,4%)	12 (20,3%)	
$\gamma catenina$			0,301 ^{##}
Ausente	12 (23,5%)	18 (30,0%)	
+	21 (41,2%)	15 (25,0%)	
++	9 (17,7%)	16 (26,7%)	
+++	9 (17,7%)	11 (18,3%)	

a. 2 pacientes Com Recidiva e 3 pacientes Sem Recidiva sem informação.

b. 2 pacientes Com Recidiva e 4 pacientes Sem Recidiva sem informação.

c. 1 paciente Com Recidiva e 2 pacientes Sem Recidiva sem informação.

d. 1 paciente Com Recidiva e 3 pacientes Sem Recidiva sem informação.

e. 2 pacientes Com Recidiva e 2 pacientes Sem Recidiva sem informação.

f. 2 pacientes Com Recidiva e 1 paciente Sem Recidiva sem informação.

g. 1 paciente Com Recidiva e 1 paciente Sem Recidiva sem informação.

h. 3 pacientes Com Recidiva e 4 pacientes Sem Recidiva sem informação.

i. 4 pacientes Com Recidiva e 1 paciente Sem Recidiva sem informação.

Generalização do Teste Exato de Fisher / ## Qui-Quadrado / ### Teste Exato de Fisher

Para descrever a associação entre os padrões de expressão destas três integrinas com a recorrência tumoral, realizamos análises de partição com o teste qui-quadrado, e os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Análise bivariada da distribuição das expressões de acordo com a recidiva

	Recidiva (n=51)	Sem recidiva (n=60)	OR [95% IC]	p
$\alpha 3\beta 1$				0.015
Negativo	18 (36.7%)	35 (60.3%)	1.000	
Positivo	31 (63.3%)	23 (39.7%)	2.621 [1.197 – 5.738]	
$\alpha 2\beta 3a$				0.024
Reduzido	28 (59.6%)	47 (79.7%)	1.000	
Forte	19 (40.4%)	12 (20.3%)	2.658 [1.124 – 6.287]	
$\alpha 3$				0.003
Reduzido	26 (53.1%)	47 (79.7%)	1.000	
Forte	23 (46.9%)	12 (20.3%)	3.465 [1.486 – 8.078]	

Para a integrina $\alpha 3\beta 1$ observamos maior porcentagem de pacientes com expressão positiva, independente da intensidade, nos casos (63,3%) quando comparado aos controles (39,7%), isto permitiu classificar a expressão desta integrina como positiva ou negativa. Deste modo, nós observamos que a chance de recorrência em pacientes com expressão positiva foi três vezes maior do que em pacientes com expressão negativa ($p=0,015$).

Para as integrinas $\alpha 2\beta 3a$ e $\alpha 3$, observou-se que a expressão forte apresentou associação com a recorrência tumoral. A recorrência foi observada em 40% e 47% dos pacientes que apresentavam expressão forte para $\alpha 2\beta 3a$ e $\alpha 3$ respectivamente, sendo as chances de recidiva 3 e 3,5 vezes maior do que a observada em pacientes com a expressão reduzida ($p=0,024$ e $p=0,003$).

A análise multivariada incluindo PSA, escore de Gleason, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 2\beta 3a$ e $\alpha 3$ demonstrou que apenas PSA, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 3$ permaneceram independentemente associados a recidiva, conforme demonstrado na Tabela 5. Pacientes com expressão positiva de $\alpha 3\beta 1$ ou expressão forte de $\alpha 3$ tinham, respectivamente, 2,5 e 3 vezes mais chance de recorrência, em comparação com pacientes sem esses níveis de expressão. Um exemplo de caso com forte expressão para integrina $\alpha 3$ está representado na Figura 11.

Figura 11. Expressão forte da integrina $\alpha 3$

Tabela 5. Análise Multivariada

	<i>OR</i>	<i>95% IC</i>	<i>p</i>
PSA (ng/mL)	1.081	1.016 – 1.149	0.014
$\alpha 3\beta 1$ (Positivo x Negativo)	2.478	1.042 – 5.894	0.040
$\alpha 3$ (Forte x Reduzido)	3.023	1.223 – 7.472	0.017

Foram construídas curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com as expressões das integrinas $\alpha 3$ e $\alpha 3\beta 1$ (Figura 12); 12 anos após a cirurgia, 58% dos pacientes com expressão reduzida e apenas 19% daqueles com expressão forte de $\alpha 3$ estavam livres de recorrência ($p=0,004$). A curva para $\alpha 3\beta 1$ demonstrou que 60% e 28% dos pacientes com expressão positiva e negativa, respectivamente, estavam livres de recorrência 12 anos após a prostatectomia radical ($p=0,019$).

Figura 12. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de $\alpha 3$ (a) e $\alpha 3\beta 1$ (b) em 111 pacientes com câncer localizado de próstata submetidos à prostatectomia radical.

4.2 Metástases linfonodais

A perda de casos nos diversos cortes do TMA avaliados variou de 7 a 14%, sendo que nos casos onde havia material suficiente confeccionamos lâminas isoladas para recuperação dos dados. No final a análise IH foi impossível de ser realizada na metástase linfonodal apenas em dois pacientes, devido à escassez do tecido tumoral na lesão metastática. Os resultados da expressão das integrinas, cateninas e E-caderina nos 19 tumores primários e nas 17 metástases linfonodais estão na tabela 6.

Tabela 6. Porcentagem de pacientes com forte imuno expressão de E-caderina, cateninas e integrinas em 19 tumores primários e 17 metástases linfonodais

	tumor primário (%)	linfonodal (%)	p valor
$\alpha 3$	32	53	0,311
E-caderina	11	29	0,219
γ -catenina	5	12	0,593
$\alpha 3\beta 1$	32	6	0,092
αv	0	0	-
$\beta 4$	16	6	0,605
$\alpha 2\beta 1$	0	0	-
β -catenina	100	94	0,472
$\alpha 6$	100	100	-
$\alpha v\beta 3$	0	0	-
α -catenina	11	6	>0,999
$\alpha 2\beta 3a$	21	6	0,342

No tumor primário αv , $\alpha v\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 2\beta 3a$ e as cateninas γ e α tiveram expressão reduzida na maioria dos casos, e resultado semelhante foi observado no linfonodo para os mesmos marcadores. Em contraste, β -catenina e $\alpha 6$ mostraram forte expressão em todos os tumores primários e na maioria dos linfonodos.

As integrinas $\alpha 3$ e $\alpha 3\beta 1$ mostraram forte expressão em um terço dos tumores primários e em 29% e 6% dos linfonodos respectivamente. A expressão da E-caderina e da integrina $\beta 4$ era forte em 11% e 16% dos tumores primários e em 29% e 6% das metástases.

Na maioria dos casos, a expressão das MAC era menor no linfonodo do que no tumor primário, entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa para nenhum marcador. Interessantemente, notamos diferença marginal na expressão entre os dois sítios para a integrina $\alpha 3\beta 1$ ($p=0,09$).

Realizamos a análise pareada nos 17 casos onde dispúnhamos de amostra do tumor primário e sua respectiva metástase linfonodal e os resultados estão na tabela 7.

Tabela 7. Análise pareada da expressão de MAC na metástase linfonodal comparado com o tumor primário em 17 pacientes.

	<i>Ganho</i> <i>(%)</i>	<i>Perda</i> <i>(%)</i>
$\alpha 3$	35	18
E-caderina	29	65
γ-catenina	18	23
$\alpha 3\beta 1$	12	53
Av	6	59
$\beta 4$	6	71
$\alpha 2\beta 1$	6	29
β-catenina	0	6
$\alpha 6$	0	0
$\alpha v\beta 3$	0	47
α-catenina	40	60
$\alpha 2\beta 3a$	40	53

Comparando a metástase com o respectivo tumor primário, caso a caso, encontramos perda consistente de expressão com a progressão do tumor para o linfonodo para E-caderina, $\beta 4$, αv , α -catenina, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 2\beta 3a$. A figura 13 mostra um exemplo de caso pareado com perda de expressão de $\beta 4$ na metástase quando comparado com o tumor primário.

Figura 13. Tumor primário e metastático de mesmo paciente mostrando perda de expressão da integrina $\beta 4$ no linfonodo quando comparado à metástase. a) tumor primário (esquerda) e metástase linfonodal (direita). b) tumor primário c) metástase linfonodal

Para a β -catenina e integrina $\alpha 6$ observamos manutenção da expressão forte em ambos os sítios na maioria dos casos, na figura 14 exemplificamos um caso de manutenção de expressão de β -catenina nos dois sítios. A integrina $\alpha 2\beta 1$ e a γ -catenina tenderam a redução de expressão em ambos os locais. Ganho consistente de expressão com a progressão para a metástase foi observado apenas para a integrina $\alpha 3$, que ocorreu em cerca de um terço dos pacientes.

Figura 14. Tumor primário e metastático de mesmo paciente mostrando manutenção da expressão da β -catenina no linfonodo quando comparado à metástase. a) tumor primário (esquerda) e metástase linfonodal (direita) b) tumor primário c) metástase linfonodal

4.3 Metástases ósseas

Conforme sabemos, a citoqueratina 18 é expressa pela célula epitelial normal e por grande número de neoplasias, sendo por isto empregada em nossa

pesquisa como método confirmatório da preservação antigênica após o processo de descalcificação. Em nossa casuística, a expressão por IH da citoqueratina 18 foi fortemente positiva e difusa em todos os casos, confirmando a preservação do antígeno, na figura 15 mostramos exemplo de expressão positiva.

Figura 15. Metástase óssea de câncer de próstata mostrando expressão positiva para citoqueratina 18

A perda de casos nos diversos cortes do TMA contendo as metástases ósseas variou de 16 a 21,4%, sendo que nos casos onde havia material suficiente confeccionamos lâminas isoladas para recuperação dos dados, priorizando a análise para E-caderina e β -catenina. Não realizamos a expressão por IH da integrina $\alpha 6$ por dificuldades técnicas.

