KARLO DORNELLES BIOLO

**Análise do perfil de expressão de fatores de
crescimento e sua relação com marcadores de
inflamação e angiogênese na etiopatogenia da
hiperplasia prostática benigna**

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

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Biolo, Karlo Dornelles

Análise do perfil de expressão de fatores de crescimento e sua relação com marcadores de inflamação e angiogênese na etiopatogenia da hiperplasia prostática benigna / Karlo Dornelles Biolo. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientador: Alberto Azoubel Antunes.

Descritores: 1.Peptídeos e proteínas de sinalização intercelular 2.Hiperplasia prostática 3.Expressão gênica 4.Reação em cadeia da polimerase 5.Prostatite 6.Idoso 7.Fator 2 de crescimento de fibroblastos 8.Fator de crescimento transformador beta1 9.Proteína humana ENG 10.Interleucina-2 11.Fator A de crescimento do endotélio vascular 12.Interleucina-8

USP/FM/DBD-085/15

Dedicatória

Aos professores Dr Miguel Srougi e Dr. Alberto Azoubel Antunes, homens cultos e de notável saber científico e humano, os quais me abriram as portas para a vida acadêmica dentro da Urologia. Oportunizaram-me conviver dia-a-dia com um grupo maravilhoso de pessoas a quem sempre admirei e continuarei a admirar até o final de suas vidas profissionais dentro da Urologia. Hoje me oportunizam concretizar o que um dia foi sonho: concluir esta tese de doutorado.

Às mulheres de minha vida:

Minha mãe Loiva, por seu amor, incentivo e dedicação àquilo em que sempre acreditou valer a pena todo esforço em sua vida, ela acreditou em seus filhos!

Minha segunda mãe Beatriz, sempre vibrante com cada uma de minhas conquistas e de seus filhos!

Minha sogra Saleti, pelo apoio incondicional em todos os momentos, especialmente nos mais críticos, os mais importantes!

Minhas irmãs Giana e Mauren por todas alegrias e tristezas compartilhadas, dividindo as mesmas lembranças e sonhos com união, compaixão e a verdadeira amizade fraterna.

Minhas primas Carol e Chris por serem exemplos de vida profissional, sempre muito dedicadas às suas carreiras!

Minha esposa Lia, sempre incansável e, sobretudo, tolerante. Dividiu comigo todas as dificuldades desde que nos conhecemos e, o principal, esteve sempre ao meu lado para superá-las! Surpreendendo-me a cada instante com sua inigualável perspicácia.

Aos meus primos e verdadeiros irmãos Alexandre e Alberto, que dividem comigo objetivos em comum, risadas, momentos de descontração, alegria de viver. Também são inspiração pelo sucesso em seus trabalhos!

Ao meu sogro e segundo pai Ronaldo, que estará sempre vivo em minha memória, do qual jamais esquecerei as incontáveis lições de vida, que espero ter aprendido e saiba executar!

Ao meu irmão Giovane que não pude ter a honra de conviver em vida terrena mas que tenho convicção estar sempre ao meu lado onde quer que seja...

Ao meu pai Dinor, pelas oportunidades que me deste para alcançar meus objetivos, apoiando-me com palavras, conselhos e tudo que se pode esperar de um grande pai.

Aos meus vizinhos Paulo, Eliete, Alexandre e Leonardo por serem hoje também parte de minha família, obrigado por todo carinho!

Agradecimentos

Ao concluir esta etapa sobrepujante de minha vida acadêmica, lembrar da dedicação, esforço e superação pessoal somente tem valor se for possível agradecer a todos que, em algum dos difíceis momentos enfrentados, souberam ajudar a amenizá-los.

À Dra Sabrina Reis, a quem cada vez mais admiro, por sua disponibilidade, amabilidade e profundo conhecimento científico em todas as áreas de pesquisa. Serei eternamente grato por toda ajuda, carinho e compreensão em todas as fases de minha dissertação.

À Dra Nayara Viana pela ajuda em laboratório, lapidação na estruturação técnica do texto final desta dissertação e também pelo seu carinho e irreverência.

À Dra Kátia Ramos Leite, chefe do laboratório LIM-55 e a todos os integrantes deste centro de pesquisa que é referência em nosso país pelo tempo dispendido para comigo, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do grupo da próstata do Hospital das Clínicas em especial ao Dr Fábio Oliveira, Dr Luiz Henrique Araújo, Dr Marco Nunes, Dr Fernando Fróes e Dr Paulo Sajovic pelo apoio e amizade incondicional durante os anos de convivência em São Paulo. Eternos amigos! Verdadeiros, humanos!

Ao acadêmico Ricardo Kiriara pela colaboração da coleta de dados, essenciais ao resultado deste trabalho.

As secretárias do Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas de São Paulo, especialmente a Sra Elisa Cruz, por toda dedicação e afinho ao trabalho que executam com magnificência.

Ao Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas de São Paulo, professores, contratados, residentes, funcionários, alunos e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Serviço de Urologia do Hospital Universitário e do Hospital Mãe de Deus em Porto Alegre pela compreensão em todos os momentos e ajuda no desenvolver de minha carreira profissional na capital rio-grandense.

Aos que voluntariamente foram alvo deste estudo e que no nosso dia-a-dia são a motivação em busca do conhecimento e da qualificação profissional para o crescimento pessoal.

“ De tudo ficaram três coisas:
A certeza que estamos sempre recomeçando...
A certeza que precisamos continuar...
A certeza que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”
(Fernando Pessoa)

Nomalização

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão 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. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

	Lista de abreviaturas	
	Lista de tabelas	
	Resumo	
	Summary	
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Fatores de crescimento.....	3
1.2	Reação inflamatória local.....	6
1.3	Fatores angiogênicos.....	9
2	OBJETIVOS.....	11
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1	Desenho do estudo.....	14
3.2	Local e época.....	14
3.3	Sujeitos.....	14
3.4	Intervenção.....	15
3.5	Extração do RNA.....	17
3.6	Transcrição reversa (RT).....	18
3.7	Análise da expressão de genes por PCR em tempo real quantitativo	18
3.8	Análise estatística.....	20
4	RESULTADOS.....	21
4.1	Análise dos pacientes com HPB e sem uso de sonda vesical.....	32
4.2	Perfil de expressão dos marcadores de crescimento, inflamação e angiogênese em pacientes fazendo uso de sonda vesical de demora.....	35
4.3	Análise comparativa entre pacientes com sonda vesical <i>versus</i> sem sonda vesical.....	37
5	DISCUSSÃO.....	40
6	CONCLUSÕES.....	53
7	REFERÊNCIAS.....	55
	Apêndice.....	64

Lista de Abreviaturas

PSA- Antígeno Prostático Específico

HPB- Hiperplasia Prostática Benigna

IL- Interleucina

TGF β - Fator de crescimento transformador beta

B2M- beta-2-microglobulina

qRT-PCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA- Ácido Ribonucleico

cDNA- Ácido Desoxirribonucleico complementar

FC- Fatores de Crescimento

STUI- Sintomas do Trato Unirário Inferior

RUA- Retenção Urinária Aguda

DHT- diidrotestosterona

RA- Receptores Androgênicos

EGF- Fator de Crescimento Epidérmico

FGF2- Fator de Crescimento de Fibroblasto2

IGF I e II- Fatores de Crescimento Semelhantes a Insulina I e II

PDF- Fator Derivado da Próstata

VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular

PDGF- Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	<i>Primers</i> utilizados para quantificação da expressão dos fatores de crescimento, inflamação e angiogênese na HPB..	16
Tabela 2 -	Características demográficas dos pacientes do grupo controle.....	23
Tabela 3 -	Nível de expressão relativa dos genes em relação ao tempo de duração dos sintomas até o tratamento cirúrgico.....	25
Tabela 4 -	Expressão média dos genes em relação à idade.....	27
Tabela 5 -	Expressão média dos genes em relação ao tamanho prostático.....	28
Tabela 6 -	Expressão média dos genes em relação ao nível de PSA.....	29
Tabela 7 -	Expressão média dos genes em relação à presença ou ausência de prostatite associada à HPB.....	30
Tabela 8 -	Expressão média do IGF1 em relação aos outros fatores.....	31
Tabela 9 -	Características demográficas dos pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para HPB que não estavam em uso de sonda vesical.....	33
Tabela 10 -	Nível de expressão dos genes em relação ao tamanho da próstata e presença de prostatite.....	35
Tabela 11 -	Nível de expressão dos genes em relação ao tamanho da próstata e presença de prostatite nos pacientes que utilizavam sonda vesical.....	37
Tabela 12 -	Características demográficas dos pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para HPB (casos) que estavam e que não estavam em uso de sonda vesical.....	38
Tabela 13 -	Comparação da expressão dos genes entre os pacientes com e sem uso de sonda vesical de demora.....	39

Lista de Figuras

Figura 1 -	Sistema TaqMan de PCR.....	20
Figura 2 -	Nível de expressão de EGF, FGF2, IGF1, TGF β 1, PDF, IL-6, IL-8, VEGF, CD105, IL-2 e IL-17 em pacientes com HPB em relação ao tecido prostático do grupo controle.....	24
Figura 3 -	Nível de expressão relativa de EGF, FGF2, IGF1, TGF β 1, PDF, IL-6, IL-8, VEGF, CD105, IL-2 e IL-17 em pacientes com HPB sem uso de sonda em relação ao tecido prostático do grupo controle.....	34
Figura 4 -	Perfil de expressão dos marcadores de crescimento, inflamação e angiogênese em pacientes com HPB fazendo uso de sonda vesical de demora em relação ao tecido de próstata do grupo controle.....	36

Resumo

Biolo KD. *Análise do perfil de expressão de fatores de crescimento e sua relação com marcadores de inflamação e angiogênese na etiopatogenia da hiperplasia prostática benigna* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: A HPB é a neoplasia benigna mais comum no homem. Embora amplamente estudada, a patogênese da HPB não foi totalmente elucidada. Fatores de crescimento são proteínas que regulam o crescimento, a diferenciação e morte celular programada. Estudos têm demonstrado que eles interagem com marcadores de inflamação e angiogênese na próstata e simulam a resposta que ocorre no processo de cicatrização de tecidos. Avaliamos o perfil de expressão de FC e marcadores de inflamação e angiogênese no tecido prostático de pacientes com próstata aumentada em relação ao grupo controle com próstata de tamanho normal. **MÉTODO:** Foram analisados tecidos prostáticos congelados de 62 pacientes submetidos à ressecção transuretral da próstata ou cirurgia aberta para tratamento da HPB. O grupo controle foi composto por amostras de tecido de 8 pacientes com próstata de pequeno volume (menor do que 40 gramas) obtidas por ressecção transuretral. Os níveis de expressão dos FC (EGF, FGF2, PDF, TGF β 1, IGF1), de angiogênese (VEGF, CD105) e de inflamação (IL-2, IL-6, IL-8 e IL-17) foram avaliados por reação de cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (qRT-PCR). A análise de subgrupo de pacientes com e sem uso de sonda vesical de demora antes da cirurgia bem como a correlação da expressão com variáveis clínico-demográficas (volume prostático, PSA, presença de prostatite, idade e tempo de sintoma) foram realizadas. **RESULTADOS:** Encontramos superexpressão de todos os fatores de crescimento, marcadores de inflamação e angiogênese nos 62 pacientes com HPB em relação ao grupo controle. Verificamos na análise de subgrupo que a presença da sonda vesical parece induzir o aumento da expressão de FGF2, IGF1, TGF β 1, IL-8 e VEGF. Estes dois últimos apresentaram-se ainda mais superexpressos em pacientes com prostatite associada a HPB. Pacientes com expressão de IGF1 acima da média também apresentaram expressão aumentada de outros fatores de crescimento (FGF2, TGF β 1, CD105 e IL-2). E, também, o nível de expressão de IGF1 foi maior em pacientes com idade superior a 65 anos em relação aos mais jovens. VEGF apresentou maior superexpressão em pacientes com menos de 1 ano de sintomas do trato inferior e a IL-6 mostrou maiores níveis de expressão em pacientes com tempo de sintoma acima de 1 ano. A IL-2 mostrou-se ainda mais superexpressa no subgrupo de pacientes com sonda vesical e próstata maior do que 60g. **CONCLUSÃO:** Encontramos uma superexpressão geral de todos os FC, marcadores de angiogênese e inflamação nos pacientes com HPB e próstatas maiores do que 40g comparado ao grupo controle. Além disso demonstramos pioneiramente que o uso da sonda vesical pode aumentar a expressão dos FC (FGF2, IGF1 e TGF β 1) de VEGF e também da IL-8.