A análise IH de E-caderina e β -catenina foi possível em todas as metástases ósseas, para o restante das MAC não foi possível a análise em todos

os casos pela exiguidade do tecido existente nos blocos de parafina. Os resultados da expressão das integrinas, cateninas e E-caderina nas metástases ósseas estão na tabela 8.

Tabela 8. Imuno expressão de E-caderina, cateninas e integrinas em 28 metástases ósseas de câncer de próstata

	Total de Casos Avaliados	Expressão Metástase Óssea (%)	
		Forte	Reduzido
$\alpha 3$	22	48	52
E-caderina	28	14	86
γ -catenina	22	45	55
$\alpha 3\beta 1$	22	0	100
αv	22	24	76
$\beta 4$	23	4	96
$\alpha 2\beta 1$	23	0	100
β -catenina	28	18	82
α -catenina	26	0	100
$\alpha v\beta 3$	22	0	100
$\alpha 2\beta 3a$	23	13	87
$\alpha 6$	NA	NA	NA

NA: não avaliado

Nota se que a expressão de E-caderina e β -catenina encontrava se reduzida na grande maioria dos casos, Ausência de expressão para E-caderina e

β -catenina foi observada em 14 (50%) e 16 (57%) metástases respectivamente. Observamos expressão nuclear para β -catenina em apenas dois casos.

Observamos também redução importante na intensidade da expressão das integrinas na metástase óssea. Chama a atenção a expressão da integrina $\alpha 3$ que mostrou se forte em metade dos casos, semelhante ao observado nas metástases linfonodais.

Em relação às cateninas, ocorreu expressão intermediária de γ -catenina e perda acentuada da expressão da α -catenina, nenhuma metástase apresentou expressão forte desta MAC

Comparamos a expressão na metástase com o respectivo tumor primário para a E-caderina e β -catenina nos seis casos em que dispúnhamos das amostras pareadas e o resultado, junto com o escore de Gleason está na tabela 9.

Encontramos maior porcentagem de expressão forte para ambos os marcadores no tumor primário quando comparado com a metástase (figura 16), sendo interessante notar que nenhum caso apresentou expressão maior na metástase quando comparado ao tumor primário.

Tabela 9. Análise pareada da expressão por IH de E-caderina e β -catenina no tumor primário e na metástase óssea de câncer de próstata

	<i>Gleason</i>	<i>E-caderina</i>		<i>β-catenina</i>	
		Tumor Primário	Metástase Óssea	Tumor Primário	Metástase Óssea
1	4+3	forte	reduzida	reduzida	reduzida
2	5+4	forte	reduzida	reduzida	reduzida
3	3+3	forte	forte	forte	reduzida
4	4+4	reduzida	reduzida	reduzida	reduzida
5	3+4	forte	reduzida	forte	forte
6	5+4	forte	reduzida	forte	reduzida

Figura 16. Número de pacientes com expressão forte para E-caderina e β -catenina no tumor primário e metástase óssea

Nas figuras 17 e 18 mostramos exemplo de perda de expressão de E-caderina e β -catenina em caso pareado.

Figura 17. Perda de expressão de E-caderina na progressão do tumor primário (a) para a metástase óssea (b).

Figura 18. Perda de expressão de β -catenina na progressão do tumor primário (a) para a metástase óssea (b).

4.3 Expressão das moléculas de adesão de acordo com a progressão

Analizamos a expressão das MAC nos três estágios de progressão do CaP, estando representada na tabela 10 a porcentagem de pacientes com expressão forte para cada marcador em 111 tumores primários, 17 metástases linfonodais e 28 metástases ósseas.

Tabela 10. Porcentagem de pacientes com expressão forte para cada MAC de acordo com o sítio do tumor

	<i>Tumor Primário (%)</i>	<i>Metástase linfonodal (%)</i>	<i>Metástase óssea (%)</i>	<i>p-valor</i>
n	111	17	28	
$\alpha 3$	32	53	48	0,173
E-caderina	77	29	14	<0,001
γ-catenina	18	12	45	0,016
$\alpha 3\beta 1$	10	6	0	0,329
αv	23	0	24	0,053
$\beta 4$	20	6	4	0,109
$\alpha 2\beta 1$	21	0	0	0,003
β-catenina	8	94	18	<0,001
α-catenina	39	6	0	<0,001
$\alpha v\beta 3$	38	0	0	<0,001
$\alpha 2\beta 3a$	29	6	13	0,044
$\alpha 6$	99	100	NA	>0,999

5. Discussão

5. Discussão

Associamos a expressão das MAC com o prognóstico do CaP localizado em pacientes submetidos à cirurgia com seguimento de 10 anos e pela primeira vez demonstramos que as expressões por IH dos anticorpos anti integrinas $\alpha 3$ e $\alpha 3\beta 1$ têm importância prognóstica e pode identificar os pacientes com maior risco de recorrência bioquímica após a cirurgia.

A introdução do PSA na prática clínica tornou possível o diagnóstico do CaP em fase inicial, fato que aumentou as chances de cura com a prostatectomia radical. No entanto, 20 a 30% dos pacientes apresentam recidiva bioquímica após a cirurgia e comumente recebem outras abordagens terapêuticas como a radioterapia, porém nesta situação a taxa de sobrevivência livre de doença diminui consideravelmente (Potters et al., 2004, D'Amico et al., 1998).

Argumenta-se que a identificação prévia dos pacientes que sofrerão recidiva antes que ocorra a recorrência bioquímica possibilitaria o emprego do tratamento adjuvante em momento precoce, provavelmente melhorando o sucesso desta intervenção. Por este motivo, o conhecimento dos fatores que contribuem para o prognóstico do CaP é de primordial importância.

O estabelecimento de biomarcadores que reflitam funções biológicas cruciais na oncogênese, tais como ciclo celular, adesão e motilidade celular permitiriam melhor avaliação prognóstica. E existe a suspeita de que alterações na expressão das MAC estejam relacionadas a esses eventos.

Alterações na expressão de MAC foram descritas no CaP (Goel et al., 2008, Albelda et al., 1993), porém os eventos moleculares responsáveis por essas mudanças e suas consequências ainda permanecem incertos. Adicionalmente, ainda não foi estabelecido se a expressão das MAC é fator de prognóstico no CaP.

Em nossa série de CaP localizado encontramos redução global da expressão das integrinas no tumor primário corroborando estudos anteriores que mostraram perda de expressão de MAC na neoplasia prostática (Cress et al., 1995 Knox et al., 1994, Goel et al., 2008). A exceção foi a integrina $\alpha 6$ que foi expressa na maioria dos tumores.

O achado de maior expressão da integrina $\alpha 6$ em nosso estudo confirma os achados de Bonkhoff (1993), que por IH encontrou maior expressão da integrina $\alpha 6$ em 33 espécimes de prostatectomia e em 10 metástases linfonodais. Outros estudos indicaram que a expressão da integrina $\alpha 6$ estava relacionada com migração, disseminação e invasão do tumor (Knox et al., 1994, Rabinovitz et al., 1995). Além disso, o CaP normalmente metastatiza para ossos e linfonodos, locais ricos em lamininas 10 e 11 (cujo receptor é a integrina $\alpha 6\beta 1$), portanto, a retenção de $\alpha 6$, segundo estes estudos, desempenharia um papel relevante na determinação do sítio preferencial de metástases do CaP.

A expressão positiva e forte da integrina $\alpha 6$ observada em quase todos os 111 tumores primários e 19 metástases linfonodais de nossa casuística ($p > 0,999$), corrobora a hipótese de que a manutenção da expressão da integrina $\alpha 6$ é uma característica da progressão do CaP.

Inversamente, encontramos perda da expressão da integrina $\beta 4$ com a progressão do tumor, expressão forte para esta subunidade foi encontrada em 20% dos tumores primários, 6% das metástases linfonodais e em apenas 4% das metástases ósseas. Também, na série pareada de tumor primário com a sua metástase linfonodal, esta integrina apresentou perda de expressão em 71% dos pacientes, sendo a maior perda observada com a progressão dentre todas as integrinas avaliadas.

A perda de $\beta 4$ já havia sido descrita em estudos com linhagens celulares de CaP e também em pequenas séries de tumor primário. Nagle et al (1995), por exemplo, avaliaram 39 espécimes cirúrgicos de CaP e observaram que a perda de $\beta 4$ estava associada à não visualização do hemidesmossomo na microscopia eletrônica, confirmando que a perda desta integrina é característica deste tumor, porém faltavam dados sobre a expressão desta subunidade em tecido metastático.

Está estabelecido que $\alpha 6$ forma heterodímeros com as subunidades $\beta 1$ e $\beta 4$, e que ambos ligam-se à laminina da MEC. Na próstata normal e na neoplasia intra epitelial, a subunidade $\beta 4$ é o par dominante para a subunidade $\alpha 6$, resultando na integrina $\alpha 6\beta 4$ (Davis et al., 2001). Esta última é uma MAC essencial para a manutenção da adesão e do fenótipo epitelial normal, uma vez que é necessária para a formação do hemidesmossomo, uma estrutura que age como um freio da migração celular (Allen et al., 1998). A perda desta estrutura proporcionaria menor adesão elevando o potencial de invasão e metastatização da célula tumoral.

Propomos que durante a progressão do CaP, a perda de $\beta 4$ levaria ao pareamento preferencial da $\alpha 6$ com a subunidade $\beta 1$, resultando na integrina $\alpha 6\beta 1$, que ao contrário da $\alpha 6\beta 4$, promove apenas contato focal.

A mudança de $\alpha 6\beta 4$ para $\alpha 6\beta 1$ teria consequências no fenótipo da célula, o que é exemplificado pela interação estática promovida pela $\alpha 6\beta 4$ na linhagem hormônio sensível LNCaP comparado com a maior mobilidade associada com a expressão da integrina $\alpha 6\beta 1$ na linhagem de CaP altamente agressiva denominada C4-2 (Edlund et al., 2001).

Na linhagem LNCaP, a integrina $\alpha 6\beta 4$ seria importante para a manutenção da adesão e restrição da migração, enquanto que as integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$, ambas envolvidas na formação de contato focal e dinâmico, seriam importantes para a migração da célula tumoral (Rabinovitz et al., 1995).

Nossos dados mostrando consistente manutenção da expressão de $\alpha 6$ e perda de $\beta 4$ com a disseminação do tumor sugerem que estes eventos estejam relacionados com a progressão do CaP, confirmando os resultados prévios observados em linhagens celulares e tumores primários (Edlund et al., 2001, Davis et al., 2001).

Ainda em relação à expressão das integrinas, observamos de acordo com a tabela 10, que dentre as oito integrinas avaliadas, seis apresentaram tendência de redução da expressão com a progressão do tumor para o linfonodo e na sequência para a metástase óssea. A confirmação destas perdas no tecido metastático tem importância, pois até agora as hipóteses propostas sobre o papel

das integrinas na progressão era baseado apenas em dados de linhagens celulares de CaP.

Uma segunda exceção à redução global de expressão das MAC é a integrina $\alpha 3$ que mostrou aumento de positividade tanto na metástase óssea quanto na linfonodal. Cerca de metade dos pacientes com doença metastática, óssea ou linfonodal, apresentou expressão forte para este marcador.

Ao realizarmos a análise pareada do tumor primário com a sua respectiva metástase linfonodal, notamos ganho de expressão no linfonodo em 35% dos pacientes, constituindo a maior porcentagem de ganho de expressão dentre todas as integrinas nesta situação. Estes dados de maior expressão com a progressão sugerem que a integrina $\alpha 3$ talvez tenha um papel na progressão do CaP.

Reforçando essa hipótese, observamos na associação entre a expressão de integrinas com recorrência do tumor primário localizado após cirurgia, que $\alpha 3$ e $\alpha 3\beta 1$ foram as únicas integrinas cuja expressão estava associada com recorrência na análise multivariada, o que corrobora a importância da subunidade $\alpha 3$ nesta neoplasia.

O papel funcional da integrina $\alpha 3$ ainda é pouco compreendido e os dados sobre a influência desta integrina na oncogênese é contraditório. Um estudo relatou que a redução da expressão estava relacionada à histologia indiferenciada, metástases linfonodais e baixa sobrevida livre de doença no câncer de cólon (Hashida et al., 2002). Inversamente, existe estudo *in vitro* em câncer renal (Oertl et al., 2006) e dados *in vivo* sobre carcinomas de células escamosas oral

mostrando forte correlação positiva entre a expressão da integrina $\alpha 3$ e metástases linfonodais (Nagata et al., 2003).

No CaP há informações limitadas em relação à expressão da integrina $\alpha 3$, Schmelz e cols. observaram positividade para $\alpha 3$ e $\alpha 6$ de 54 e 70%, respectivamente, em 56 espécimes de prostatectomia radical, e observaram correlação inversa do escore de Gleason com a expressão de $\alpha 3$ e $\alpha 6$ (Schmelz et al., 2002).

Não há demonstração prévia de correlação entre expressão de integrinas com recorrência tumoral no CaP, sendo inédita a demonstração de que a forte expressão da integrina $\alpha 3$ aumenta em três vezes a chance de recidiva após prostatectomia radical, sugerindo que a integrina $\alpha 3$ é potencial marcador de prognóstico neste tumor.

Embora nossos resultados indiquem um papel importante para a integrina $\alpha 3$, é importante salientar que nenhuma subunidade alfa existe isoladamente, estando sempre associada a uma subunidade beta na formação do heterodímero de integrina.

A demonstração de expressão positiva da integrina $\beta 1$ em estudo que avaliou a expressão das integrinas no CaP (Knox et al., 1994), associado a demonstração de níveis semelhantes de $\alpha 3$ e $\beta 1$ em estudo com quatro linhagens celulares de CaP (Bello-DeCampo et al., 2001), corroboram os dados da literatura que mostram que a subunidade $\alpha 3$ associa-se exclusivamente com a integrina $\beta 1$, resultando na integrina $\alpha 3\beta 1$.

Nossos achados, mostrando que a expressão da integrina $\alpha 3 \beta 1$ também está associada com recorrência, apóiam a hipótese do pareamento exclusivo das subunidades $\alpha 3$ e $\beta 1$. Portanto, quando indicamos que a imuno-expressão dos anticorpos anti $\alpha 3$ e $\alpha 3 \beta 1$ está independentemente associada com a recorrência bioquímica, isto significa que a integrina $\alpha 3 \beta 1$ está associada com a recidiva do CaP.

Segundo a literatura, o pareamento de $\alpha 3$ e $\beta 1$ parece estar relacionado a maior agressividade tumoral (Melchiori et al., 1995, Bartolazzi et al., 1994), o que pode ser explicado pela somatória do prognóstico negativo relacionado à expressão de $\alpha 3$ combinada à reconhecida influência da subunidade $\beta 1$ no potencial metastático de células cancerígenas, conforme observado nos estudos que avaliaram esta subunidade no CaP (Murant et al., 1997).

A integrina $\alpha 3 \beta 1$ conecta-se a vários ligantes, incluindo colágeno, laminina, fibronectina e epiligrina, e embora ela interaja com uma ampla gama de proteínas da MEC, suas propriedades adesivas são fracas quando comparadas com outras integrinas, tais como $\alpha 6 \beta 4$. Consequentemente, a expressão da integrina $\alpha 3 \beta 1$ teria como resultado a modificação da adesão celular, permitindo a migração e invasão tecidual (Edlund et al., 2001).

De acordo com nossos resultados, apesar da forte positividade da integrina $\alpha 3 \beta 1$ estar presente em apenas 10% dos casos avaliados, qualquer positividade foi independentemente associada à recidiva tumoral, indicando um papel potencial desta integrina como marcador de prognóstico no CaP. Acreditamos que a expressão de $\alpha 3 \beta 1$ positiva é importante na promoção da motilidade celular e

disseminação do CaP, como também demonstrado em outras neoplasias (Fukushima et al., 1998, Giannelli et al., 2002).

Em concordância com nossa hipótese, Melchiori e cols. (1995) demonstraram que a expressão de $\alpha 3\beta 1$ facilitou a invasão e migração de linhagens celulares de melanoma, e definiu as suas propriedades como receptor de migração e invasão ao invés de receptor de adesão.

Existem poucos dados disponíveis (na maioria, *in vitro*) sobre a expressão da integrina $\alpha 3\beta 1$ no CaP, e aqueles que existem demonstram resultados similares. Rabinovitz avaliou a expressão das integrinas em LNCAP, tipo particular de linhagem de CaP hormônio sensível, e postulou que as expressões das integrinas $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ eram importantes para a migração celular (Rabinovitz et al., 1995).

A adequada interação entre a E-caderina e as cateninas é igualmente importante para manutenção da integridade do epitélio glandular e do fenótipo benigno (Kemler et al., 1993), sendo esperado que a disfunção desta interação colabore na oncogênese. A perda da E-caderina resultaria em alteração da adesividade da célula epitelial e facilitaria a invasão do estroma, migração e disseminação do tumor à distância, sendo teoricamente um candidato a marcador de prognóstico em diversas neoplasias (Otto et al., 1993).

A perda de E-caderina pode também ser vista como uma alteração participante do fenômeno da transição epitélio-mesenquimal observado em diversas neoplasias, inclusive no CaP (Ke et al., 2008).

A transição epitélio-mesenquimal consiste em programa biológico necessário para a aquisição de características malignas pelas células epiteliais neoplásicas e está relacionada à perda da adesão celular. Este fenômeno é caracterizado pela perda do fenótipo epitelial normal e surgimento de condição de arranjo celular frouxo, mesenquimal, que apresenta maior potencial de migração, sendo considerado um passo essencial no processo de metastatização.

Em nossa série de tumores primários notamos que a expressão de E-caderina era mantida em 77% dos 111 tumores primários, ocorrendo porém redução significativa da expressão com a progressão da neoplasia ($p < 0,001$). Apenas 29 e 14% dos pacientes com metástase linfonodal e óssea respectivamente apresentavam forte expressão de E-caderina, sendo concluído que a perda de expressão de E-caderina é uma característica da progressão do CaP, o que fez com que outros autores, ao encontrarem observação semelhante, considerassem a E-caderina um gene supressor (Visakorpi et al., 2003).

Alguns autores, apesar de concordarem que a redução da expressão da E-caderina no tumor primário seja importante para a invasão e disseminação da neoplasia, postulam que para ocorrer a colonização e o crescimento das metástases à distância, seria necessária a re-expressão da E-caderina para níveis maiores do que o observado no tumor primário (DeMarzo et al., 1999, Saha et al., 2008). Esta hipótese torna-se factível se acreditarmos que a perda de expressão ocorre de forma temporária através de um mecanismo epigenético reversível, como por exemplo a hipermetilação da área promotora do gene.

Rubin et al. (2001), concordando com a teoria da re-expressão, mostraram expressão forte e homogênea de E-caderina em 9 de 10 metástases ósseas; porém é importante salientar que todos os pacientes deste estudo receberam hormonioterapia previamente ao surgimento de metástases o que artefactualmente interfere na interpretação do escore de Gleason e aumenta a expressão de E-caderina, α e β cateninas, conforme demonstrado por Patriarca et al. (2003) em 20 tumores de próstata após tratamento hormonal.