Descritores: fatores de crescimento; marcadores de inflamação, hiperplasia prostática benigna, expressão gênica, reação em cadeia da polimerase

Summary

Biolo KD. *Analysis of the expression profile of growth factors and their relationship with markers of inflammation and angiogenesis in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

INTRODUCTION: BPH is the most common benign tumor in men. Although widely studied, the pathogenesis of BPH has not been fully elucidated. Growth factors (GF) are proteins that regulate growth, differentiation, and programmed cell death. Studies have shown that they interact with markers of inflammation and angiogenesis in prostate and simulate the response that occurs in the tissue healing process. We evaluate the FC expression profile and inflammation and angiogenesis markers in prostate tissue from patients with enlarged prostate compared to the control group with normal sized prostate. **METHOD:** Frozen prostate tissues were analyzed from 62 patients who underwent transurethral resection of the prostate or open surgery for treating BPH. The control group was composed of tissue samples from 8 patients with small prostate volume (less than 40 grams) obtained by transurethral resection. The expression levels of GF (EGF, FGF2, PDF, TGF β 1, IGF1), angiogenesis (VEGF, CD105) and inflammatory (IL-2, IL-6, IL-8 and IL-17) were evaluated by reaction Polymerase chain quantitative real-time (qRT-PCR). The subgroup analysis of patients with and without use of indwelling urinary catheter before surgery as well as the correlation of expression with clinical and demographic variables (prostate volume, PSA, presence of prostatitis, age and symptom of time) were performed. **RESULTS:** We found overexpression of all growth factors, inflammation and angiogenesis markers in the 62 patients with BPH compared to the control group. We found in subgroup analysis that the presence of urinary catheter seems to induce increased FGF2, IGF1, TGF β 1, IL-8 and VEGF expression. These latter had become even more overexpressed in patients with BPH associated with prostatitis. Patients with IGF1 expression above the average also showed increased expression of other GF (FGF2, TGF β 1, IL-2 and CD105). And also, the level of IGF1 expression was higher in patients older than 65 years compared to younger patients. VEGF overexpression was higher in patients with less than 1 year of lower tract symptoms and IL-6 showed higher expression levels in patients with symptoms over 1 year of length. IL-2 was shown to be overexpressed in further subgroup of patients with bladder catheter and prostate greater than 60g size. **CONCLUSION:** We found a general overexpression of all GF, markers of angiogenesis and inflammation in patients with BPH and prostates larger than 40g compared to the control group. Also demonstrated pioneered that the use of indwelling catheter can increase the expression of GF (FGF2, IGF1 and TGF β 1), VEGF and IL-8 as well.

Descriptors: Growth Factors; Inflammatory markers; Benign Prostatic Hyperplasia; Gene Expression; Polymerase Chain Reaction

1. INTRODUÇÃO

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é a neoplasia benigna mais comum nos homens. Aos 60 anos mais da metade dos homens apresentam evidência histológica de HPB e, virtualmente todos por volta dos 80 anos serão acometidos (Berry, 1984). Aproximadamente 50% dos homens irão, em algum momento, queixar-se de sintomas do trato urinário inferior (STUI) secundários à HPB, os quais podem comprometer significativamente a qualidade de vida por alterar os padrões do sono e as atividades diárias (Welch, 2002). Ademais, a HPB na maioria das vezes é uma doença crônica e progressiva que se não for adequadamente tratada pode levar à hematúria, infecção urinária recorrente e retenção urinária aguda (RUA) (Emberton, 2003).

Apesar de amplamente estudada, a etiopatogenia da HPB ainda não foi totalmente elucidada. Como a HPB não ocorre em homens castrados antes da puberdade (Scott, 1953), imaginou-se, inicialmente, que os quadros de hiperplasia benigna pudessem resultar da produção exagerada de testosterona. Esta ideia prevaleceu por pouco tempo, uma vez que vários estudos demonstraram que os níveis séricos deste hormônio declinam com a idade e na maior parte das vezes a próstata continua crescendo (Partin, 1991; Vermeulen, 1989).

Os efeitos da testosterona na próstata se fazem através da enzima 5 α -redutase, localizada ao nível da membrana nuclear. Por ação desta enzima, a testosterona é convertida em 5 α -dihidrotestosterona (DHT), que se liga a receptores androgênicos (RA) presentes no núcleo (Griffiths, 1993; Habib, 1994). Análises de tecido prostático em casos de HPB demonstraram que as concentrações locais de DHT são 3 a 4 vezes maiores do que em glândulas normais (Walsh, 1983). Esta união produz alteração da conformação dos RA,

expondo segmentos de sua molécula com capacidade de se ligar a cadeia de DNA, em pontos próximos ou dentro dos genes sensíveis aos andrógenos (Page, 1982; Carson-Jurica, 1990). Esta ligação funciona como fator de iniciação da transcrição destes genes, com consequente síntese de proteínas que modulam a proliferação e a secreção das células prostáticas. A intervenção da DHT e da 5 α -redutase na gênese da HPB é corroborada pela regressão dos sintomas e do volume prostático quando inibidores desta enzima (finasterida e dutasterida) são utilizados nestes casos (Gormley, 1992; PLESS, MTOPS e CombAT). No entanto, de forma curiosa, a adição de DHT a meios de cultura contendo exclusivamente células epiteliais da próstata não estimula a atividade mitogênica nem a proliferação destas células (Chaproniere, 1986). Esta observação levou à pesquisa de outros fatores que pudessem modular a multiplicação das células prostáticas e a gênese da HPB.

1.1. Fatores de crescimento

FC são proteínas que regulam o crescimento, a diferenciação e a morte celular programada (apoptose). Foi demonstrado que os mesmos são produzidos pelas células estromais da próstata e atuam através de mecanismos autócrinos e parácrinos exercendo uma potente ação estimuladora sobre a proliferação in vitro destas células (Steiner, 1995; Cohen, 1994). Esses mecanismos fazem com que as células inter-relacionem-se e promovam sua auto-regulação assim como a regulação de sua vizinhança. De acordo com esses conceitos, os quadros de HPB estão implicados com um desequilíbrio da relação estroma-epitelial, instalando-se um perfil funcional bastante parecido

com aquele observado no período fetal, onde as células do estroma exercem importante ação indutiva e estimuladora da proliferação epitelial (Roleau, 1990). Este possível mecanismo etiopatogênico da HPB recebeu de McNeal a denominação de “redespertar da capacidade embriônica” (Mcneal, 1978).

Vários FC foram estudados in vitro, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), e os fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFI, IGFI), todos eles evidenciando atividade mitogênica no tecido prostático, inclusive mais potente que a DHT. Estudos experimentais e clínicos demonstraram que estes peptídeos e seus receptores celulares específicos são em geral encontrados em maiores quantidades nas glândulas com hiperplasia do que em próstatas normais, e provavelmente orquestram a proliferação celular anormal observada nos casos de HPB (Steiner, 1995; Gregory, 1986; Mori, 1990; Lucia, 2008; Neuhaus, 2008). Por outro lado, Fatores inibidores da proliferação celular como o fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), e mais recentemente o fator derivado da próstata (PDF), membro da superfamília do TGF β , também foram identificados (Klinger, 1999; Kakehi, 2004; Taoka, 2004). Evidências sugerem que a sub-regulação do PDF no tecido prostático pode influenciar a resposta inflamatória e potencializar os sintomas e a progressão da doença (Lucia, 2008).

Portanto, o desenvolvimento da HPB resulta, provavelmente, de um desequilíbrio mais complexo onde tomam parte FC estimuladores e inibidores. Além da atividade exagerada dos FC facilitadores citados anteriormente, fatores inibidores com atuação restritiva como o TGF β e PDF também participam do processo. A ausência ou a atenuação da expressão destes fatores de restrição ao crescimento prostático poderia representar um dos mecanismos de

aparecimento de HPB. Segundo Coffey e Walsh (1990), nas fases iniciais de desenvolvimento da HPB haveria uma predominância dos estímulos responsáveis pela proliferação celular, e nas fases mais avançadas deste processo existiria uma menor atividade dos fatores responsáveis pela morte celular programada.

Estudos recentes apontam cada vez mais a importância da interação dos fatores de crescimento com os andrógenos. Pacientes com resistência periférica as insulinas apresentam risco aumentado de hiperplasia da próstata visto que a hiperinsulinemia estimula o fígado a produzir mais IGF, o qual liga-se ao seu receptor no tecido prostático e estimula o crescimento do mesmo (Wang, 2011). Estudo com camundongos mostrou que os animais com nível de testosterona normal e induzidos a hipoinsulinemia apresentaram pequeno crescimento prostático. Ao contrário os animais com níveis normais ou alto de testosterona e hiperinsulinêmicos devido a dieta com alto teor de gordura apresentaram grande crescimento da próstata. Do mesmo modo os animais submetidos a esta mesma dieta e posteriormente castrados voltaram a apresentar baixo crescimento da glândula (Vikram, 2011). Estudo recente em ratos, demonstrou que os níveis de FGF2 podem ser influenciados pela obesidade. A próstata ventral dos ratos submetidos a dieta com alto teor calórico (obesos) apresentou expressão até 150% maior na comparação com os controles (dieta controlada). A administração de estrogênio aumentou ainda mais os níveis de FGF2 nestes ratos. Este modelo experimental de obesidade/resistência insulínica podem explicar a alta frequência de hiperplasia prostática em homens com obesidade e diabetes (Ribeiro, 2011).

Durante o Diabetes tipo II, as células beta produzem grande quantidade de insulina para tentar contrabalançar a resistência do receptor de insulina nos diversos tecidos, a fim de aliviar a hiperglicemia. A hiperinsulinemia resultante tem demonstrado estímulo ao crescimento de numerosos tecidos. Vikram (2010) demonstrou aumento na proliferação do tecido epitelial prostático em ratos com resistência a insulina, graças ao estímulo ao crescimento gerado pela insulina. Em complemento, modelos de camundongos com hipoinsulinemia demonstraram um significativo decréscimo no crescimento prostático (Vikram, 2008). Confirmando o papel da hiperinsulinemia no crescimento prostático mais do que o diabetes em geral, modelos de diabetes tipo I não demonstraram efeito no crescimento prostático (Yono, 2008).

Apesar destes dados, a relação exata dos níveis teciduais dos FC com o desenvolvimento e progressão da HPB, assim como a forma como eles atuam na próstata permanece, até o momento, pouco clara (Jacobsen, 2007). Dessa forma, novos estudos que tentem avaliar os mecanismos envolvidos com a expressão dos FC em pacientes com HPB são necessários.

1.2. Reação inflamatória local

A presença de quadro inflamatório e infiltrativo celular proeminente em cerca da metade dos espécimes prostáticos removidos cirurgicamente suscitou a possibilidade de que os quadros de HPB pudessem resultar de uma ação imunológica celular local (Theyer, 1992). Embora a presença de infiltrados inflamatórios em próstata humanas seja uma situação bem descrita, sua origem ainda é incerta. Diferentes patógenos são descritos, incluindo infecções

bacterianas, refluxo de urina com inflamação química, fatores dietéticos, hormônios, resposta autoimune ou o que seria mais plausível: a combinação de todos estes fatores.

Linfócitos-T efetores são encontrados próximos aos dutos prostáticos, e o número destas células é cerca de seis vezes maior em homens com mais de 55 anos do que em jovens. Este achado poderia indicar que com o passar dos anos surge na próstata um fenômeno auto-imune gerado por algum antígeno específico local ainda não identificado (Kramer, 2007). Como consequência, o microambiente que circunda as células epiteliais da próstata seria inundado por linfocinas. Um estudo austríaco forneceu evidências de que os linfócitos T são ativados cronicamente, assim possivelmente lesionando o tecido, levando a regeneração e contribuindo para a patogênese da HPB (Steiner, 1994). A próstata, como o intestino e o pulmão, é considerada um órgão imunocompetente. No tecido prostático normal os infiltrados periglandulares são compostos em até 70% das vezes por linfócitos CD8+. Com o passar da idade os padrões da infiltração inflamatória na próstata tornam-se diferentes. Steiner et al (2003) mostraram que na idade adulta o infiltrado inflamatório é representado em 70-80% por linfócitos CD3+, linfócitos B CD19 ou CD20 em 15-20% e 15% de macrófagos. Há uma inversão na razão CD8/CD4, sendo que a maioria das células T nas áreas de inflamação passam a expressar a molécula CD4.