A existência de estudos com resultados contrários, a pequena casuística de parte dos estudos que sugerem maior expressão com a progressão somada à não realização da análise pareada do tecido primário com a respectiva metástase formam a crítica à teoria da re-expressão. No mesmo sentido, não encontramos ganho de expressão em nenhum caso na análise pareada de seis metástases ósseas e observamos perda de expressão em 65% dos casos na análise pareada de 17 metástases linfonodais. Em concordância com nossos achados, dois estudos avaliaram a expressão de E-caderina em 14 metástases linfonodais (Cheng et al., 1996) e 14 metástases ósseas pareadas com seus respectivos tumores primários (Bryden et al., 2002), e ambos encontraram perda de expressão de E-caderina na progressão para a metástase em todos os casos avaliados.

Nossos resultados, em conjunto, contradizem a hipótese da re-expressão e o ponto forte é que a nossa casuística constitui-se no maior estudo sobre expressão de E-caderina em metástase óssea. Outro aspecto importante é que a positividade imuno-histoquímica para citoqueratina e PSA em todos os casos de

nossa análise assegura a preservação do antígeno após o processo de descalcificação, conferindo solidez aos nossos achados.

Interessante notar que, ao avaliarmos os tumores primários dos pacientes com metástase linfonodal, ou seja, em estágio mais avançado, vemos pela tabela 6 que apenas 11% destes apresentavam expressão forte, o que contrasta com os 77% apresentados pelos primários em estágio localizado, o que indica que a perda de expressão de E-caderina seja evento tardio na oncogênese do CaP.

A hipótese de que a perda de E-caderina seja característica da progressão do CaP também ganha força quando percebemos que a expressão de E-caderina nos 111 tumores primários, em estágio precoce, não mostrou ser preditor de recidiva tumoral após a prostatectomia radical, sinalizando que nos estágios iniciais do CaP, a E-caderina não tem papel fundamental no desenvolvimento do tumor.

Existem relatos contraditórios na literatura em relação ao papel da E-caderina como fator preditor de recorrência após cirurgia. Umbas (1994) notou correlação entre a perda de expressão por IH com maior estágio patológico e recidiva bioquímica em 89 pacientes submetidos a prostatectomia radical. Resultados similares com a mesma metodologia foram obtidos por outros autores (Wu et al., 2003, De Marzo et al., 1999).

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

Os resultados díspares somados ao que encontramos em nossa casuística, não permitem, por enquanto a adoção da expressão desta MAC como marcador de prognóstico no CaP localizado.

Sobre o mecanismo responsável pela perda de expressão, acreditamos que a hipermetilação da área promotora do gene tenha um papel importante na perda da E-caderina no CaP.

O nosso grupo estudou, através de microdissecção, 35 espécimes de CaP e observou hipermetilação da área promotora de E-caderina em 70% dos casos de alto grau versus 33% em tumores de baixo grau, e mostrou correlação destes resultados com os achados na imuno-histoquímica (IH). Concluimos que a metilação do gene da E-caderina é comum no CaP de alto grau, que a intensidade da metilação correlaciona-se com a agressividade tumoral e que a função supressora da E-caderina é comprometida por metilação da área promotora de seu gene (Li et al., 2001).

As cateninas são MAC que também atuam na manutenção da integridade epitelial e a perda de sua expressão interfere na adesão intercelular, mesmo se a E-caderina estiver presente, influenciando na carcinogênese. Por isto o estudo em conjunto do padrão de expressão das cateninas e caderinas é importante, sendo a β -catenina a mais estudada no CaP, que conforme exposto, é uma MAC que além de atuar na adesão tem papel na proliferação celular.

Perda de expressão de β -catenina correlacionou-se a maior escore de Gleason e estágio em 112 tumores primários localizados submetidos à cirurgia em estudo conduzido por Kallakury et al.,(2001b). Morita et al. (1999) avaliaram 45

espécimes de prostatectomia radical e também encontraram correlação entre menor expressão das três cateninas com indiferenciação do tumor e invasão da cápsula da próstata pelo câncer. De acordo com estes dados, a perda de β -catenina por estar associada a maior estágio e escore de Gleason teoricamente deveria aumentar a chance de recorrência do tumor após tratamento.

No entanto, em nossa série, apesar de encontramos perda acentuada de expressão de β -catenina no tumor primário, tal expressão não se mostrou preditora de recorrência. Da mesma forma, o estudo realizado por Morita et al. (1999) não mostrou correlação entre a expressão das cateninas e recidiva, concluindo que a expressão desta MAC não está associada ao prognóstico do CaP em estágio precoce submetido à cirurgia.

Nas metástases ósseas também houve menor expressão de β -catenina, porém inesperadamente, na metástase linfonodal nos deparamos com expressão significativamente maior quando comparado ao tumor primário ou à metástase óssea ($p < 0,001$).

É sabido que nas células com perda de E-caderina, a β -catenina mantém-se livre no citoplasma onde pode ser degradada ou transportada para o núcleo, onde atua como promotor da transcrição de genes relacionados com a proliferação celular. A expressão nuclear de β -catenina nesses casos parece estar associada a pior prognóstico, Chen (2004) confirmou esta hipótese ao mostrar correlação entre redução da β -Catenina na membrana e ganho de expressão no núcleo com maior grau e estágio em 49 tumores primários e 18 metástases ósseas e linfonodais.

Porém, em nossa casuística, apesar de ocorrer redução de E-caderina na membrana na maior parte dos casos, só encontramos expressão nuclear de β -catenina em apenas dois pacientes, denotando que a via da β -catenina nuclear que regula a proliferação celular encontra-se desativada na progressão do CaP. A manutenção de expressão de β -catenina no linfonodo pode ser explicada pela estabilização das cateninas por outra molécula como postulada por Morita que observou situação semelhante em um terço dos pacientes com CaP avaliados (Morita et al., 1999).

Outro aspecto importante em relação à expressão de β -catenina no CaP é a controvérsia sobre a maior expressão desta MAC com a disseminação do tumor para o osso. Bryden et al (2002) avaliaram, por hibridização *in situ*, a expressão do RNA mensageiro da β -catenina em 14 metástases ósseas pareadas com seus respectivos tumores primários, e notou perda de expressão na progressão para a metástases em todos os casos.

Em contraste, dois estudos mostraram maior expressão de β -catenina por imuno-histoquímica na metástase óssea em relação ao tumor primário. Saha (2008) mostrou que 12 de 17 metástases (71%) apresentavam expressão forte e homogênea de β -catenina comparado com 4 de 22 (18%) tumores primários. Similarmente, Chen (2004) encontrou forte expressão de β -catenina no tumor primário, linfonodo e osso em 34%, 77% e 85% dos casos respectivamente, denotando sua maior expressão com a progressão da neoplasia.

A presença de expressão forte de β -catenina em apenas 18% das metástases ósseas, somado à inexistência de ganho de expressão quando

fizemos a análise dos tumores primários pareados com a sua respectiva metástase, contradizem a hipótese da re-expressão de β -catenina na disseminação do tumor para o osso. Especulamos que a perda de β -catenina e E-caderina é importante na disseminação da neoplasia, mas que a re-expressão no sítio metastático à distância, não é essencial para o estabelecimento da metástase, uma vez que tal fenômeno não foi observado em nenhum caso.

Em relação às α e γ cateninas, observamos redução de expressão de ambas no tumor primário e uma nítida tendência de redução da expressão da α -catenina com a progressão do tumor ($p < 0,001$) confirmando os achados prévios da literatura (Kallakury et al., 2001a). Já a γ -catenina apresentou um aumento da expressão com a progressão do tumor para o sítio à distância ($p = 0,016$).

A função destas duas cateninas, junto com a E-caderina e β -catenina, é primordial para a manutenção da adesão intercelular, mas o fato de metade das metástases ósseas apresentarem expressão normal de γ -catenina não significa que a adesão esteja preservada, pois neste mesmo sítio a expressão forte de E-caderina, α e β -cateninas ocorreu em apenas 14%, 18% e 0% dos casos de tumor localizado, metastático em linfonodo e metastático em osso respectivamente. A perda de qualquer uma destas moléculas desestabiliza o complexo caderina-catenina e prejudica a adesão celular.

No tumor primário, poucos estudos avaliaram em conjunto a expressão de α e γ -cateninas no CaP como fator preditor de recorrência após o tratamento. Van Oort (2007) avaliou 65 pacientes tratados com cirurgia e mostrou que a redução de expressão de α e β e γ -cateninas era acompanhada de menor sobrevida,

sendo que na análise multivariada, incluindo dados clínicos, somente a perda de α -catenina mostrou-se preditora de menor sobrevida (van Oort et al., 2007).

Ao contrário de van Oort et al. (2007), não observamos associação entre as expressões destas duas cateninas com a recidiva do tumor após cirurgia. A disparidade do resultado pode ser explicada pela população heterogênea do estudo de van Oort, que incluiu pacientes com doença avançada submetidos à cirurgia não curativa, além de tumores primários localizados.

Em concordância com nosso resultado, Richmond avaliou, por IH e com critério de análise semelhante, 79 pacientes com diagnóstico de CaP e, embora na análise univariada a perda de E-caderina e α -catenina foram preditoras de menor sobrevida, na multivariada apenas a expressão da E-caderina manteve-se independentemente associada à menor sobrevida (Richmond et al., 1997). Porém este estudo, assim como o de van Oort, incluiu pacientes com tumor de próstata com estádios diversos, em contraposição ao nosso que avaliou a sobrevida em população homogênea de tumores clinicamente localizados.

Embora um número de alterações de expressão de MAC tenha sido descrito na progressão do CaP, a regulação destas mudanças não é bem compreendida e os resultados descritos foram conflitantes.

Como existem poucos estudos avaliando o tecido metastático, somente hipóteses podem ser feitas sobre o papel das MAC na progressão do CaP, mas baseado em nosso estudo a perda de expressão das MAC parece ser característica deste evento. Acreditamos, por isto, que os resultados desta pesquisa colaboram para o conhecimento do processo de carcinogênese do CaP.

Atualmente, não há estudos que tenham avaliado todas estas MAC em amostras clínicas como marcadores de prognóstico; a maioria dos estudos em CaP, especialmente em relação às integrinas, concentra-se principalmente na descrição de expressão, ao invés de correlacionar estes dados com a recorrência tumoral.

Por esta razão, um aspecto importante de nossa pesquisa é que este é o primeiro estudo na literatura indexada que associou a expressão de integrinas com recorrência do tumor após tratamento cirúrgico do CaP localizado. Outro ponto forte é a realização dos procedimentos pelo mesmo cirurgião, o que diminui a influência das variáveis relacionadas ao ato cirúrgico. A análise da expressão de cada marcador simultaneamente em todas as amostras através do TMA também colabora para a homogeneidade dos resultados do estudo

Por outro lado, reconhecemos as limitações inerentes a qualquer estudo retrospectivo, o que qualifica o nosso resultado, a priori, como gerador de hipótese. Portanto, torna-se necessária a validação destes resultados através de estudos prospectivos com outras séries de casos e com o emprego de outras metodologias de análise de expressão das MAC.

Caso nossos resultados sejam confirmados, eles poderão ser aplicados na prática clínica para melhorar a avaliação do prognóstico dos pacientes com CaP. Em combinação com outros testes moleculares e bioquímicos, os testes de expressão para a integrina $\alpha 3$ e $\alpha 3\beta 1$ poderão ajudar a identificar e selecionar os pacientes com maiores chances de recorrência para tratamento adjuvante precoce, portanto melhorando o controle da doença. Ao mesmo tempo, seria

possível poupar muitos pacientes de tratamento adjuvante desnecessário e suas complicações associadas.

Outra aplicação seria o desenvolvimento de terapias alvo para bloquear a disseminação da doença e neste sentido protocolos atualmente estão sendo realizados com o emprego de anticorpo anti $\alpha 3\beta 1$ (Lillo., 2004). Existem também relatos de estudos fase II avaliando a atividade de anticorpos monoclonais anti integrina em associação com docetaxel e prednisona, esquema clássico de quimioterapia para o CaP, em pacientes com tumor hormônio refratário (Goel et al., 2008).

6. Conclusão

6. Conclusão

Demonstramos que a imuno-expressão das integrinas $\alpha 3$ e $\alpha 3\beta 1$ está independentemente associada com a recidiva do câncer de próstata localizado após prostatectomia radical, sugerindo que estas moléculas de adesão sejam marcadores potenciais de prognóstico desta neoplasia.

Mostramos, ainda que a perda de expressão das moléculas de adesão é uma característica da progressão do câncer de próstata e que este fenômeno pode estar relacionado ao potencial metastático deste tumor.

7. Perspectivas

7. Perspectivas

- Revalidar os nossos resultados obtidos por imuno-histoquímica em outra casuística de pacientes com câncer de próstata através de técnica de expressão gênica (RT-PCR) das integrinas que se mostraram associadas com o prognóstico nesta análise preliminar. Para isto avaliaremos as amostras contidas no banco de tumores do LIM 55 da Disciplina de Urologia do HCFMUSP.

- Estabelecimento de linha de pesquisa sobre a expressão de moléculas de adesão em uro-oncologia, já tendo iniciado a análise de expressão destas moléculas em tumores uroteliais do trato urinário superior por imuno-histoquímica com emprego de TMA já confeccionado.

8. Referências

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993;68:4-17.

Allen MV, Smith GJ, Juliano R, Maygarden SJ, Mohler JL. Downregulation of the beta4 integrin subunit in prostatic carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 1998;29:311-8.

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules and selectins. *Pharmacol Rev* 50:197-263,1998

Barker N, Morin PJ, Clevers H. The Yin-Yang of TCF/ beta catenin signaling. *Adv Cancer Res* ,77:1-14, 2000b.

Bartolazzi A, Cerboni C, Nicotra MR, Mottolese M, Bigotti A, et al.: Transformation and tumor progression are frequently associated with expression of the alpha 3/beta 1 heterodimer in solid tumors. *Int J Cancer* 1994; 58:488-491.

Bello-DeCampo D, Kleinman HK, Deocampo ND, Webber MM: Laminin-1 and alpha6beta1 integrin regulate acinar morphogenesis of normal and malignant human prostate epithelial cells. *Prostate* 2001; 46:142-153.

Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. Differential expression of alpha 6 and alpha 2 very late antigen integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic prostate: Simultaneous demonstration of cell surface receptors and their extracellular ligands. *Hum Pathol* 1993;24:243-8.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de câncer 2008: [Acesso julho 2009]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>

Brewster SF, Oxley JD, Trivella M, Abbot CD, Gillatt DA. Preoperative p53, bcl2, CD44 and E-Cadherin immunohistochemistry as predictors of biochemical relapse after radical prostatectomy. J Urol 161:1238-1243, 1999

Brussel JPV, Mickisch GHJ. Prognostic factors in prostate and testis cancer BJU Int 83:910-917, 1999

Bryden AAG, Hoyland JA, Freemont AJ, Clarke NW, Wismayer DS, George NJR. E-cadherin and β -catenin are down regulated in prostatic bone metastases BJU Int 89, 400-403, 2002

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. Lab Invest. 2000;80(12):1943-9. Links

Chen G, Shukeir N, Potti, Sircar K, Aprikian A, Goltzman D, Rabbani SA: Up-regulation of Wnt-1 and Beta Catenin Production in Patients with Advanced Metastatic Prostate Carcinoma. Cancer 101(6), 1345-1356, 2004

Cheng L, Nagabhushan M, Pretlow TP, Amini SB, Pretlow TG. Expression of E-Cadherin in primary and metastatic prostate cancer. Am J Pathol 148:1375-1380, 1996

Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. Urology 62:3-12, 2003

Cress AE, Rabinovitz I, Zhu W and Nagle RB: The alpha 6 beta1 and alpha 6 beta 4 integrins in human prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14:219-228.

D'Amico AV.; Whittington R ; Malkowicz SB ; Schultz D; Blank K; Broderick, GA; Tomaszewski JE; Renshaw AA; Kaplan I; Beard CJ; WeinA: Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *JAMA*, 16, 969, 1998

Davis TL, Cress AE, Dalkin BL, Nagle RB. Unique expression pattern of the alpha6beta4 integrin and laminin-5 in human prostate carcinoma. *Prostate* 2001;46:240-8.

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer *JAMA*. 1998;280(11):969-74

De Marzo AM, Knudsen B, Chan-Tak K, Epstein JI. E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. *Urology* 53: 707-713, 1999

Edlund M, Miyamoto T, Sikes RA, Roy Ogle, Gordon L, Farach-Carson MC, Otey CA et al. Integrin expression and usage by prostate cancer cell lines on laminin substrata. *Cell Growth Differ* 12:99-107, 2001

Fukushima Y, Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, Sekiguchi K: Integrin alpha3beta1-mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion,

migration and invasion of malignant glioma cells. *Int J Cancer* 1998;76:63-72

Giannelli G, Fransvea E, Marinosci F, Bergamini C, Colucci S, Schiraldi O, et al.: Transforming growth factor-beta1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via alpha3beta1 integrin. *Am J Pathol* 2002; 161:183-193.

Giovannucci EL, Liu Y, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer* 121:1571 – 8, 2007

Giroldi LA, Schalken JA. Decreased expression of the intracellular adhesion molecule E-cadherin in prostate cancer: biological significance and clinical implications. *Cancer Metastasis Rev* 12:29-37, 1993

Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Hum Pathol* 23:273-279, 1992

Goel HL, Li J, Kogan S, Languino LR: Integrins in prostate cancer progression. *Endocr relat Cancer* 2008; 15:657-664.

Graff JR, herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 55:5195-5199, 1995

Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Taki T, Kondo K, Kohno N, et al.: Integrin alpha3 expression as a prognostic factor in colon cancer:

association with MRP-1/CD9 and KAI1/CD82. *Int J Cancer* 2002; 97:518-525

Holly SP, Larson MK, Parise LV. Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res* 2000;261:69-74.

Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 2001;158, 1245-1251

Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC. Aberrant Expression of E-Cadherin and Beta Catenin in Human Prostate Cancer *Urol Oncol: Sem and Origin Invest* 23, 402-406, 2005

Jonathan L. Wright, MD, MS, Paul H. Lange MD, FACS. Newer Potential Biomarkers in Prostate Cancer. *Rev Urol.* 9: 207–213, 2007

Kallakury BVS, Sheehan CE, Deen EW, Oliver J, Fischer HAG, Kaufman RP, Ross JS. Decreased expression of catenins (α and β), p120 CTN, and E-cadherin cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas. *Cancer* 92:2786-2795, 2001a.

Kallakury BVS, Oliver J, Sheehan CE, Ross JS. Co-Downregulation of Cell Adhesion Proteins α and β Catenins, p120CTN, E-Cadherin, and CD44 in Prostatic Adenocarcinomas. *Human Pathol* 32,(8),849-855.2001b

Ke XS, Goldfinger N, Rostad K, Hovland R, Akslen LA, Rotter V, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition of a primary prostate cell line with

switches of cell adhesion modules but without malignant transformation. PLoS One 2008;3:e3368.

Kemler R. From cadherins to catenins: Cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. Trends Genet 1993;9:317-21

Knox JD, Cress AE, Clark V, Manriquez L, Affinito KS and Dalkin BL. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. Am J Pathol 1994; 145:167-74.