Diversos marcadores inflamatórios apresentam uma expressão aumentada em pacientes com HPB, corroborando com a hipótese de um processo inflamatório como possível fator etiopatogênico da doença. A expressão de citocinas, como a interleucina (IL-8), secretada pelas células T

ativadas e células estromais da próstata, está aumentada em tecidos com HPB e pode promover proliferação de células epiteliais e estromais direta ou indiretamente (Giri, 2001; Konig, 2004). A IL-8 também parece induzir a produção de FGF2 pelas células estromais prostáticas adjacentes via aumento da expressão de RNAm do FGF2 (Castro, 2004). Também atua como importante fator angiogênico e esta atividade parece ser muito importante para sustentar o aumento da massa da zona de transição prostática (Giri, 2001). Outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-2, IL-4 e IL17 podem estar super-expressas de 10 a 13 vezes no tecido prostático de pacientes com HPB e influenciar direta ou indiretamente a produção de FC (Kramer, 2002; Steiner, 2003).

Estudos clínicos recentes analisaram o impacto da inflamação aguda e crônica identificada através de biópsia na probabilidade de progressão clínica da HPB. Uma análise do grupo placebo do MTOPS (*Medical Therapy of Prostatic Symptoms Study*) envolvendo 1198 homens seguidos por 4,5 anos e comparando os indivíduos com e sem inflamação no tecido prostático (obtido através de biópsia), revelou que os pacientes com inflamação eram mais velhos, apresentavam glândulas maiores (41,1 vs 36,8 ml) e possuíam PSA mais elevado (3,3 vs 2,5 ng/ml). Ademais, durante a evolução desses casos, os homens com inflamação apresentaram aumento do escore de sintomas urinários com mais frequência (13,7% vs 11,2%), necessitaram mais vezes de tratamento cirúrgico (21% vs 13,2%), e apenas homens com inflamação apresentaram retenção aguda de urina (5,6% vs 0%) (Roehrborn, 2005).

No entanto, embora a hipótese de que fatores imunológicos estariam implicados com HPB seja atraente e racional, não existem no momento dados que permitam comprová-la de forma inequívoca.

1.3. Fatores Angiogênicos

A angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos existentes, é reconhecida como um importante processo no crescimento de tumores, inflamação e cicatrização. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um homólogo do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) é o principal fator envolvido na neoformação vascular e tem sido observado nas células estromais da HPB (Jackson, 1997). Sua produção é estimulada principalmente por condições de hipóxia, mas outros fatores de crescimento e especialmente o FGF2 podem levar a sua superexpressão. FGF2, FGF7 e TGF β também foram identificados como estimuladores da angiogênese. Como exemplo verificou-se que o FGF2 pode estimular a produção celular de VEGF (Doll, 2001; Nikolaos, 2006). Botelho e cols (2010), mostrou não haver diferença na expressão de VEGF quando comparado o anátomo-patológico de 186 pacientes com HPB, prostatite e câncer após realização de biópsia prostática, não podendo ser este marcador indicativo diagnóstico de nenhuma destas três patologias segundo o estudo.

Finalmente, um grande e recente número de evidências experimentais mostram que a Endoglin (CD105), uma glicoproteína transmembrana que funciona como co-receptor para o TGF β , é expressa nas células endoteliais tanto de vasos sanguíneos maduros quanto imaturos (Svatek, 2008). O CD105 está superexpresso em tecidos que apresentam angiogênese como aqueles em processo de regeneração, inflamação ou em tumores. Funcionalmente, o CD105 promove angiogênese não somente pela ativação das rotas de proliferação endotelial, mas também ativa a sinalização anti-apoptótica em células endoteliais

hipóxicas, sendo capaz de atuar independentemente da rota de sinalização do TGF β . Mutações do gene da endoglin são associadas com a ocorrência de telangiectasias hemorrágicas hereditárias ou síndrome de Osler-Weber-Rendu (Dallas, 2008). Apesar da importância desse fator angiogênico e da tentativa de criação de terapias alvo que inibam a ação do CD105 em tumores, não foram identificados na literatura estudos em hiperplasia prostática benigna.

Justificativa

Pelo exposto acima, fica claro que as relações existentes entre os FC, o processo inflamatório local, os marcadores de angiogênese e a HPB são pouco conhecidas. As citocinas produzidas pelas células inflamatórias devem influenciar a produção local de FC e de angiogênese no tecido prostático, simulando a resposta que ocorre no processo de cicatrização de feridas (Lucia, 2008). Assim, o conhecimento adequado do comportamento dos FC implicados no desenvolvimento da HPB e sua interação com os marcadores de inflamação e angiogênese, pode contribuir para um melhor entendimento da etiopatogenia e para o encontro de novas terapias alvo que possam combater ou mesmo prevenir a ocorrência desta doença.

2. OBJETIVOS

Primário

Avaliar o perfil de expressão dos FC e os marcadores de inflamação e angiogênese no tecido prostático de pacientes com diagnóstico de HPB em relação ao grupo controle sem HPB.

Secundário

Avaliar o perfil de expressão dos FC e dos marcadores de inflamação e angiogênese no grupo de pacientes com HPB de acordo com outras características clínicas (Idade, tempo de sintoma, PSA sérico, volume prostático, uso de sonda vesical e presença de prostatite no anátomo-patológico do material ressecado).

Tentar estabelecer uma relação de expressão entre o IGF-1 com os demais marcadores analisados

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Estudo prospectivo e controlado utilizando amostras teciduais de próstata em pacientes com diagnóstico de HPB submetidos a tratamento cirúrgico.

3.2 Local e época

O estudo foi desenvolvido no laboratório de investigação Médica 55 (LIM-55) e divisão de Urologia do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), sendo executado entre março de 2010 e março de 2013.

3.3 Sujeitos

Foram analisadas amostras de tecido prostático de 62 pacientes com diagnóstico de HPB. O grupo controle foi representado por fragmentos de tecido prostático de próstatas de pequeno volume de 8 pacientes submetidos a ressecção transuretral de próstata, coletados também no HCFMUSP. Em relação ao volume prostático escolhido para comparação entre o grupo de estudo e grupo controle optou-se pela linha divisória de 40g já que importantes estudos mostram que é especialmente a partir deste peso prostático que os pacientes apresentam sintomas do trato inferior (STUI) mais pronunciados e também são estes pacientes com próstatas maiores que apresentam melhores respostas aos diversos agentes terapêuticos usados na prática clínica diária. (MTOPS 2003; CombAT 2011).

Foram excluídos da análise os pacientes submetidos à biópsia prostática previamente à cirurgia e os pacientes que faziam uso de inibidores da enzima 5 α -redutase (dutasterida e finasterida) e anti-inflamatórios devido as alterações sabidamente provocadas pelo procedimento e pelas medicações citadas na homeostase prostática.

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. Este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisas desta instituição sob o protocolo número 0863/11

3.4 Intervenção

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Os pacientes foram submetidos à ressecção transuretral da próstata (RTU-P).

Os fragmentos retirados foram imediatamente colocados em solução estabilizadora de RNA (RNA later, Applied Biosystems), e encaminhados para o laboratório de investigação médica da disciplina de urologia do HCFMUSP, onde foram processados.

Os fragmentos congelados foram utilizados para análise da expressão dos genes através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os genes analisados foram: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator2 de crescimento de fibroblastos (FGF2), fator derivado de próstata (PDF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF1), fator de crescimento de transformador β 1 (TGF β 1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), endogлина (CD105) e as interleucinas 2, 6, 8 e 17. Os primers

utilizados para expressão dos genes estão expostos na tabela 1. O controle endógeno utilizado para expressão dos genes foi a beta-2-microglobulina (B2M) e o GAPDH, genes de baixa variação de expressão na próstata usados como controles internos em diversos estudos (Floriano-Sánchez 2009; MA W 2014).

Tabela 1. Primers utilizados para quantificação da expressão dos fatores de crescimento, inflamação e angiogênese na HPB.

Genes	Identificação do ensaio
EGF	Hs01099999_m1
FGF-2	Hs00266645_m1
IGF-1	Hs01547656_m1
TGF β 1	Hs00998133_m1
PDF	Hs00223487_m1
IL-6	Hs00985639_m1
IL-8	Hs00174103_m1
IL-2	Hs00174114_m1
IL-17	Hs00174383_m1
VEGF	Hs00900055_m1
CD105	Hs00923996_m1
GAPDH	Hs02758991_g1
B2M	Hs99999907_m1

Além da comparação dos níveis dos genes estudados entre os pacientes com HPB e os com próstatas de tamanho normal, outras análises foram realizadas comparando níveis de expressão em subgrupos de pacientes com HPB de acordo com suas características clínico-patológicas: presença ou ausência de prostatite no anátomo-patológico, tamanho da próstata (< ou > de 60 gramas), nível de PSA (< ou > de 2,5ng/ml), tempo de sintoma (< ou > que 1 ano), idade (<= ou > que 65 anos) e uso de sonda vesical de demora. Dos 62 pacientes analisados, 28 estavam em uso de sonda vesical de demora e 34 pacientes não faziam uso da mesma. Após análise conjunta inicial dos pacientes

com HPB em relação ao tecido de próstatas com tamanho normal, foi realizada uma análise em separado dos pacientes com e sem o uso de sonda, por ser esta um potencial fator modificador da expressão dos genes avaliados.

3.5 Extração do RNA

Para extração do RNA, utilizamos amostras de tecido prostático que foram enviados a fresco e estocadas em freezer -80° até o processamento.

Os espécimes congelados a -80°C foram macerados e colocados em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril. O RNA foi isolado com o kit mirVana (Ambion®) de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA. Ao tubo foram então adicionados 500 µl do tampão de lise (10 vezes o volume da massa tumoral) e 50 µl do aditivo de homogeneizar e a solução foi deixada 10 min no gelo. Foram então adicionados 500 µl de fenol-clorofórmio e as amostras foram vortexadas e centrifugadas na velocidade máxima (14.000 RPM) por 5 min em temperatura ambiente. A fase aquosa foi então removida para um novo tubo e foi adicionado um terço do volume de etanol 100%. Então a solução foi transferida para um filtro e centrifugada a 10.000 g por 15 seg. No filtro que contém o RNA total foi feita uma lavagem com 700 µl de wash solution 1/3, e as amostras foram centrifugadas por 10 seg a 10.000 g. Foram feitas então duas lavagens com 500 µl de wash solution 2/3, e nos intervalos as amostras foram centrifugadas por 10 seg a 10.000 g. O filtrado foi então descartado e foram adicionados 100 µl de água RNase free a 95°C aos tubos contendo RNA e as amostras foram novamente

centrifugadas a 10.000g por 10 seg. O filtrado contendo o RNA foi então armazenado em freezer -80°C até ser utilizado.

A concentração e pureza do RNA foram estimadas em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280 nM).

3.6 Transcrição reversa (RT)

A síntese de cDNA foi realizada a partir 20 µl de RNA utilizando-se a enzima Multiscribe™ transcriptase reversa e iniciadores randômicos (Applied Biosystems).

O RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20 µL. A este volume foram acrescentados 2 µL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6 µL do mix de dNTPs (100 mM), 2 µL do tampão da enzima (10X), e 8,4 µl de água RNA/DNA nucleasefree. As soluções foram então submetidas a ciclos de temperaturas em equipamento de PCR Veriti (Applied Biosystem, Foster City, CA), seguindo os seguintes parâmetros: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C e 5 min a 85°C. Após o termino dos ciclos o cDNA foi armazenado a -20°C até o uso.

3.7 Análise de expressão de genes por PCR em tempo real quantitativo

As reações foram realizadas no termociclador ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, CA, EUA) no modo standard. Para quantificação das amostras foi utilizado o reagente TaqMan® (figura 1) (Applied Biosystems, CA, EUA).

Para amplificação dos fragmentos desejados as reações foram feitas com 0,5 µl de uma solução contendo um par de primer e a sonda (com a marcação), 5 µl do TaqMan Master Mix, 3,5 µl de água nucleasse free e 1 µl de cDNA, somando um total de 10 µl para cada reação. As condições das reações foram: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C. O nível de expressão dos genes foi obtido pela quantificação relativa e dos níveis de expressão em vezes determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Este método utiliza a seguinte fórmula: $\Delta\Delta CT = (CT \text{ do gene alvo, amostra de HPB} - CT \text{ do controle endógeno, amostra de HPB}) - (CT \text{ do gene alvo, amostra de tecido normal} - CT \text{ do controle endógeno, amostra de tecido normal})$. O número de vezes que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001). No gráfico logarítmico, esse método padroniza a expressão do controle normal como uma linha basal (representada pelo número 1) e a expressão relativa de cada gene para cada amostra de HPB é demonstrada em vezes o normal para mais nos casos de superexpressão e para menos nos de subexpressão.

Figura 1: Sistema TaqMan®: Este protocolo utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela *Taq* polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* da fluorescência emitida que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite então a detecção do produto do PCR em tempo Real (Fonte: Tese Dra. Sabrina Reis).

3.8 Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado o software SPSS 19.0. Para comparação da expressão dos genes com as variáveis clínicas nós utilizamos o Teste T de Student para variáveis homogêneas, e Mann-Whitney para variáveis não homogêneas. Para valores de escala nominal utilizamos o chi-quadrado.

Em toda análise estatística foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram p-valor inferior ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS

A tabela 2 representa as características dos oito pacientes do grupo controle e as características demográficas dos 62 pacientes com HPB (casos). No grupo controle a idade média foi de 59 anos, o nível médio do PSA de 1,51 ng/ml e o tamanho médio da próstata de 28g. Desses oito pacientes, cinco apresentavam hipertrofia do colo vesical, sendo esta a causadora dos sintomas e da indicação cirúrgica. Portanto o grupo controle constituiu-se de pacientes com HPB incipiente. Nenhum deles apresentou prostatite no anátomo-patológico e cinco estavam com sintomas do trato urinário inferior há mais de um ano antes de terem sido submetidos a procedimento endoscópico de ressecção transuretral. Já no grupo de casos a idade média foi de 69 anos, o nível médio do PSA foi de 6,2 ng/ml e o tamanho prostático 84,2g. A presença de prostatite no anátomo-patológico dos pacientes submetidos a cirurgia para tratamento da HPB foi observada em 34% do total de nossa casuística. Comparando casos versus controle encontramos diferenças significativas no tamanho prostático, nível de PSA e idades dos pacientes (tabela 2).

Tabela 2. Características demográficas dos pacientes do grupo controle.

Total de controles (N=8)			
	Controle	Casos (n=62)	p
Idade (anos)			
Média	59,13	69,2	0,003*
Desvio padrão	8,00	8,90	
PSA (ng/mL)			
Média	1,51	6,33	0,004**
Desvio padrão	0,83	7,34	
Tamanho da próstata(g)			
Média	29,37	84,21	0,000**
Desvio padrão	6,23	43,94	
Presença de sonda vesical			
Sim	0(0%)	28(45%)	-
Não	8(100%)	34(55%)	
Presença de prostatite			
Sim	0(0%)	21(34%)	-
Não	8(100%)	41(56%)	
Tempo de sintoma			
>1 ano	5(62%)	33(53%)	0,700***
≤ 1 ano	3(38%)	29(47%)	

*Teste T de Student ** Teste de Mann-Whitney *** Teste de Qui-quadrado

A análise da expressão de todos os genes nos pacientes com HPB em comparação ao grupo controle está demonstrado na figura 2. Encontramos um padrão de superexpressão em todos os casos analisados de HPB em relação ao grupo controle com próstatas de pequeno volume, de todos os fatores de crescimento, angiogênese e inflamação, com exceção da IL-17. A análise desta interleucina ficou prejudicada pois sua expressão ocorreu em pouco mais da metade da casuística estudada. Ressaltando que no gráfico apresentado na figura 2 a linha de base (linha que passa pelo número 1) representa a média de expressão dos fatores de crescimento no grupo controle e cada coluna

representa o nível de expressão dos fatores em estudo em cada um dos pacientes.

Na sequência do trabalho serão mostradas as particularidades de expressão dos genes nos 34 pacientes com HPB sem uso de sonda e, logo após, nos 28 pacientes com HPB e que faziam uso de sonda vesical antes do tratamento cirúrgico.

Figura 2. Nível de expressão de EGF, FGF2, IGF1, TGFB1, PDF, IL-6, IL-8, VEGF, CD105, IL-2 e IL17 em pacientes com HPB em relação ao tecido prostático do grupo controle.

Quando realizada a análise interina dos 62 pacientes com HPB e próstatas maiores que 40g em relação ao tempo decorrido do início dos sintomas do trato inferior até o tratamento cirúrgico, na comparação entre maior ou menor do que 1 ano, obteve-se o resultado conforme tabela 3.

Tabela 3. Nível de expressão relativa dos genes em relação ao tempo de duração dos sintomas até o tratamento cirúrgico.

Genes	Tempo de sintoma	N	Expressão média (DP)	p
EGF	< 1 ano	24	46,85 (197,56)	0,471**
	> 1 ano	32	6,12 (9,21)	
FGF2	< 1 ano	28	16,88 (50,23)	0,310**
	> 1 ano	32	5,46 (4,78)	
IGF1	< 1 ano	28	22,97 (55,27)	0,239**
	> 1 ano	32	8,02 (14,07)	
TGFB1	< 1 ano	28	4,45 (10,50)	0,073**
	> 1 ano	32	1,48 (1,32)	
PDF	< 1 ano	28	3,85 (5,23)	0,189**
	> 1 ano	32	1,70 (2,56)	
IL6	< 1 ano	28	27,28 (59,27)	0,008**
	> 1 ano	32	137,83 (515,27)	
IL8	< 1 ano	28	21,77 (27,38)	0,988*
	> 1 ano	31	21,98 (63,72)	
VEGF	< 1 ano	28	12,48 (33,71)	0,017**
	> 1 ano	32	2,01 (2,00)	
CD105	< 1 ano	28	3,46 (5,19)	0,846**
	> 1 ano	32	2,38 (2,34)	
IL2	< 1 ano	24	9,55 (23,91)	0,710**
	> 1 ano	24	2,54 (4,22)	
IL17	< 1 ano	15	6,38 (12,96)	0,546*
	> 1 ano	17	17,60 (67,54)	

*Teste T de Student ** Teste de Mann-Whitney

Percebe-se que a IL-6 apresentou expressão significativamente maior nos pacientes com sintomas há mais de 1 ano em relação aos pacientes com duração mais curta dos sintomas até a cirurgia. O VEGF apresentou maior expressão naqueles pacientes com menos de um ano de tempo dos sintomas.

Quando comparados os mesmos pacientes em relação a idade (maior ou menor do que 65 anos), IGF1, EGF e VEGF apresentaram uma expressão média cerca de 4 vezes maior nos pacientes mais idosos, apesar desses resultados não demonstrarem significância estatística.

O IGF-1 apresentou significância estatística com p de 0,016, mostrando maior elevação de seus níveis (cerca de 4x maior) nos pacientes com mais de 65 anos de idade. Os demais genes não diferiram sua expressão entre os dois grupos. Estes dados estão expostos na tabela 4.

Tabela 4. Expressão média dos genes em relação a idade.

Genes	idade 65 anos	N	Expressão média	p
EGF	< = 65	22	5,30 (5,06)	0,437*
	> 65	36	31,21 (154,53)	
FGF2	< = 65	22	4,92 (6,84)	0,362*
	> 65	40	12,95 (40,52)	
IGF1	< = 65	22	4,72 (7,35)	0,016**
	> 65	40	19,16 (45,99)	
TGFB1	< = 65	22	1,34 (1,19)	0,263*
	> 65	40	3,42 (8,57)	
PDF	< = 65	22	2,70 (4,74)	0,838*
	> 65	40	2,48 (3,60)	
IL6	< = 65	22	212,33 (633,13)	0,791
	> 65	40	18,11 (48,54)	
IL8	< = 65	21	29,72 (76,22)	0,337*
	> 65	40	16,69 (28,23)	
VEGF	< = 65	22	2,97 (2,91)	0,361*
	> 65	40	8,42 (27,55)	
CD105	< = 65	22	2,22 (2,96)	0,402*
	> 65	40	3,08 (4,30)	
IL2	< = 65	18	1,92 (1,87)	0,548**
	> 65	31	7,85 (20,49)	
IL17	< = 65	14	25,11 (76,43)	0,447**
	> 65	18	3,04 (7,46)	

*Teste T de Student ** Teste de Mann-Whitney

Em relação as outras variáveis clínicas estudadas não houve diferenças significativas na expressão dos genes em relação ao tamanho da próstata (maior ou menor que 60g) e ao nível de PSA (maior ou menor que 2,5ng/ml) conforme mostrado nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Expressão média dos genes em relação ao tamanho prostático.

Genes	Tamanho da Próstata	N	Expressão média	P
EGF	< 60 g	25	5,022 (5,40)	0,378*
	> 60 g	33	33,78 (161,34)	
FGF2	< 60 g	25	4,58 (6,44)	0,281*
	> 60 g	37	13,83 (42,05)	
IGF1	< 60 g	25	9,22 (20,07)	0,413*
	> 60 g	37	17,29 (45,93)	
TGFB1	< 60 g	25	1,35 (1,49)	0,219*
	> 60 g	37	3,58 (8,86)	
PDF	< 60 g	25	2,78 (4,97)	0,724*
	> 60 g	37	2,41 (3,26)	
IL6	< 60 g	25	182,65 (597,46)	0,417**
	> 60 g	37	22,42 (51,42)	
IL8	< 60 g	24	16,51 (29,35)	0,561*
	> 60 g	37	24,20 (59,84)	
VEGF	< 60 g	25	3,18 (5,78)	0,340*
	> 60 g	37	8,72 (28,36)	
CD105	< 60 g	25	2,25 (2,79)	0,376*
	> 60 g	37	3,13 (4,36)	
IL2	< 60 g	20	1,68 (1,70)	0,160**
	> 60 g	29	8,43 (21,09)	
IL17	< 60 g	13	4,32 (11,11)	0,452*
	> 60 g	19	18,42 (65,71)	

*Teste T de Student ** Teste de Mann-Whitney

Tabela 6. Expressão média dos genes em relação ao nível de PSA.

Genes	PSA	N	Expressão média	P
EGF	< 2,5 ng/ml	23	6,93 (10,57)	0,469*
	> 2,5 ng/ml	35	30,88 (156,72)	
FGF2	< 2,5 ng/ml	24	16,64 (52,41)	0,762**
	> 2,5 ng/ml	38	5,97 (5,37)	
IGF1	< 2,5 ng/ml	24	17,17 (55,06)	0,607*
	> 2,5 ng/ml	38	12,06 (21,10)	
TGFB1	< 2,5 ng/ml	24	3,39 (10,64)	0,526*
	> 2,5 ng/ml	38	2,23 (2,98)	
PDF	< 2,5 ng/ml	24	2,32 (4,59)	0,714*
	> 2,5 ng/ml	38	2,71 (3,65)	
IL6	< 2,5 ng/ml	24	100,66 (399,68)	0,827*
	> 2,5 ng/ml	38	78,42 (380,75)	
IL8	< 2,5 ng/ml	23	16,64 (28,76)	0,585*
	> 2,5 ng/ml	38	23,92 (59,42)	
VEGF	< 2,5 ng/ml	24	3,88 (9,31)	0,468*
	> 2,5 ng/ml	38	8,13 (27,48)	
CD105	< 2,5 ng/ml	24	3,54 (5,32)	0,497**
	> 2,5 ng/ml	38	2,29 (2,37)	
IL2	< 2,5 ng/ml	19	1,77 (1,43)	0,727**
	> 2,5 ng/ml	30	8,14 (20,79)	
IL17	< 2,5 ng/ml	13	3,66 (11,18)	0,416*
	> 2,5 ng/ml	19	18,88 (65,59)	

*Teste T de Student ** Teste de Mann-Whitney

Em relação a presença de prostatite associada a HPB, observamos expressão cerca de quatro vezes maior da IL-8 nos pacientes com prostatite em relação aos pacientes com ausência de prostatite no anatomopatológico ($p=0,009$). Da mesma forma, os níveis de expressão de VEGF foram sete vezes maiores nos pacientes com prostatite associada a HPB ($p=0,001$). Os demais

genes não apresentaram diferença significativa de expressão entre os dois grupos conforme demonstrado na tabela 7.

Tabela 7. Expressão média dos genes em relação a presença ou ausência de prostatite associada a HPB.

Genes	Prostatite	N	Expressão média	P
EGF	Não	40	29,09 (146,54)	0,477*
	Sim	18	4,24 (4,41)	
FGF2	Não	41	6,38 (5,98)	0,409**
	Sim	21	17,36 (56,04)	
IGF1	Não	41	9,01 (14,28)	0,772**
	Sim	21	23,84 (61,39)	
TGFB1	Não	41	1,48 (1,13)	0,537**
	Sim	21	5,02 (11,68)	
PDF	Não	41	2,15 (3,80)	0,263*
	Sim	21	3,36 (4,35)	
IL6	Não	41	58,01 (304,65)	0,412*
	Sim	21	143,68 (511,41)	
IL8	Não	40	10,92 (21,10)	0,009**
	Sim	21	40,71 (77,46)	
VEGF	Não	41	2,19 (2,42)	0,001**
	Sim	21	14,87 (37,24)	
CD105	Não	41	2,84 (2,75)	0,838*
	Sim	21	2,63 (5,38)	
IL2	Não	34	5,53 (18,26)	0,931*
	Sim	15	5,98 (12,07)	
IL17	Não	22	4,58 (10,61)	0,193**
	Sim	10	30,53 (90,51)	

*Teste T de Student ** Teste de Mann-Whitney

Em virtude da síndrome metabólica ter se destacado na literatura nos últimos anos como possível indutora de proliferação celular na próstata, provavelmente através da ação do IGF1, decidimos analisar os níveis de expressão dos genes em função dele. Observamos que os pacientes (n=11) que apresentam expressão de IGF1 acima da média também apresentam níveis elevados de FGF2, TGF β 1, CD105 e de IL2 embora neste último caso a significância estatística tenha sido marginal (tabela 8).