Kostenuik PJ, Singh G, Orr FW. Transforming growth factor beta up regulates the integrin-mediated adhesion of human prostatic carcinoma cells to type I collagen. Clin Exp Metastasis 15:41-52, 1997

Leite KRM, Srougi M, Kauffmann JR, Bevilacqua RG, Nesralah LJ and Camara-Lopes LH. Well differentiated localized prostate carcinoma: prognostic relevance of tertiary Gleason pattern 4 and tumor volume. Rev Assoc Med Bras 51: 329-333, 2005

Li LC, Zhao H, Nakajima K, Ryoul B, Ribeiro Filho LA, Carroll P, Dahiya R. Methylation of the E-cadherin gene promoter correlates with progression of prostate cancer. J Urol 166:705-709, 2001

Lillo AM, Sun C, Gao C, Ditzel H, Parrish J, Gauss CM, Moss J, Felding-Habermann B, Wirsching P, Boger DL, Janda KD. A human single-chain antibody specific for integrin alpha3beta1 capable of cell internalization and delivery of antitumor agents. Chem Biol. 2004 Jul;11(7):897-906

Lourenço SV, Kapas S, Williams DM, Leite K, Araújo VC. Expression patterns of integrins on pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma: study on specimens and in vitro investigation of the effects of extracellular matrix on the expression of these adhesion molecules. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:574-580

Mehta R, Kyshtoobayeva A, Kurosaki T, Small EJ, Kim H, Stroup R, McLaren CE, Li KT, Fruehauf JP. Independent association of angiogenesis index with outcome in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 7:81-88, 2001

Melchiori A, Mortarini R, Carlone S, Marchisio PC, Anichini A, Noonan DM et al.: The alpha 3 beta 1 integrin is involved in melanoma cell migration and invasion. *Exp Cell Res* 1995; 219:233-242.

Moch H, Schraml P, Rubendorf L, Mirlacher M, Kokonen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 1999; 154(4):981-6

Morita N, Uemura H, Tsumatani K, Cho M, Hirao Y, Okajima E, *et al.* E-cadherin and alpha, beta and gamma catenin expression in prostate cancer: Correlation with tumor invasion. *BJU Int* 1999;79:1879-83.

Moul JW, Bettencourt MC, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Srivastava S, Bauer JJ Protein expression of p53, bcl2 and KI 67 as prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. *Surgery*, 120:159-167, 1996

Moul JW, Kane CJ, Malkowicz SB. The role of imaging studies and molecular markers for selecting candidates for radical prostatectomy. *Urol Clin North Am* 8:459-472, 2002

Murant SJ, Handley J, Stower M, Reid N, Cussenot O et al.: Co-ordinated changes in expression of cell adhesion molecules in prostate cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33:263-271.

Nagata M, Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y, et al.: Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 2003;106:683-689.

Nagle RB, Hao J, Knox JD, Dalkin BL, Clark V, Cress AE. Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue. *Am J Pathol* 1995;146:1498-507.

Oertl A, Relja B, Makarevic J, Weich E, Höfler S, Jones J, et al.: Altered expression of beta1 integrins in renal carcinoma cell lines exposed to the differentiation inducer valproic acid. *Int J Mol Med* 2006; 18:347-354.

Otto T, Rembrink K, Goepel M, Meyer M, Rubben H.E-cadherin: a marker for differentiation and invasiveness in prostatic carcinoma. *Uro, Res* 21:359-362, 1993

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS.: Cancer burden in the year 2000: the global picture. *Eur J Cancer* 37: S4–66, 2001

Partin AW, Kattan MW Subong EM combination of prostate specific antigen, clinical stage and gleason to predict pathological stage of prostate cancer. A multi institucional up date *JAMA* 277:1445-1451, 1997

Partin AW, Feneley MR Indicators of pathologic stage of prostate cancer and their use in clinical practice. *Urol Clin North Am* 28:3, 2001

Patriarca C, Petrella D, Campo B, et al. Elevated E-cadherin and alpha and beta-catenin expression after androgen deprivation therapy in prostate adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*. 2003;199:659–665.

Plantefaber LC, Hynes RO. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* 1989;56:281-90.

Potters L, Klein EA, Kattan MW, Reddy CA, Ciezki JP, Reuther AM, Kupelian PA: Monotherapy for stage T1-T2 prostate cancer: radical prostatectomy, external beam radiotherapy, or permanent seed implantation. *Radiother Oncol*. 2004; 71:29-33.

Rabinovitz I, Nagle RB, Cress AE: Integrin alpha 6 expression in human prostate carcinoma cells is associated with a migratory and invasive phenotype in vitro and in vivo. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13:481-491.

Richmond PJ, Karayiannakis AJ, Nagafuchi A, Kaisary AV, Pignatelli M. Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer Res*. 1997 Aug 1;57(15):3189-93

Roehl KA, Loeb S, Antenor JA, Corbin N and Catalona WJ: Characteristics of patients with familial versus sporadic prostate cancer. *J Urol* 176:2438, 2006

Rubin MA, Mucci NR, Figurski J, Fecko A, Pienta KJ, Day ML. E-cadherin expression in prostate cancer: A broad survey using high-density tissue microarray technology. *Hum Pathol* 2001; 32:690-7.

Saha B, Arase A, Imam SS, Tsao-Wei D, Naritoku WY, Groshen S, Jones LW, Imam A. Overexpression of E-Cadherin and β -Catenin Proteins in Metastatic Prostate Cancer Cells in Bone. *The Prostate* 68:78-84, 2008

Scardino T, Estham JA Campbell's Urology 8th Edition Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ Kavoussi LR Novick AC Partin AW Peters CAsaunders Philadelphia 3080-3102, 2002

Schmelz M, Cress AE, Scott KM, Burger F, Cui H, Sallam K, et al.: Different phenotypes in human prostate cancer: alpha6 or alpha3 integrin in cell-extracellular adhesion sites. *Neoplasia* 2002, 4:243-254

Slack-Davis JK, Parsons JT: Emerging views of integrin signaling: implications for prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2004; 91:41-46.

Stamey TA, Mc NealJE, Yemoto C. Biological determinant of cancer progression of men with prostate cancer *JAMA* 281:1395, 1999

Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, Bianco FJ Jr, Dotran ZA, Fearn PA, Kattan MW. Preoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy *J Natl Cancer Inst.* 98(10):715-717., 2006.

Stewart DA, Cooper CA, Sikes RA. Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Repr Biol Endocr* 2:1-13, 2004

Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, Schaafsma E, Karthaus HFM, Oosterhof GON, Debruyne MJS, Schalken J. Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 54:3929-3933, 1994.

van Oort IM, Tomita K, van Bokhoven A, Bussemakers MJ, Kiemeny LA, Karthaus HF, Witjes JA, Schalken JA. The prognostic value of E-cadherin and the cadherin-associated molecules alpha-, beta-, gamma-catenin and p120ctn in prostate cancer specific survival: a long-term follow-up study. *Prostate*. 2007; 67(13):1432-8.

Visakorpi T. The molecular genetics of prostate cancer. *Urology* 2003; 62:3–10.

Wang J, Krill D, Torbenson M, Wang Q, Bisceglia M, Stoner J, Thomas A, DeFlavia P, Dhir R, Becich MJ. Expression of Cadherins and Catenins in Paired Tumor and Non-Neoplastic Primary Prostate Cultures and Corresponding Prostatectomy Specimens. *Urol Res* 28:308-315, 2000

Whitmore WJ Jr. Natural history and staging of prostate cancer. *Urol Clin North Am*. 1984;11:209–220.

Witkowski CM, Rabinovitz I, Nagle RB, Affinito KS, Cress AE. Characterization of integrin subunits, cellular adhesion and tumorigenicity of four human prostate cell lines. *J Clin Res Oncol* 119:637-644, 1993

Woodson K, Hayes R, Widroff L, Villaruz L, Tangrea J. Hypermethylation of GSTPI, CD44 and E-cadherin genes in prostate cancer among US blacks and whites. *The Prostate* 55:199, 2003

Wu TT, Hsu YS, Wang JS, Lee YH, Huang JK. The role of p53, bcl-2, and e-cadherin expression in predicting biochemical relapse for organ confined prostate cancer in Taiwan. J Urol 170:78-81, 2003

Zheng DQ, Woodard AS, Fornaro M, Tallini G, Languino LR. Prostatic carcinoma cell migration via $\alpha\beta 3$ integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. Cancer Res 59:1655-1664,1999.

9. Publicações

E-cadherin and β -catenin Loss of Expression Related to Bone Metastasis in Prostate Cancer

Jose Pontes Junior, MD, Miguel Srougi, MD, Priscila M. A. Borra, MD,
Marcos F. Dall'Oglio, MD, Leopoldo A. Ribeiro-Filho, MD, and Katia R. M. Leite, MD

Objectives: E-cadherin and β -catenin are adhesion molecules responsible for the maintenance of normal epithelial cell phenotype. A disturbance in epithelial cell adhesion, which leads to a more invasive and metastatic phenotype, is a hallmark of tumor progression. Several immunohistochemical studies have reported a strong correlation between loss of their expression to higher stage and grade in prostate carcinoma, but their influence in metastatic process is not yet known. The aim of this study is to verify the role of adhesion molecules in the progression of prostate cancer (PC), assessing the expression of E-cadherin and β -catenin in bone metastasis.

Materials and Methods: Twenty-eight bone metastases of prostate carcinoma were submitted to immunohistochemistry analysis for E-cadherin and β -catenin expression. In 6 patients, we were able to assess the expression of the adhesion molecules in the primary tumors and their respective metastases. The definition of normal expression for both antibodies was strong and diffuse expression in more than 70% of tumor cells.

Results: In bone metastases, there was loss of expression of E-cadherin and β -catenin in 86% and 82%, respectively. Among the primary tumors, E-cadherin and β -catenin expression was normal in 83% and 50% cases, respectively. Considering the 6 patients with paired primary and bone metastasis, we found loss of expression for both E-cadherin and β -catenin in most of the cases.