Tabela 8. Expressão média do IGF1 em relação aos outros fatores.

Genes	IGF1 (Binário)	N	Expressão média	P
EGF	<= média	50	23,98	0,67
	> média	8	4,08	
FGF2	<= média	51	4,51	0,00
	> média	11	37,77	
TGFB1	<= média	51	1,17	0,001
	> média	11	7,52	
PDF	<= média	51	2,50	0,07
	> média	11	7,35	
IL6	<= média	51	104,57	0,51
	> média	11	6,26	
IL8	<= média	50	11,38	0,60
	> média	11	8,59	
VEGF	<= média	51	3,99	0,24
	> média	11	34,83	
CD105	<= média	51	2,473	0,006
	> média	11	6,65	
IL2	<= média	40	4,22	0,05
	> média	9	1158,34	
IL17	<= média	27	13,63	0,68
	> média	5	9,26	

4.1 Análise dos pacientes com HPB e sem uso de sonda vesical

As características demográficas do subgrupo de 34 pacientes com HPB e que não faziam uso de sonda vesical antes da cirurgia encontram-se ilustradas na tabela 9. A idade média dos pacientes foi de 68 anos, a média e mediana do PSA foram 4,2ng/ml e 2,4ng/ml respectivamente. A maioria dos pacientes tratados apresentava próstata de tamanho maior do que 60g (71%), cerca de 21% dos pacientes tiveram o diagnóstico de prostatite associada a HPB e, a grande maioria dos pacientes apresentava sintomas urinários há mais de um ano antes da cirurgia (71%). Em relação ao escore de sintomas prostáticos (IPSS) não foi possível a realização de comparação devido ao *n* muito pequeno no grupo de pacientes com sintomas severos (*n*=3) em relação ao grupo de pacientes com sintomas leves e moderados.

Tabela 9. Características demográficas dos pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para HPB que não estavam em uso de sonda vesical.

(N=34)	
Idade (anos)	
Média	68
Variação	51 – 88
PSA (ng/mL)	
Média	4,2
Mediana	2,4
Variação	0,5 – 27,6
>2,5	15
≤ 2,5	19
Tamanho da próstata(g)	
Média	65,3
Variação	25-171
Presença de prostatite	
Sim	5(21%)
Não	29(79%)
Tempo de sintoma	
>1 ano	24(71%)
≤ 1 ano	10(29%)
IPSS	
Média	16,8
Variação	8-26

Encontramos também uma superexpressão de praticamente todos os fatores de crescimento, angiogênese e marcadores de inflamação nas amostras de tecido hiperplásico, de pacientes que não faziam uso de sonda vesical em comparação com o tecido prostático do grupo controle (figura 3). O padrão de superexpressão não foi encontrado em TGFβ1, PDF e na interleucina 17. Ainda com relação a essa interleucina, a expressão da mesma se deu apenas em

pouco mais da metade de nossa casuística, prejudicando sua análise. Os percentuais de cada gene são mostrados no gráfico da figura 3.

Figura 3. Nível de expressão relativa de EGF, FGF2, IGF1, TGFβ1, PDF, IL-6, IL-8, VEGF, CD105, IL-2 e IL17 em pacientes com HPB sem uso de sonda em relação ao tecido prostático do grupo controle.

Na comparação do padrão de expressão dos genes analisados com relação a presença ou ausência de prostatite, observamos aumento de expressão de FGF2 ($p=0,044$), IGF1 ($p=0,033$), TGFβ1 ($p=0,025$) e CD105 ($p=0,002$) em pacientes com HPB sem inflamação associada comparados aos pacientes com HPB e inflamação (tabela 10).

Em relação ao padrão de expressão dos genes estudados, quando comparados o peso da próstata, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (tabela 10).

Tabela 10. Nível de expressão dos genes em relação ao tamanho da próstata e presença de prostatite.

	Próstata			Prostatite		
	<60g	>60g	<i>p</i>	SIM	NÃO	<i>p</i>
EGF	6,40 (5,75)	6,07 (11,79)	0,917*	1,62 (1,62)	7,04 (9,47)	0,216*
FGF2	4,40 (7,34)	5,37 (5,17)	0,662*	1,11 (0,74)	5,51 (6,66)	0,044**
IGF1	4,03 (7,53)	6,29 (5,82)	0,338*	0,82 (0,72)	5,83 (7,09)	0,033**
TGFβ1	0,96 (1,13)	1,27 (0,94)	0,402*	0,37 (0,22)	1,23 (1,08)	0,025**
PDF	2,90 (5,18)	0,96 (1,24)	0,154**	0,77 (0,54)	2,20 (4,23)	0,463*
VEGF	2,49 (2,70)	2,14 (2,53)	0,699*	3,09 (3,55)	2,19 (2,45)	0,483*
CD105	2,34 (3,09)	3,02 (2,66)	0,503*	0,50 (0,36)	3,03 (2,95)	0,002**
IL-2	2,13 (1,96)	1,88 (1,66)	0,734*	1,37 (0,68)	2,06 (1,84)	0,609*
IL-6	245,78(699)	8,95 (16,6)	0,825**	477,3 (1051)	75,18 (362,1)	0,925**
IL-8	13,56 (27,01)	6,58 (12,49)	0,736**	1,74 (2,05)	11,68 (22,75)	0,343*
IL-17	5,62 (13,35)	1,50 (2,31)	0,404*	1,44 (-)	3,82 (10,10)	0,823*

*Teste T de Student ** Teste de Mann-Whitney

4.2 Perfil de expressão dos marcadores de crescimento, inflamação e angiogênese em pacientes fazendo uso de sonda vesical de demora

Analisando separadamente os pacientes que fizeram uso da sonda vesical, demonstramos mais uma vez uma superexpressão de todos os fatores de crescimento, angiogênese e marcadores de inflamação em comparação com o grupo controle (figura 4).

Figura 4. Perfil de expressão dos marcadores de crescimento, inflamação e angiogênese em pacientes com HPB fazendo uso de sonda vesical de demora em relação ao tecido de próstatas do grupo controle.

Quando comparada a expressão dos genes entre os pacientes sondados com prostatite versus sem prostatite associada à HPB, observamos que os níveis da IL-8 e de VEGF foram significativamente maiores (cerca de seis e nove vezes respectivamente) nos pacientes com achado de prostatite no anátomo-patológico em relação aos pacientes sem o diagnóstico de inflamação (tabela 11). De acordo com peso da próstata, encontramos diferença apenas para a IL-2, onde encontramos uma expressão aproximadamente 13x maior nos pacientes com próstata maiores (tabela 2).

Tabela 11. Nível de expressão dos genes em relação ao tamanho da próstata e presença de prostatite nos pacientes que utilizavam sonda vesical.

	Próstata			Prostatite		
	<60g	>60g	<i>p</i>	SIM	NÃO	<i>p</i>
EGF	1,46 (1,69)	59,85 (224,60)	0,504*	5,25 (4,76)	87,23 (279,95)	0,369**
FGF2	5,03 (3,56)	20,27 (55,33)	0,479*	2,43 (63,82)	8,50 (3,19)	0,459*
IGF1	22,57 (34,10)	25,67 (60,01)	0,898*	31,03 (69,23)	16,71 (22,87)	0,422**
TGFβ1	2,35 (1,91)	5,34 (11,54)	0,506*	6,47 (13,13)	2,09 (1,06)	0,781**
PDF	2,47 (4,76)	3,51 (3,88)	0,567*	4,17 (4,72)	2,02 (2,64)	0,170*
VEGF	4,96 (10,39)	13,74 (37,17)	0,547*	18,56 (42,25)	2,19 (2,45)	0,011**
CD105	2,01 (2,01)	3,21 (5,38)	0,570*	3,30 (6,05)	2,39 (2,22)	0,625*
IL-2	0,83 (0,48)	13,74 (27,59)	0,015**	6,69 (12,88)	13,87 (33,24)	0,482*
IL-6	20,31 (24,01)	32,68 (65,55)	0,633*	39,4 (70,57)	16,51 (32,89)	0,309*
IL-8	23,68 (35,66)	37,63 (76,75)	0,649*	52,89 (85,64)	9,15 (17,42)	0,003**
IL-17	1,40 (1,37)	30,73 (85,86)	0,517*	3,77 (95,39)	6,62 (12,67)	0,506*

*Teste T de Student ** Teste de Mann-Whitney

4.3 Análise comparativa entre pacientes com sonda vesical versus sem sonda vesical

Como dito anteriormente, os níveis de expressão dos FCs, inflamação e angiogênese também foram comparados entre pacientes portadores de sonda vesical de demora (n=28) e o grupo controle sem sonda vesical (n=34) antes da cirurgia. A tabela 12 apresenta as características dos dois grupos:

Tabela 12. Características demográficas dos pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para HPB (casos) que estavam e que não estavam em uso de sonda vesical.

	Sem sonda	Com sonda	p
Idade (anos)			
Média	68	70	0,573*
Desvio padrão	9,86	7,70	
PSA (ng/mL)			
Média	4,2	8,8	0,002**
Desvio padrão	5,65	8,51	
Tamanho da próstata(g)			
Média	65,3	94,9	0,012**
Desvio padrão	34,05	49,48	
Presença de prostatite			
Sim	5(21%)	16(57%)	0,001***
Não	29(79%)	12(43%)	
Tempo de sintoma			
>1 ano	24(71%)	9(32%)	0,000**
≤ 1 ano	10(29%)	19(68%)	

*Teste T de Student ** Teste de Mann-Whitney *** Teste de Qui-quadrado

O tempo médio de uso de cateter vesical de demora antes da cirurgia foi de 6 meses. Interessantemente, demonstramos expressão significativamente maior de FGF2($p=0,003$), IGF1($p=0,001$), TGF β 1($p=0,001$), IL-8($p=0,009$) e significância com valor de p marginal para o VEGF($p=0,053$) nos pacientes em uso de cateter vesical de demora em relação aos controles (tabela 13).

Tabela 13. Comparação da expressão dos genes entre os pacientes com e sem uso de sonda vesical de demora

Uso de Sonda Vesical			
	SIM	NÃO	P
EGF	42,82 (189,28)	6,25 (8,96)	0,658**
FGF2	16,46 (48,12)	4,86 (6,34)	0,004**
IGF1	24,89 (54,11)	5,09 (6,78)	0,001**
TGFβ1	4,59 (10,06)	1,11 (1,04)	0,000**
PDF	3,25 (4,05)	1,99 (3,94)	0,221*
VEGF	11,54 (32,59)	2,32 (2,59)	0,053**
CD105	2,91 (4,75)	2,66 (2,87)	0,799*
IL-2	9,81 (23,57)	2,01 (1,78)	0,841**
IL-6	29,59 (57,80)	134,33 (516,00)	0,039**
IL-8	34,15 (68,44)	10,17 (21,22)	0,016**
IL-17	22,91 (73,80)	3,68 (9,79)	0,146**

*Teste T de Student ** Teste de Mann-Whitney

5. DISCUSSÃO

No presente estudo encontramos superexpressão de todos os fatores de crescimento, inflamação e angiogênese nos 62 pacientes com HPB. Quando divididos em subgrupos de pacientes com e sem uso de sonda vesical encontramos algumas peculiaridades como a baixa expressão de TGF β 1, PDF e IL-17 em pacientes sem sonda e uma maior superexpressão de IL-8 e VEGF no grupo de pacientes com prostatite associada a HPB, especialmente nos sondados. A presença da sonda parece induzir o aumento da expressão de FGF2, IGF1, TGF β 1, IL-8 e VEGF (significância marginal para este último). Avaliamos também um novo marcador angiogênico em HPB, a endoglina (CD105). Este gene apresentou-se superexpresso em 62% dos pacientes avaliados, independentemente da presença ou não de sonda vesical. O IGF1 mostrou-se importante especialmente pelo fato de que pacientes com expressão deste fator acima da média também apresentaram expressão aumentada de outros fatores de crescimento (FGF2, TGF β 1, CD105 e IL-2). E, também, o nível de expressão de IGF1 foi maior em pacientes com idade superior a 65 anos em relação aos mais jovens. VEGF apresentou maior superexpressão em pacientes com menos de 1 ano de sintomas do trato inferior e a IL-6 mostrou maiores níveis de expressão em pacientes com tempo de sintoma acima de 1 ano.

Alguns estudos têm demonstrado resultados conflitantes em relação à expressão dos diferentes FCs, angiogênese e inflamação na etiopatogenia da HPB. Enquanto alguns trabalhos demonstraram superexpressão de FGF2 em pacientes com HPB (Mori, 1990 e Ropiquet, 1999), outro demonstrou que a maioria dos pacientes avaliados apresentava níveis de FGF2 nas próstatas com HPB semelhante ao das próstatas normais (Nikolaos, 2006). Além disso, sabe-

se que o FGF2 parece atuar também na angiogênese da HPB e no estímulo da síntese de VEGF (Lucia, 2008).

Nosso estudo mostrou que tanto o VEGF quanto o FGF2 apresentaram-se superexpressos na HPB, sugerindo sua possível participação na etiopatogenia e/ou progressão desta patologia. Ambos apresentaram-se superexpressos em pacientes com HPB e uso de sonda vesical de demora em relação aos pacientes com HPB que não vinham em uso de sonda antes da cirurgia. Este fato pode ter valor prognóstico para estes pacientes, como menor resposta a terapêutica instituída, maior dano ao tecido prostático ou recidiva dos sintomas após tratamento. Porém, estudos prognósticos serão necessários para averiguação destes fatos. O VEGF e IL-8 apareceram ainda mais superexpressos em pacientes com prostatite associada a HPB nos pacientes sondados. Sabe-se que a IL-8 atua também na angiogênese. Pode-se inferir que a prostatite através da IL-8 possa influenciar a expressão do VEGF, porém não podemos estabelecer através do desenho deste estudo se existe ou não correlação direta entre a expressão destes dois genes.

Outro gene envolvido na angiogênese, o CD105, mostrou-se superexpresso na maior parte dos pacientes estudados e também aparece ainda mais aumentado nos pacientes que apresentaram níveis elevados de IGF1, mostrando que o processo de angiogênese na próstata e sua contribuição para os sintomas possa sofrer influências diversas, inclusive da síndrome metabólica. A inibição da proliferação endotelial por drogas anti-angiogênicos pode levar a cessação do crescimento de tumores. Durante o curso de tratamento, entretanto, as células endoteliais podem se tornar refratárias à ação dos agentes anti-angiogênicos. Uma possível solução seria o uso de drogas contra antígenos

expressos na superfície das células endoteliais que formam a vascularização tumoral. Esta terapia poderia quebrar a tolerância imunológica a antígenos próprios, expondo a células endoteliais a ação dos linfócitos T citotóxicos, controlando a proliferação vascular. Este tipo de resposta poderia ser obtida em terapia contra a Endoglin, superexpressa nas células endoteliais em proliferação. Estudos de Fase I estão sendo realizados com anticorpos contra o CD105 no tratamento de alguns tipos de tumores (Rosen 2012; Karzai, 2014). Este novo marcador angiogênico pode ter um papel muito interessante na patogênese da HPB, doença amplamente vascularizada. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar os resultados obtidos.

Fatores inibidores com atuação restritiva como o TGF β 1 e PDF também participam do processo. A ausência ou a atenuação da expressão destes fatores de restrição ao crescimento prostático poderia representar um dos mecanismos de aparecimento de HPB. Segundo Coffey e Walsh (1990), nas fases iniciais de desenvolvimento da HPB haveria uma predominância dos estímulos responsáveis pela proliferação celular, e nas fases mais avançadas deste processo existiria uma menor atividade dos fatores responsáveis pela morte celular programada. TGF β 1 parece inibir o crescimento estromal prostático em culturas celulares e promover diferenciação do estroma em células musculares lisas. O TGF β 1 também está implicado na transdiferenciação de fibroblasto em miofibroblasto. Portanto um desequilíbrio de sua expressão também está implicado na etiopatogenia da HPB. Sua expressão aumentada em pacientes usando a sonda vesical poderia modificar o estroma prostático, da maneira colocada acima. Já sua subexpressão em pacientes sem uso do fator

modificador sonda pode estar implicada na diminuição da apoptose das células epiteliais (Klingler 1999; Nikolaos 2006).

A avaliação do PDF na HPB carece de estudos na literatura e nossa análise revelou menor expressão em próstatas com HPB dos pacientes que não fizeram uso de sonda vesical previamente a cirurgia. Ou seja, a subexpressão deste gene pode estar implicada na etiopatogenia da HPB. Porém nas análises clínicas de subgrupos não houve significância estatística nas análises em relação ao PDF. Portanto os resultados referentes a este marcador ainda são conflitantes.

A avaliação dos níveis de EGF (endotelial growth factor) também é conflitante na literatura. Pesquisadores demonstraram uma subexpressão em pacientes mais velhos e, portanto seus níveis parecem diminuir com a progressão da HPB (Nikolaos, 2006). Nossa análise evidenciou superexpressão de EGF em amostras de HPB em relação ao tecido prostático normal ou com HPB incipiente e não houve diferença de expressão do mesmo nas análises de subgrupo em relação ao tamanho prostático, nível de PSA, idade dos pacientes e tempo de sintoma.

Níveis aumentados de IGF1 parecem estar implicados com doença maligna da próstata e também com HPB (Mantzoros, 1997). Em nossa análise o IGF1 apareceu superexpresso na maioria dos espécimes com HPB e, especialmente, nos pacientes com idade superior a 65 anos. Nos pacientes em uso de sonda vesical o nível de expressão foi cerca de 5 vezes maior em relação aos pacientes sem sonda. Este fator de crescimento tem recebido especial atenção em estudos mais recentes, pois parece ser um dos principais vilões do desenvolvimento da HPB em pacientes com resistência insulínica. Resistência à

insulina/ Diabetes tipo II está associada a um grupo de desordens como obesidade, dislipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertensão, que juntas configuram a síndrome metabólica. Embora haja opiniões distintas, a maioria das evidências suporta a idéia de que a resistência a insulina esteja relacionada a um alto risco de desenvolvimento de HPB. Além do mais, estudos epidemiológicos demonstram que a resistência insulínica é um fator de risco independente para o desenvolvimento da HPB (Hammarsten 2009; Nandeesh, 2008).

Devemos porém, nos ater ao fato de que os pacientes com Diabetes tipo II/resistência insulínica, na verdade, tem menores níveis séricos circulantes de IGF1 que pacientes normais com a mesma idade (Heald, 2006). Ademais, a presença e ação do receptor de insulina na próstata de pacientes com HPB é muito baixa (Cox, 2009). Esta desconexão pode ser explicada pela natureza fisiológica da insulina e dos receptores de IGF. O receptor de insulina exibe um alto grau de homologia com o receptor de IGF e estes ligantes relacionados são sabidamente ativadores cruzados de seus receptores. Isto tudo sugere que a insulina possa causar o crescimento prostático durante o diabetes tipo II pela ativação do receptor de IGF no tecido prostático. Hiperinsulinemia é associada também com um aumento da atividade do sistema nervoso simpático e isto pode contribuir para o aumento do tônus da musculatura lisa da próstata resultando em LUTS mais severo independentemente do tamanho prostático. Os estudos citados avaliaram a expressão de IGF no sangue dos pacientes com HPB e resistência à insulina e a literatura carece da avaliação deste fator de crescimento no tecido prostático. Nosso trabalho foi um dos pioneiros a mostrar a superexpressão tecidual do IGF1 em pacientes com HPB em relação aos

pacientes com próstata de pequeno volume. Também foi o primeiro a mostrar a possível ação dos IGF1 como promotor ou facilitador de angiogênese pois os pacientes com expressão de IGF1 acima da média em nosso trabalho também apresentaram aumento na expressão de outros fatores de grande importância na angiogênese: FGF2 e CD105. Nos pacientes com IGF1 aumentado também evidenciou-se aumento na expressão de TGF β 1, mostrando que o IGF1 também pode influenciar a diferenciação celular no ambiente prostático.

Diversos marcadores inflamatórios apresentam uma expressão aumentada em pacientes com HPB, corroborando com a hipótese de um processo inflamatório como possível fator etiopatogênico da doença. Di Silverio (2003) mostrou, ao analisar 3942 espécimes de anátomo-patológico com HPB, que a incidência de inflamação associada foi de 43%, particularmente, de inflamação crônica, chegou a 30%. A severidade da inflamação foi categorizada como leve em 78% dos casos e estava associada a idade e volume prostático. Dados do estudo Medical Therapy of Prostate Symptoms (MTOPS) mostraram que cerca de 40% dos pacientes submetidos a biópsia prostática apresentavam infiltrado inflamatório crônico nos espécimes de anátomo-patológico, em particular naqueles pacientes com PSA aumentado e naqueles com maior volume prostático (Roehrborn, 2005). Neste estudo, os pacientes com infiltração inflamatória crônica apresentaram maior risco de progressão da doença e de retenção urinária aguda quando comparados com pacientes sem o achado de prostatite no início do seguimento. Entre os pacientes com próstata de pequeno volume somente os pacientes com inflamação associada apresentaram retenção urinária.

O estudo REDUCE (Nickel JC 2007, 2008) confirmou estes dados. Neste estudo, o grau de inflamação foi graduado em nenhuma, leve, moderada e severa em 8824 pacientes submetidos a biópsia prostática. Inflamação prostática estava associada a maior volume prostático (46,5ml versus 43,4ml; $p < 0,0001$) e escore de sintomas (IPSS) mais alto (8,8 versus 8,2; $p < 0,0001$). Os dados de inflamação prostática nestes estudos são baseados em amostra de biópsia que de alguma maneira reflete a condição de toda a glândula, embora a possibilidade de erro amostral deva ser considerada neste tipo de análise.

Diferentes vírus, como o papiloma vírus humano (HPV), herpes simples tipo 2 e citomegalovírus; alguns microorganismos sexualmente transmissíveis como *Neisseria Gonorrhoea*, *Chlamydia Trachomatis*, *Treponema Pallidum*, *Trichomonas Vaginalis* e patógenos Gram negativos como *Escherichia Coli* tem sido identificados na próstata e a maioria deles pode ser responsável por uma resposta inflamatória (Penna, 2009; Breyer 2015). Outro possível agente inflamatório é a irritação química por refluxo de urina nos ductos prostáticos. Ácido úrico cristalino tem sido considerado um sinal de perigo, liberado pelas células mortas é capaz de ativar um complexo multiproteico (caspase1-NALP3) presente nos leucócitos, mais frequentemente nos macrófagos (Martinon, 2006). A consequência deste processo é a liberação de citocinas inflamatórias que podem aumentar o influxo de outras células inflamatórias. A injúria prostática secundária aos possíveis patógenos mencionados pode danificar o epitélio das células prostáticas com a consequente liberação de antígenos imunogênicos e provocar uma quebra no sistema imunológico prostático. Tem sido proposto que alguns determinantes das proteínas normais da próstata, as quais não são expressas antes da puberdade, não são fisiologicamente tolerados pelo sistema

imune. Portanto, quando liberados, estes antígenos podem determinar uma resposta autoimune (Robert 2009; De Marzo 2007).

A expressão de citocinas, como a interleucina 8, secretada pelas células T ativadas e células estromais da próstata, está aumentada em tecidos com HPB e pode promover proliferação de células epiteliais e estromais direta ou indiretamente (Giri, 2001; Konig, 2004). Outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-2, IL-4 e IL17 podem estar super-expressas de 10 a 13 vezes no tecido prostático de pacientes com HPB e influenciar direta ou indiretamente a produção de FC (Kramer, 2002; Steiner, 2003).