Conclusions: Comparing primary PC and its metastasis, we showed persistent loss of E-cadherin and β -catenin expression. This phenomenon may be related to metastatic potential in PC, because we have shown underexpression for E-cadherin and β -catenin in 86% and 82% of bone metastases.

Key Words: prostate cancer, E-cadherin, β -catenin, adhesion molecules, immunohistochemistry, metastases

(*Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008;00:000–000)

Received for publication May 10, 2007; accepted November 30, 2007.
From the Laboratory of Medical Investigation—LIM 55, Urology
Department, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,
São Paulo, Brazil.

Reprints: Jose Pontes Junior, MD, Av. Dr Arnaldo 455, Room 2141,
01246-903, São Paulo, Brazil (e-mail: docjpjr@uol.com.br).
Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

The development of bone metastasis in patients with prostate cancer (PC) is a crucial event in the prognosis of this neoplasm; most patients show bone metastasis by the time of death.¹

Currently, there is no clinical parameter or molecular markers able to accurately assess the aggressive behavior and metastatic potential of PC. Nevertheless, both tumor invasion and progression to metastasis, which are the signatures of malignancy, are related to cell-to-cell adhesion, cell migration, and interaction with the extracellular matrix at a distant site.²

E-cadherin is a calcium-dependent transmembrane glycoprotein that plays a role in cellular adhesion. Its intracellular domain connects to catenins (α , β , and γ) at the cell cytoplasm, which are physically associated, in turn, to the actin filaments of the cytoskeleton. Its extracellular domain accounts for the homotypic intercellular adhesion. The appropriate interaction between E-cadherin and catenin is essential for maintaining epithelial cell integrity and a benign epithelial phenotype.^{3,4}

E-cadherin dysfunction is involved in tumor invasion and progression of several malignant neoplasms. It is believed that the loss of function of the E-cadherin–catenin complex facilitates the development of metastasis by promoting the loss of intercellular adhesion.^{5,6}

If the loss of intercellular E-cadherin at the primary tumor site is a sign of metastatic potential, the case could be made that bone metastasis sites have lower expression of the protein, a fact that Cheng et al⁷ have demonstrated in 14 PC lymph node metastases. Others studies, however, have shown the opposite, with increased expression of E-cadherin in lymph nodes and bone metastases.^{8,9} Assuming these previous data, we could speculate that, although the reduction in expression of E-cadherin in the primary tumor is important for the first step of metastasization, there would be a reexpression of E-cadherin in the metastasis settlement and growth, thus favoring the development of the tumor at a distant site.

The aim of our study is to assess the expression of E-cadherin and β -catenin by immunohistochemistry (IHC) in bone metastasis of PC.

MATERIALS AND METHODS

Case Selection

Twenty-eight patients with bone metastases of PC were submitted to surgery for treatment of secondary

Original Article

Evaluation of the expression of integrins and cell adhesion molecules through tissue microarray in lymph node metastases of prostate cancer

José Pontes-Júnior*, Sabrina Thalita Reis, Marcos Dall'Oglio, Luis Carlos Neves de Oliveira, Jose Cury, Paulo Afonso Carvalho, Leopoldo Alves Ribeiro-Filho, Kátia Ramos Moreira Leite, Miguel Srougi

Laboratory of Medical Investigation – LIM 55, Urology Department, Medical School University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

E-mail: docjpjr@uol.com.br

*Corresponding author

Published: 25 February 2009

Journal of Carcinogenesis 2009, 8:3

This article is available from: <http://www.carcinogenesis.com/content/8/1/3>

© 2009 Pontes-Júnior;

Received: 8 December, 2008

Accepted: 17 February 2009

ABSTRACT

Background: Integrins and adhesion molecules are responsible for the maintenance of the epithelial phenotype. Cell culture studies have reported the correlation between adhesion molecule expression and prostate carcinoma, but their role in the metastatic process is not yet known. Our aim is to study the expression profiles of these molecules and evaluate their association with the metastatic behavior of prostate adenocarcinoma.

Materials and Methods: A Tissue Microarray containing two samples from 19 primary tumors and one from their corresponding lymph node metastases was constructed and subjected to immunohistochemical analysis of the expression of integrins, E-cadherin and β and γ -catenins. Within each case, paired analyses were also performed to evaluate gains or losses in metastasis compared to its primary tumor. **Results:** The expression of αv , $\alpha v\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$ and γ -catenin were abnormal in almost every case. Marked loss of E-cadherin and $\beta 4$ integrin was found in primary and metastatic lesions. β -catenin was normal in all primary cases and in 94% of metastases. $\alpha 6$ was normal in all primary tumors and metastases. $\alpha 3$ and $\alpha 3\beta 1$ were normal in 32% of primary cases and in 53% and 6% of metastases, respectively. In paired analyses, loss of E-cadherin, $\beta 4$, αv , $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ was found in 65%, 71%, 59%, 53% and 47% of patients, respectively. Catenins and $\alpha 2\beta 1$ showed maintenance of expression in most of the cases. **Conclusions:** In this preliminary study we have shown that the loss of cell adhesion molecules can be considered a characteristic of the metastatic phenotype in prostate cancer. Larger series should be evaluated in order to confirm our findings.

Keywords: Cell adhesion molecules, integrins, lymph nodes, metastases, prostate cancer.

Introduction

In normal prostate development, the interaction of glandular epithelial cells with the extracellular matrix is essential; this interaction influences these cells' growth, survival and differentiation. The cell adhesion molecules (CAM) collaborate in this interaction and are responsible for the maintenance of a normal tissue phenotype.

This interaction is also believed to play an important role in oncogenesis, where tumor invasion and progression to

metastasis are the signatures of malignancy. Many aspects of oncogenesis involve changes in the adhesion of cells to adjacent cells and to the extracellular matrix. Essentially, cells that adhere well do not metastasize, while less adhesive cells are more likely to do so.

Before dissemination and colonization at a metastatic site, prostate cancer cells must become motile and detach from the primary tumor and overcome the extracellular matrix. This increase in cell motility is accompanied by changes in the expression of adhesion receptors, especially those of the

10. Apresentação em Congressos

of THE JOURNAL UROLOGY®

Official Journal of the American Urological Association • www.jurology.com

Volume 181

Number 4

April 2009

Annual Meeting
25-30 April 2009
Chicago, Illinois USA

Applying Knowledge, Improving Lives

Program Abstract Book

Meeting Attendees: Bring this copy of the AUA 2009
Program Abstract Book to the 2009 Annual Meeting
or access it online at www.jurology.com.
Additional copies will not
be available on site.

Supplement to The Journal of Urology®

min vs 24.0 minutes ($p < 0.0001$). The GFR was significantly higher in the AV group during the post-operative period: 65.1 cc/min vs 71.9 cc/min ($p=0.0391$). Variation in the operative blood loss, the hospital stay and the leakage rate were non-significant. Loss of differential function of the operated kidney was 13.6% for the artery alone group and 19.0% for the « en-bloc » group ($p=0.1563$).

CONCLUSIONS: « En-bloc » clamping of the renal hilum is not associated with more renal function impairment in patients undergoing LPN for tumour. In our study, over, this technique is correlated to a lower warm ischemic time, most important predictor of decrease in renal function.

Source of Funding: None

1327

ANALYSIS OF LOCAL RECURRENCE AFTER RENAL CRYOABLATION

William B Shingleton*, Blake Wynia, Chapel Hill, NC; Horiaco D'Agostino, Shreveport, LA; Janice Mayes, Matvey Tsivian, Vladimir Mouraviev, Thomas J Polascik, Durham, NC

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Diagnosis of local recurrence after cryoablation remains a challenge. Local relapse can be detected by CT/MRI imaging or percutaneous biopsy of the suspected tumor. We analyzed the time frame in which recurrences occurred based upon our two institutional experience with laparoscopic (LCA) and percutaneous cryoablation (PCA).

METHODS: Between 2001 and 2008, 123 patients underwent cryosurgical procedures for an organ confined renal tumor(s). All patients were carefully selected based on the following criteria: tumor size < 3.5 cm, along with the absence of local or systemic disease noted on CT/MRI. Cryoablation was performed with an argon based cryosystem (Gail Medical) using 17 gauge cryoprobes. Patients were followed by serial CT/MRI scan, creatinine level and physical examination beginning 3 months post procedure for percutaneous patients and 6 months for laparoscopic patients.

RESULTS: The mean age was 66.1 (9.6) years in PCA patients versus 64 (9.6) years in the LCA group ($p=0.35$). The median tumor size was 2.2 cm (1-3.5) in the PCA and 1.5 cm (1-3.5) in the LCA cohort ($p=0.027$). The recurrence rate in the PCA group was 7 of 77 (9.1%) PCA procedures vs 3 of 54 (5.6%) LCA procedures ($p=0.52$). The median time to failure was 3 months (range 1-12) in the PCA group versus 20 months (range 6-48) for LCA (range 6-48) ($p=0.092$). With LCA 2 of 3 recurrences in this group occurred in the first 8 months and the 3rd case at 48 months. In the PCA 5 of 7 recurrences were identified within the first 3 months while all others were within the first 12 months.

CONCLUSIONS: In our experience, 9 of 10 recurrences occurred in the first 12 months. In light of these results, it could be prudent to recommend intensive early follow up imaging and if there was no evidence of recurrence by 12 months, then longer intervals for subsequent imaging may be warranted.

Source of Funding: None

Prostate Cancer: Basic Research (VI)

Moderated Poster 44

Tuesday, April 28, 2009

8:00 am - 10:00 am

1328

TALIN1 IS A NOVEL MEDIATOR OF PROSTATE CANCER CELL MIGRATION, INVASION, AND METASTASIS

Shinichi Sakamoto*, Lexington, KY; Richard O. McCann, Macon, GA; Rajiv Dhir, Pittsburgh, PA; Tomohiko Ichikawa, Chiba, Japan; Natasha Kyprianou, Lexington, KY

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Talin1 is an integrin binding protein that regulates integrin activation towards mediating cell

signaling interactions with the extracellular matrix (ECM). The role of talin1 in human cancer metastasis has not been yet explored. This study investigated the functional significance of this focal adhesion player in prostate cancer cell invasion, tumor microenvironment and metastasis in vitro and in vivo.