Avaliamos as interleucinas 17, 2, 6 e 8 no tecido prostático hiperplásico, sendo que as três últimas apresentaram-se superexpressas na maior parte das amostras avaliadas (superexpressão da IL-2, IL-6 e IL-8 em 69,4%, 67,7% e 80,3% das amostras do total de casos, respectivamente). A IL-2 mostrou-se ainda mais elevada no grupo de pacientes sondados e com próstatas maiores do que 60g, podendo contribuir ainda mais no desenvolvimento da HPB neste grupo assim como a IL-8. Também apresentou níveis teciduais mais elevados naqueles pacientes com maior expressão de IGF1 mostrando que os pacientes obesos ou com resistência insulínica talvez apresentem um maior grau de inflamação na próstata. A IL-6 é considerada um reator de fase ativa, liberada pelas células epiteliais e estromais durante inflamação aguda. Estudos epidemiológicos têm demonstrado níveis séricos aumentados em homens com HPB abaixo dos 65 anos e um estudo mostrou níveis teciduais mais elevados desta interleucina em pacientes com HPB quando comparados a homens com próstatas normais. Em nosso trabalho a IL-6 apresentou níveis teciduais mais elevados em pacientes com tempo de sintomas superior a 1 ano, evidenciando

que estes pacientes podem sofrer episódios de agudização do processo inflamatório no decorrer do tempo. Apesar disto, a IL-6 apresentou níveis mais elevados em pacientes sem sonda do que naqueles com sonda, mostrando que a presença da mesma parece não influenciar os níveis desta interleucina, sendo as IL-2 e IL-8 mais implicadas com inflamação neste grupo de pacientes, como já exemplificado. A análise da IL-17 ficou prejudicada pois apenas pouco mais da metade das amostras expressaram estas interleucinas. Mas supõe-se que a IL-17 estimula a liberação da IL-6 e da IL-8 pelas células estromais e possa participar da regulação fina do processo inflamatório (Steiner 2003). A IL-8 mostrou níveis significativamente aumentados em pacientes sondados (sobretudo nos casos com prostatite associada HPB), mostrando que a presença da sonda vesical influi intensamente na homeostase inflamatória da próstata e pode estar contribuindo significativamente para a piora clínica dos pacientes. Diferente da IL-6, a IL-8 parece estar relacionada principalmente com o estímulo prostático inflamatório crônico, além de ser um provável potencializador da ação do FGF2 (Giri 2001) e talvez, então, do VEGF.

Verificou-se também que o nível de PSA foi duas vezes maior no grupo de pacientes em uso de sonda vesical, o que pode dever-se a maior expressão de alguns fatores de crescimento e inflamação e, que pode ser importante na tomada de decisões (por exemplo: realização ou não de biópsia de próstata antes de cirurgia). Se, em trabalhos subsequentes, comprovarmos que o PSA aumenta devido a expressão de alguns genes (que sejam diferentes daqueles implicados no câncer de próstata) e que isto não acarreta maior detecção de câncer em pacientes que fazem uso de sonda vesical antes da cirurgia,

poderemos indicar o procedimento cirúrgico para HPB com maior segurança para os pacientes, sem necessidade de aventar biópsia prévia.

A análise dos pacientes em uso de sonda vesical também foi de grande importância em nosso trabalho já que o tempo de uso de cateter vesical de demora antes de cirurgia para HPB é um problema real nos países em desenvolvimento. Este é o primeiro estudo que mostra a implicação de tal uso sobre a expressão dos fatores de crescimento, angiogênese e marcadores de inflamação. Foi observado expressão significativamente maior de FGF2(p=0,003), IGF1(p=0,001), TGF β 1(p=0,001), VEGF(p=0,05) e IL-8(p=0,009) nos pacientes em uso de cateter vesical de demora em relação aos controles. Estes fatores de crescimento estão entre os principais perturbadores da homeostase prostática. Entre eles temos fatores relacionados a angiogênese, transdiferenciação celular, potencializador do crescimento e também a IL-8 relacionada a inflamação conforme já discutido anteriormente.

Aparentemente, a desregulação do ambiente prostático provocada pela presença da sonda parece ser um fator potencializador das alterações crônicas sofridas pelos pacientes com HPB e evidencia claramente a interconexão dos diferentes promotores de hiperplasia das células prostáticas que pudemos conhecer através deste trabalho. Vale ressaltar novamente que nesse grupo de pacientes a presença de prostatite associada a HPB revelou hiperexpressão de IL-8 e VEGF.

No entanto, devemos lembrar que o desenho do presente estudo não nos permite definir se a superexpressão destes fatores é causa ou consequência da retenção urinária nestes pacientes.

Em relação aos níveis aumentados de EGF, IGF1, TGF- β 1 e CD105 em pacientes com HPB e sem prostatite quando comparados aos com HPB e prostatite associada, avaliamos que esta análise possa ter ficado prejudicada pelo fato deste subgrupo de pacientes ter apresentado um *n* muito reduzido, perdendo poder a análise estatística e prejudicando a sugestão de hipóteses em relação a este achado.

Considerações finais

Embora não completamente conhecidas as rotas de interação entre os fatores de crescimento implicados na gênese da HPB, este trabalho é um dos maiores na literatura em relação a análise de expressão dos mesmos no ambiente prostático e na busca do esclarecimento das possíveis inter-relações e importância de cada fator. Ficou clara a superexpressão de praticamente todos os fatores avaliados no nosso estudo em pacientes com HPB em relação aos controles. A presença da sonda vesical influencia ainda mais a expressão dos fatores de crescimento e parece induzir proliferação adicional das células prostáticas graças a expressão aumentada de FGF2, IGF1, TGF β 1, VEGF e IL-8. A expressão aumentada de TGF β 1, FGF2 e CD105 em pacientes que também apresentam níveis aumentados de IGF1 mostra que este fator de crescimento parece ser um fator mitogênico de extrema importância. Além do mais, é possível que a indução local do IGF1 em pacientes obesos secundária ao aumento da inflamação nestes pacientes possa ser uma possível via patogênica em relação a resistência insulínica e HPB. Um novo fator angiogênico é reportado pela primeira vez na literatura (CD105-Endoglin) através deste trabalho em relação

a sua expressão na HPB. Merece atenção esta nova descoberta na HPB e mais estudos devem ser conduzidos para esclarecer ainda melhor o real papel do CD105 na gênese e manutenção do processo da hiperplasia prostática benigna, assim como sua interação com outros fatores angiogênicos e de crescimento.

Como análise crítica da presente tese, destacamos o fato de termos utilizado um grupo controle composto por pacientes também submetidos a procedimento cirúrgico para melhora dos sintomas urinários. Entretanto, dos oito pacientes do grupo controle, cinco apresentavam hipertrofia/hipertonia do colo vesical como causa dos sintomas e não verdadeiramente hiperplasia prostática ou uma hiperplasia prostática incipiente, visto que o volume médio prostático em nosso grupo controle foi de apenas 28 gramas (próstata é considerada de volume normal entre 20-30 gramas). Não sabemos se estes casos iriam desenvolver HPB se tivessem vivido o suficiente. Entendemos portanto, que o grupo controle ideal seria constituído por pacientes pareados por idade, no entanto ressaltamos a grande dificuldade de encontrar próstatas sem hiperplasia histológica em faixas etárias mais avançadas.

Acreditamos que este trabalho possa guiar o estudo e utilização futura de terapias moleculares alvo que possam atuar impedindo ou diminuindo a ação dos genes estudados no tecido prostático para que se possa prevenir ou mesmo combater esta doença tão prevalente e perturbadora para os homens.

Como próximo passo, devemos destacar a importância da análise da expressão proteica resultante da ação destes genes, visto que apenas a análise da expressão gênica não assegura que os mesmos estejam codificando proteínas.

6. CONCLUSÕES

Os FC, interleucinas e marcadores de angiogênese estudados apresentaram perfil de superexpressão nos pacientes com HPB em relação ao grupo controle.

O VEGF encontra-se mais superexpresso em pacientes com tempo de sintomas inferior a um ano em comparação com pacientes que possuem história mais tardia, a IL-6 mostrou-se mais superexpressa nos pacientes com maior tempo de sintomas (acima de 1ano) e o IGF1 apresentou maior superexpressão naqueles pacientes com idade superior a 65 anos.

O FGF2, IGF1, TGFB1, VEGF e IL-8 encontram-se mais superexpressos em pacientes com uso de sonda vesical em comparação com os pacientes sem sonda. A IL-6 foi mais superexpressa entre os pacientes sem sonda vesical. A IL-2 apareceu mais superexpressa em pacientes sondados e com próstatas grandes. Nesse grupo de pacientes com sonda, o VEGF e a IL-8 encontram-se ainda mais superexpressos em pacientes com prostatite associada.

O FGF2, TGFB1, CD105 e IL-2 encontram-se mais superexpressos em pacientes com maior expressão do IGF1 em relação aos pacientes com menor expressão deste gene.

7. REFERÊNCIAS

Botelho F, Pina F, Silva P, Figueiredo G, Cruz F, Lunet N. Vascular Endothelial growth factor (VEGF) and prostate pathology. *Int Braz J Urol.* Jul-Ago; 36(4): 430-7, 2000.

Breyer BN¹, Huang WY, Rabkin CS, Alderete JF, Pakpahan R, Beason TS, Kenfield SA, Mabie J, Ragard L, Wolin KY, Grubb III RL, Andriole GL, Sutcliffe S. Sexually transmitted infections, benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptom-related outcomes: Results from the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *BJU Int.* Jan 20. doi: 10.1111/bju.13050, 2015.

Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev.* 11(2):201-20, 1990.

Castro P, Xia C, Gomez L, Lamb DJ, Ittmann M. Interleukin-8 expression is increased in senescent prostatic epithelial cells and promotes the development of benign prostatic hyperplasia. *Prostate.* 60(2): 153-9, 2004.

Chaproniere DM, McKeehan WL. Serial culture of single adult human prostatic epithelial cells in serum-free medium containing low calcium and a new growth factor from bovine brain. *Cancer Res.* 46(2):819-24, 1986.

Coffey DS, Walsh PC. Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 17(3):461-75, 1990.

Cohen DW, Simak R, Fair WR, Melamed J, Scher HI, Cordon-Cardo C. Expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in human prostate tissues. *J Urol.* 152(6 Pt 1):2120-4, 1994.

Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, Ellis LM. *Clin Cancer Res.* Apr 1;14(7):1931-7, 2008.

De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 7: 256-69, 2007.

Di Silverio F, Gentile V, De Matteis A, et al. Distribution of inflammation, pre-malignant lesions, incidental carcinoma in histologically confirmed benign prostatic hyperplasia: a retrospective analysis. *Eur Urol* 37:404-12, 2003.

Doll JA,Reiher FK, Crawford SE, et al.:Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. *Prostate* 49: 293-305, 2001.

Emberton M, Andriole GL, de la Rosette J et al. Benign prostatic hyperplasia. A progressive disease of aging men. *Urology* ; 61: 267-73, 2003.

Giri D, Ittmann M: Interleukin-8 is a paracrine inducer of fibroblast growth factor 2, a stromal and epithelial growth factor in benign prostatic hyperplasia. *J Pathol*, 159: 139-147, 2001.

Florian-Sánchez E, Cárdenas-Rodríguez N, Castro-Marín M, Alvarez-Grave P, Lara-Padilla E. DD3(PCA3) gene expression in cancer and prostatic hiperplasia. *Clin Invest Med*. Dec 1;32(6):E258, 2009.

Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC, et al. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia.The Finasteride Study Group. *N Engl J Med*; 327(17):1185-91, 1992.

Gregory H, Willshire IR, Kavanagh JP, Blacklock NJ, Chowdury S, Richards RC. Urogastrone-epidermal growth factor concentrations in prostatic fluid of normal individuals and patients with benign prostatic hypertrophy. *ClinSci (Lond)*. 70(4):359-63, 1986.

Griffiths K, Akaza H, Eaton CL et al. Regulation of prostatic growth. In: Cockett ATK, Khoury S, Aso Y, Chatelain C, Griffiths K, Murphy G, editores. The 2nd

International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). Jersey: *Scientific Communication International*; p.49-83, 1993.

Habib FK, Chem C. Pathogenesis of benign prsotatic hyperplasia. In: Chisholm G. *Handbook on benign prostatic hyperplasia*. Nova Jersey: Whitehouse Station; p.19-31, 1994.

Hammarsten J, Damber J.E, Karlsson M, Knutson T, Ljunggren O, Ohlsson C, et al. Insulin and free ostradiol are independednt risk factors for benign prostate hyperplasia. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 12(2):160-165, 2009.

Heald A, Stephens R, Gibson J. M. The insulin like growth factor system and diabetes-an overview. *Diabetic Med.* 1, 19-24, 2006.

Jackson MW, Bentel JM, Tilley WD: Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 157: 2323-2328, 1997.

Jacobsen SJ. Risk factors for benign prostatic hyperplasia. *Curr Urol Rep*; 8(4):281-8, 2007.

Kaplan S, Garvin D, Gilhooly P,Koopel M, et al. Impact of baseline symptom severity on future risk of benign prostatic hyperplasia-related outcomes and long-term response to finasteride. The Pless Study Group. *Urology* 1;56(4): 610-6, 2000.

Takehi Y, Segawa T, Wu XX, et al.:Down-regulation of macrophage inhibitory cytokine-1/prostate derived factor in benign prostatic hyperplasia. *Prostate*, 59: 351-356, 2004.

Karam JA, Roehrborn CG, Karakiewicz PI, Slawin KM, Shariat SF. Preoperative plasma endoglin levels predict biochemical progression after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res.* Jun 1;14(11):3362-6, 2008.

Karzai FH, Apolo AB, Cao L, Madan RA, Adelberg DE, Parnes H, McLeod DG, Harold N, Peer C, Yu Y, Tomita Y, Lee MJ, Lee S, Trepel JB, Gulley JL, Figg WD, Dahut WL. A phase I study of TRC105 anti-CD105 (endoglin) antibody in metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int.* Nov 19. doi: 10.1111/bju.12986, 2014.

Klingler HC, Bretland AJ, Reid SV, et al.: Regulation of prostatic stromal cell growth and function by transforming growth factor beta (TGFbeta). *Prostate*, 41: 110-120, 1999.

König JE, Senge T, Allhoff EP, et al.: Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Prostate*, 58: 121-129, 2004.

Kramer G, Steiner GE, Handisurya A, et al.: Increased expression of lymphocyte-derived cytokines in benign hyperplastic prostate tissue, identification of the producing cell types, and effect of differentially expressed cytokines on stromal cell proliferation. *Prostate*, 52: 43-58, 2002.

Kramer G, Mitteregger D, Marberger M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? *Eur Urol.*, 51(5):1202-16, 2007.

Lucia MS, Lambert JR. Growth factors in benign prostatic hyperplasia: basic science implications. *Curr Urol Rep.*, 9(4):272-8, 2008.

Ma W, Diep K, Fritsche HA, Shore N. Diagnostic and prognostic scoring system for prostate cancer using urine and plasma biomarkers. *Genet Test Mol Biomarkers.*;18(3):156-63, 2014.

Mantzoros CS, Tzonou A, Signorello LB, Stampfer M, Trichopoulos D and Adami HO: Insulin-like growth factor 1 in relation to prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Br J Cancer* 76: 1115-1118, 1997.

Martinon F, Petrili V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate NALP3 inflammasome. *Nature*; 440:237-41, 2006.

McConnell JD, Roehrborn CG, Bautista OM, Andriole GJ Jr, et al: The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. MTOPs study. *N Engl J Med* ;349(25):2387-98, 2003.

McNeal JE. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol*. 15(4):340-5, 1978.

Montorsi F, Roehrborn C, Garcia Penit J, Borre M, et al. The effects of dutasteride or tamsulosin alone and in combination on storage and voiding symptoms in men with lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH): 4-year data from the Combination of Avodart and Tamsulosin (CombAT) study. *BJU Int*; 107(9): 1426-31, 2011.

Mori H, Maki M, Oishi K, Jaye M, Igarashi K, Yoshida O, Hatanaka M. Increased expression of genes for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor type beta 2 in human benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 16(1):71-80, 1990.

Nandeessha H. Benign prostatic hyperplasia: dietary and metabolic risk factors. *Int Urol Nephrol*. 40(3), 649-656, 2008.

Neuhouser ML, Schenk J, Song YJ, Tangen CM, Goodman PJ, Pollak M, Penson DF, Thompson IM, Kristal AR. Insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3 and risk of benign prostate hyperplasia in the prostate cancer prevention trial. *Prostate*. 68(13):1477-86, 2008.

Nikolaos S, Ioannis K, Demetrios D, Demetrios AS. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGFB1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign hyperplasia. *Int Journal of Oncology*;29:305-314, 2006.

Nickel JC, Roehrborn CG, O'Leary MP, Bostwick DG, Somerville MC, Rittmaster RS. Examination of the relationship between symptoms of prostatitis and histological inflammation: baseline data from the REDUCE chemoprevention trial. *J Urol*; 178:896-900, 2007.

Nickel JC, Roehrborn CG, O'Leary MP, Bostwick DG, Somerville MC, Rittmaster RS. The relationship between prostate inflammation and lower urinary tract symptoms: examination of baseline data from the REDUCE trial. *Eur Urol*; 54:1379-84, 2008.

Page MJ, Parker MG. Effect of androgen on the transcription of rat prostatic binding protein genes. *Mol Cell Endocrinol*; 27(3):343-55, 1982.

Partin AW, Oesterling JE, Epstein JI, et al. Influence of age and endocrine factors on the volume of benign prostatic hyperplasia. *J Urol*; 145(2):405-9, 1991.

Penna G, Fibbi B, Maggi M, Adorini L. prostate autoimmunity: from experimental models to clinical counterparts. *Exper Rev Clin Immunol* ;5:577-86, 2009.

Ribeiro DL, Pinto ME, Maeda SY, Taboga SR, Góes RM. High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate. *Cell Tissue Res*. 349(2):577-88, 2012.

Robert G, Descazeaud A, Allory Y, Vacherot F, de la Taille A. Should we investigate prostatic inflammation for the management of benign prostate hyperplasia? *Eur Urol Suppl*.8:879-86, 2009.

Roehrborn CG, Kaplan SA, Noble WD, Lucia MS, Slawin KM, McVary KT, Kusek JW, Nyberg Jr LM. The impact of acute or chronic inflammation in baseline biopsy on the risk of clinical progression of BPH: results from the MTOPs study. *J Urol*; 173(Suppl):346, 2005.

Rouleau M, Leger J, Tenniswood M. Ductal heterogeneity of cytokeratins, gene expression, and cell death in the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol*;4(12):2003-13, 1990.

Ropiquet F, Giri D, Lamb DJ and Ittmann M: FGF7 and FGF2 are increased in benign prostatic hyperplasia and are associated with increased proliferation. *J Urol* 162: 595-599, 1999.

Rosen LS¹, Hurwitz HI, Wong MK, Goldman J, Mendelson DS, Figg WD, Spencer S, Adams BJ, Alvarez D, Seon BK, Theuer CP, Leigh BR, Gordon MS. A phase I first-in-human study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*. 1; 18(17):4820-9, 2012.

Scott WW. What makes the prostate growth? *JUrol*; 70(3):477-88, 1953.

Steiner G, Gessl A, Kramer G, et al.:Phenotype and function of peripheral and prostatic lymphocytes in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 151: 480-484, 1994.

Steiner GE, Newman ME, Paikl D, et al.:Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate*, 56: 171-182, 2003.

Steiner GE, Stix U, Handisurya A, et al. Cytokine expression pattern in benign prostatic hyperplasia infiltrating T cells and impact of lymphocytic infiltration on cytokine mRNA profile in prostatic tissue. *Lab Invest*; 83: 1131-46, 2003.

Steiner MS. Review of peptide growth factors in benign prostatic hyperplasia and urological malignancy. *J Urol*. 153(4):1085-96, 1995.

Taoka R, Tsukuda F, Ishikawa M, et al.:Association of prostatic inflammation with down-regulation of macrophage inhibitory cytokine-1 gene in symptomatic benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 171: 2330-2335, 2004.

Theyer G, Kramer G, Assmann I, Sherwood E, Preinfalk W, Marberger M, Zechner O, Steiner GE. Phenotypic characterization of infiltrating leukocytes in benign prostatic hyperplasia. *Lab Invest.* 66(1):96-107, 1992.

Vermeulen A, Deslypere JP, de Meirleir K.A. New look to the andropause: altered function of the gonadotrophs. *J Steroid Biochem*;32(1B):163-5, 1989.

Vikram A, Jena G. Role of insulin and testosterone in prostatic growth: Who is doing what? *Medical Hypotheses* 76; 474-478, 2011.

Yono M, Mane S.M, Lin A, Weiss R.M, Latifpour J. Differential effects of diabetes induced by streptozotocin and that develops spontaneously on prostate growth in Bio Breeding (BB) rats. *Life Sci* 83 (5-6), 192-197, 2008.

Walsh PC, Hutchins GM, Ewing LL. Tissue content of dihydrotestosterone in human prostatic hyperplasia is not supranormal. *J Clin Invest*; 72(5):1772-7, 1983.

Wang Z, Olumi AF. Diabetes, growth hormone-insulin-like growth factor pathways and association to benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*;82(4-5):261-71, 2011.

Welch G, Weinger K, Barry MJ. Quality-of-life impact of lower urinary tract symptom severity: results from the Health Professionals Follow-up Study. *Urology.* 59(2):245-50, 2002.

APÊNDICE

Apresentações realizadas

AUA Annual Meeting 2014

IGF1 expression and its relationship with others growth factors in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia

Authors: Karlo Biolo*, Porto Alegre, Brazil, Sabrina T Reis, Ricardo Kiriara, Nayara Viana, Fabio Oliveira, Katia R Leite, Miguel Srougi, Alberto A Antunes, Sao Paulo, Brazil

Abstract: PD25-11

Introduction and Objectives

Patients with peripheral insulin resistance appear to be at an increased risk of prostate hyperplasia. The hyperinsulinemic state stimulates the liver to produce further IGF1, which binds to its receptor in prostate tissue and stimulates the growth of the gland. Our study evaluated the relationship between increased tissue expression of IGF1 with the expression of other known growth factors.

Methods

We analyzed frozen prostate tissue specimens from 62 patients undergoing transurethral resection of the prostate or open surgery to treat BPH. The mean expression levels of the insulin growth factor (IGF1) was calculated. Expression levels of epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor2 (FGF2), prostate derived factor (PDF), transforming growth factor beta1 (TGFB1), vascular endothelial growth factor (VEGF), endoglin (CD105) and interleukins 2,6,8 and 17 were assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) method and compared between patients with high (above the average) and low (below the average) levels of IGF1.

Results

Among the 62 patients evaluated 11 had levels of IGF1 above the average level. These patients also expressed higher tissue levels of FGF2, TGFB1 and CD105 when compared with the group which expressed IGF-1 levels below the middle level ($p < 0.05$). We also compared the expression levels of IGF1 in patients with urinary retention ($n = 28$) versus patients without urinary retention

(n = 34). In patients with urinary retention the level expression of IGF1 was about 5 times greater than those without history of urinary retention prior to surgery.

Conclusions

FGF2 and CD105 genes are promoters of angiogenesis and its expression can be influenced by IGF1, but more studies are needed to confirm these findings. Patients who expressed high levels of this gene also showed increased expression of TGF beta1, showing that IGF1 may also influence cell differentiation in the prostate environment. Finally, we found higher IGF1 levels in patients with urinary retention.

Date & Time: May 19, 2014 3:30 PM-5:30 PM

Session Title: Benign Prostatic Hyperplasia: Evaluation & Markers

Sources of Funding: Fapesp

AUA Annual Meeting 2013**Expression profile of CD105 in patients with benign prostatic hyperplasia (BPH): A new angiogenic marker**

Karlo Biolo; Ricardo Kirihaara; Sabrina T Reis; Nayara I Viana; Paulo Sajovic; Luiz Henrique Araújo; Katia R Leite; Miguel Srougi; Alberto A Antunes

Abstract: 1741**Introduction and Objectives**

Angiogenesis is recognized as an important process in tumor growth, inflammation and scarring. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is the main biomarker involved in neovascularization and has been observed in hyperplastic prostate stromal cells. Recently, experimental evidences show that endoglin (CD105), a transmembrane glycoprotein that functions as a co-receptor for TGF β 1 is expressed both in endothelial cells of mature and immature blood vessels. Endoglin gene mutation is associated with the occurrence of hereditary hemorrhagic telangiectasia/Osler-Weber-Rendu syndrome. Despite the importance of this angiogenic factor and the attempt to create target therapies that inhibit the action of CD105 in tumors, this is the first study about the expression of this marker in BPH.

Methods

We analyzed frozen prostate tissue from 34 patients undergoing transurethral prostate resection or open surgery to treat BPH. The control group consisted of tissue samples without BPH obtained from prostates of three patients organ donors. The expression levels of CD105 was assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction method. Expression levels of the epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor 2 (FGF2), prostate derived factor (PDF), insulin-like growth factor1 (IGF1), transforming growth factor(TGF β 1), vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukins 2,6,8 and 17 were also analyzed.

Results

There was overexpression of CD105 and all the growth factors, angiogenesis and inflammation markers compared to normal tissue except the levels of TGF-1 and interleukins 2 and 17. A subgroup analysis of patients with (n = 6) and without (n = 28) histological prostatitis associated with BPH showed increased expression of EGF (p = 0.02), IGF1 (p = 0.02), TGF-1 (p = 0.037) and CD105 (p = 0.008) in patients with BPH only. The average expression of CD105 was 2.91 greater in BPH than normal. Medium size prostate of patients with overexpression and subexpression of the marker was 69,1 and 59g respectively.

Conclusions

CD105 is overexpressed in the the majority of patients with BPH. Expression levels were significantly lower among cases with histological prostatitis. This findings suggest a possible role for CD105 in the pathogenesis of the disease and opens a potential therapeutic window.

Date & Time: May 7, 2013 01:00 PM

Session Title: Benign Prostatic Hyperplasia: Epidemiology and Natural History/Evaluation & Markers

Sources of Funding: Fapesp