METHODS: Talin1 expression was determined by immunohistochemical analysis using the talin1 polyclonal antibody in prostate tissue sections from the TRAMP mouse model of increasing ages (6-28 weeks). Talin1 expression in Human Prostate Cancer Patient was studied using Human Tissue Microarray. Cell viability and apoptosis induction were determined by the MTT and TUNEL and Annexin-V analysis respectively. ShRNA silencing was used to study the consequences of talin1 loss on prostate cancer cell apoptosis, migration, adhesion and invasion. The in vivo contribution of talin1 to the metastatic ability of prostate cancer cells was assessed by the experimental metastasis assay (Injection of Shtalin clones in tail vein of nude mice).

RESULTS: Talin1 overexpression correlated with prostate cancer progression to metastasis in the TRAMP mouse model. Tissue Microarray analysis of human prostate cancer specimens revealed increased talin1 immunoreactivity in metastatic lesions of human prostate cancer compared to normal or localized prostate tumors. Talin1 overexpression in prostate cancer cells PC-3, enhanced cell adhesion and migration, and promoted their invasion potential in vitro. ShRNA-mediated silencing of talin1 resulted in a significant suppression of prostate cancer cell migration and transendothelial invasion. ShRNA of Talin1 mediated significant inhibition in metastasis potential of prostate cancer cells by in vivo metastasis assay. Dissection of the underlying mechanism indicates that talin1 regulates cell survival signals via activation/phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and AKT. Talin1 overexpression resulted in anoikis resistance, while inhibition of AKT activation led to a significant reduction of Talin1-mediated invasive properties of prostate cancer cells as well as anoikis resistance.

CONCLUSIONS: These findings identified talin1 as a regulator of prostate tumor cell migration, invasion and intracellular survival signaling. Thus talin1 emerges as a potential therapeutic target for advanced prostate cancer, as well as a marker of prostate cancer progression to metastasis.

Source of Funding: AUA MD PhD Scholarship

1329

POSITIVE CORRELATION OF INTEGRIN EXPRESSION AND PROGNOSIS IN CLINICALLY LOCALIZED PROSTATE CANCER

Jose Pontes, Jr*, Sabrina T Reis, Jose Cury, Luiz C N Oliveira, Marcos F Dall'Oglio, Paulo P Kayano, Paulo A Carvalho, Leopoldo A Ribeiro-Filho, Alexandre C Sant'Anna, Katia R M Leite, Miguel Srougi, Sao Paulo, Brazil

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Integrins and others adhesion molecules are responsible for the maintenance of the epithelial phenotype. Some studies have reported correlation between alterations in adhesion molecules expression and carcinogenesis, but their role in the prostate cancer is not clear. Our aim is to study the expression profiles of integrins and evaluate their association with recurrence of prostate cancer after surgical treatment. **METHODS:** For this case-control study, we selected 111 patients with localized tumor submitted to radical prostatectomy. 60 of these patients have not presented recurrence after a median follow-up of 123 months. Recurrence was defined as a PSA level above 0.4ng/ml. Integrin expression was evaluated by immunohistochemistry in a Tissue Microarray containing two samples from each tumor. We employed a semiquantitative analysis and considered normal when the expression was strong and diffusely positive. We correlated expression with recurrence employing the chi-square test and $p < 0.05$ was considered significant. **RESULTS:** Reduced expression was found for all integrins with the exception of $\alpha 6$ that was normal in most of cases as shown in Figure 1. In the univariate analysis the expression of integrins $\alpha 3$ and $\alpha 2\beta 3a$ was statistically associated with recurrence after radical prostatectomy. When expression of $\alpha 3$ and $\alpha 2\beta 3a$ are normal, the odds of recurrence is respectively 3.5 and 2.7

31º Congresso Brasileiro de Urologia

27 de outubro a 1 de novembro de 2007
Centro de Convenções - Salvador - Bahia

Certificado

A SBU – Sociedade Brasileira de Urologia, certifica que

JOSÉ PONTES JÚNIOR, LUIS CARLOS NEVES OLIVEIRA, MARCOS DALLOGLIO, JOSÉ CURY, MIGUEL SROUGI, KATIA RAMOS MOREIRA LEITE

apresentaram o Tema Livre TLO 0113 – "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE INTEGRINAS E MOLÉCULAS DE ADEÇÃO POR "TISSUE MICROARRAY" EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA E METÁSTASES LINFONODAIS", na sessão de Uro-Oncologia - Próstata 1, no 31º Congresso Brasileiro de Urologia, realizado de 27 de outubro a 1 novembro de 2007, em Salvador, Bahia.

Salvador, 1 de novembro de 2007.

Sidney Glina

Sidney Glina
PRESIDENTE DO 31º CONGRESSO BRASILEIRO DE UROLOGIA E DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA

Eric Roger Wyndlawski

Eric Roger Wyndlawski
PRESIDENTE DA COMISSÃO CIENTÍFICA DO 31º CONGRESSO BRASILEIRO DE UROLOGIA

Rogério Marcos Araújo

Rogério Marcos Araújo
SECRETÁRIO GERAL DO 31º CONGRESSO BRASILEIRO DE UROLOGIA

Promoção
SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA
SBU
www.sbu.org.br

Colaboração
VIAGRA
Sildenafil citrato

31º Congresso Brasileiro de Urologia

27 de outubro a 1 de novembro de 2007
Centro de Convenções - Salvador - Bahia

Certificado

A SBU – Sociedade Brasileira de Urologia, certifica que

JOSÉ PONTES JÚNIOR, LUIS CARLOS NEVES OLIVEIRA, MARCOS DALLOGLIO, JOSE CURY, MIGUEL SROUGI, KATIA RAMOS MOREIRA LEITE

apresentaram o Tema livre TLO 0112 – "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ECADERINA E BETA-CATENINA EM METÁSTASES ÓSSEAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA", na sessão de Uro-Oncologia - Próstata 1, no 31º Congresso Brasileiro de Urologia, realizado de 27 de outubro a 1 novembro de 2007, em Salvador, Bahia.

Salvador, 1 de novembro de 2007.

Sidney Glina
Sidney Glina
PRESIDENTE DO 31º CONGRESSO BRASILEIRO DE UROLOGIA E DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA

Eric Roger Wroblewski
Eric Roger Wroblewski
PRESIDENTE DA COMISSÃO CIENTÍFICA DO 31º CONGRESSO BRASILEIRO DE UROLOGIA

Rogério Matos Araújo
Rogério Matos Araújo
SECRETÁRIO GERAL DO 31º CONGRESSO BRASILEIRO DE UROLOGIA

Promoção
SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA
SBU
www.sbu.org.br

Colaboração
VIAGRA
sildenafil citrato

A Diretoria Executiva e a Comissão Científica dos Laboratórios de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP certificam que

JOSE PONTES JÚNIOR

participou como Congressista no 3º Simpósio "Avanços em Pesquisas Médicas dos Laboratórios de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP", realizado em 27 e 28 de setembro de 2007.

Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte
Presidente do 3º Simpósio
"Avanços em Pesquisas Médicas do LIM-HCFMUSP"

Prof. Dr. José Eluf Neto
Diretor Executivo
Laboratórios de Investigação Médica do HC-FMUSP

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE

JOSE PONTES JUNIOR, SABRINA THALITA REIS, LUIS CARLOS NEVES DE OLIVEIRA,
ALEXANDRE C SANT'ANNA, MARCOS DALL'OGGIO, LEOPOLDO ALVES RIBEIRO-FILHO,
ADRIANO NESRALLAH, PAULO PRIANTE KAYANO, PAULO AFONSO CARVALHO, JOSE CURY,
ADRIANA SANUDO, MIGUEL SROUGI, KÁTIA RAMOS MOREIRA LEIT

PARTICIPARAM DAS ATIVIDADES CIENTÍFICAS DO 32º CONGRESSO BRASILEIRO DE UROLOGIA,
NO PERÍODO DE 07 A 11 DE NOVEMBRO DE 2009, NA CIDADE DE GOIÂNIA-GO, COM CARGA
HORÁRIA DE 32 HORAS, COMO AUTORES DO PÔSTER - PO 324 - CORRELAÇÃO POSITIVA ENTRE A
EXPRESSÃO DE INTEGRINAS E PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO.

BRASÍLIA-DF, 11 DE NOVEMBRO DE 2009.

José Carlos de Almeida
Presidente do XXXII CBU

Marcus Vinícius Sadi
Presidente da Comissão Científica do XXXII CBU

11. Prêmios

CERTIFICADO

Dr. José Pontes Júnior
foi vencedor da categoria Saúde do Homem pelo trabalho
Perda de expressão de E-caderina e Beta-Catenina em metástases ósseas de câncer de
próstata, realizado
na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 25 de novembro de 2008

ROBERTO CIVITA
PRESIDENTE E EDITOR DA EDITORA ABRIL

JAIRO MENDES LEAL
VICE-PRESIDENTE EXECUTIVO DA EDITORA ABRIL

LÚCIA HELENA DE OLIVEIRA
DIRETORA DE REDAÇÃO DA REVISTA SAÚDE!

CERTIFICADO

Dr. José Pontes Júnior
foi vencedor da categoria Saúde do Homem do *IV Prêmio SAÚDE!*,
pelo trabalho Associação entre a expressão de integrinas e o prognóstico em câncer
de próstata localizado,
realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 24 de novembro de 2009

Jairo Mendes Leal
Presidente Executivo da Editora Abril

Lúcia Helena de Oliveira
Diretora de Redação da Revista Saúde!